

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 597**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2010 E 10709360 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2406629**

54 Título: **Ensayos de actividad de endopeptidasa re-dirigida basados en inmunología**

30 Prioridad:

13.03.2009 US 160217 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.03.2014

73 Titular/es:

**ALLERGAN, INC. (100.0%)
2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92612, US**

72 Inventor/es:

**WANG, JOANNE;
ZHU, HONG;
HODGES, D. DIANE y
FERNANDEZ-SALAS, ESTER**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 440 597 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayos de actividad de endopeptidasa redirigida basados en inmunología.

- 5 Las secuencias desveladas en la presente memoria descriptiva figuran en el listado de secuencia presentado como parte de la presente memoria descriptiva.

La capacidad de toxinas clostridiales, tales como: por ejemplo, Neurotoxinas botulínicas (BoNT), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F y BoNT/G y neurotoxina tetánica (TeNT), para inhibir la transmisión neuronal están siendo explotadas en una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas y cosméticas, véase por ejemplo, William J. Lipham, *Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin* (Slack, Inc., 2004). Las toxinas clostridiales disponibles en el mercado como composiciones farmacéuticas incluyen, preparaciones de BoNT/A, tales como, por ejemplo, BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN® (Ipsen Ltd., Slough, Inglaterra), PURTOX® (Mentor Corp., Santa Barbara, CA), XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Francfort, Alemania), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, Corea del Sur), BTX-A (Biogen-tech Ltd., University, Yantai, Shandong, China); y preparaciones de BoNT/B, como, por ejemplo, MYOBLOC®/NEUROBLOC® (Solstice Neurosciences, Inc., South San Francisco, CA). Como ejemplo, BOTOX® está aprobado actualmente en uno o más países para las siguientes indicaciones: acalasia, espasticidad adulta, fisura anal, dolor de espalda, blefaroespasmos, bruxismo, distonía cervical, temblor esencial, líneas del entrecejo o líneas faciales hiperkinéticas, dolor de cabeza, espasmo hemifacial, hiperactividad de la vejiga, hiperhidrosis, parálisis cerebral juvenil, esclerosis múltiple, trastornos mioclónicos, líneas nasolabiales, disfonía espasmódica, estrabismo y trastorno del nervio VII.

Un tratamiento de toxina de Clostridium inhibe neurotransmisores y la liberación de neuropéptidos interrumpiendo el proceso exocitótico utilizado para segregarse los neurotransmisores y neuropéptidos en la hendidura sináptica. Existe un gran deseo por la industria farmacéutica de ampliar la utilización de toxinas clostridiales en terapias más allá de sus aplicaciones actuales miorelajante para tratar una dolencia basada en los nervios sensoriales, tales como, por ejemplo, diversos tipos de dolor crónico, inflamación neurogénica y trastornos urogenitales, así como otros trastornos, tales como, por ejemplo, la pancreatitis. Un enfoque que actualmente está siendo explotado para ampliar terapias basadas en toxinas clostridiales implica la modificación de una toxina de Clostridium, de modo que la toxina modificada tenga una capacidad de dirigirse a una célula alterada para una célula neuronal o no-neuronal de interés. Llamado endopeptidasa redirigida o Proteínas Moduladoras de Exocitosis Vesicular Dirigida (TVEMP), estas moléculas alcanzan sus efectos inhibidores de exocitosis utilizando un receptor diana presente en la célula diana neuronal o no neuronal de interés. Esta capacidad redirigida se consigue mediante la sustitución de un dominio de unión de origen natural de una toxina de Clostridium por un dominio director que muestra una actividad de unión selectiva para un receptor de toxina no Clostridial presente en una célula diana neuronal o no neuronal de interés. Tales modificaciones de un dominio de unión dan como resultado una molécula que es capaz de unirse selectivamente a un receptor de toxina clostridial presente en la célula diana. Una endopeptidasa redirigida puede unirse a un receptor diana, translocarse en el citoplasma y ejercer su efecto proteolítico sobre el complejo SNARE de la célula diana neuronal o no neuronal de interés.

Un grupo de endopeptidasa redirigida comprende moléculas que tienen un dominio de dirección a opiáceos. Estas endopeptidasas redirigidas a opiáceos comprenden un dominio de dirección a opiáceos, un dominio de translocación de toxinas clostridiales y un dominio enzimático de la toxina Clostridial. Se describen ejemplos no limitantes de endopeptidasa redirigida a opiáceos u opiáceo-TVEMP, por ejemplo, en los documentos Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, Patente de los E.E.U.U. 5.989.545; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Patente de los E.E.U.U. 7.132.259; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de los E.E.U.U. 7.244.437; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de los E.E.U.U. 7.413.742; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de los E.E.U.U. 7.415.338; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Patente de los E.E.U.U. 7.514.088; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, publicación de patente de los E.E.U.U. 2008/0064092; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, publicación de patente de los E.E.U.U. 2009/0035822; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, publicación de patente de los E.E.U.U. 2009/0048431; Keith A. Foster, *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, publicación de patente de los E.E.U.U. 2009US/0162341; Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2005/023309; y Lance E. Steward, *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente WO 2008/008805. El documento WO 96/33273 A1 menciona un anticuerpo que reconoce el producto de la proteólisis del SNAP-25 por la cadena L de BoNT/A y reconoce el recién revelado extremo carboxi del SNAP-25 escindido y menciona la utilización del anticuerpo en un transferencia de Western de muestras de células PC-12 incubadas con 10 mg/ml de un conjugado de NGF y LH_N (Ejemplo 2). El documento U.S. 2004/0219619 A1 menciona un "anticuerpo anti-SNAP25197 (Zymed #1 antisuero) que sólo reconoce el producto SNAP25 escindido" (Ejemplo 9).

Una diferencia general entre endopeptidasas redirigidas y toxinas clostridiales es que dado que las endopeptidasas redirigidas típicamente no se dirigen a las neuronas motoras, la letalidad asociada con la sobredosis de un mamífero con una endopeptidasa redirigida se minimiza, si no se evita completamente. Por ejemplo, endopeptidasas redirigidas a opiáceos pueden ser administradas a 10.000 veces la dosis terapéuticamente eficaz antes de que se observe evidencia de letalidad, y esta letalidad es debida a la difusión pasiva de la molécula y no a través del proceso de intoxicación. Por lo tanto, para todos los propósitos prácticos, las endopeptidasas redirigidas son moléculas no letales. Aunque esta propiedad no letal es de gran beneficio terapéutico, surge un problema de fabricación porque el ensayo de actividad estándar utilizado para la fabricación de productos biológicos basados en la toxina Clostridium es un bioensayo DL₅₀ en ratón, una prueba de letalidad. S. S. Arnon y col., JAMA 285: 1059-1070 (2001). Actualmente un bioensayo DL₅₀ en ratón es utilizado por todos los fabricantes de productos farmacéuticos para expresar la potencia de sus preparaciones de toxinas clostridiales. De hecho, las unidades de actividad de las toxinas clostridiales son unidades de DL₅₀ en ratón. Sin embargo, dado que las endopeptidasas redirigidas son esencialmente no-letales, no puede utilizarse un bioensayo DL₅₀ en ratón para evaluar la potencia de estas moléculas. Así, un ensayo de actividad sencillo, fiable, validado y aceptable por la agencia gubernamental que pueda evaluar la integridad de todas las etapas necesarias en la absorción de endopeptidasa redirigida sería de gran valor.

La presente memoria descriptiva proporciona nuevas composiciones, células y métodos para evaluar la actividad de las endopeptidasas redirigidas útiles para diversas industrias, tales como: por ejemplo, la industria farmacéutica y alimentaria y proporciona ventajas relacionadas. Estas composiciones, células y métodos no utilizan animales vivos o tejidos de animales vivos, pero pueden evaluar todas las etapas necesarias para la acción de endopeptidasa redirigida.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra un diagrama esquemático del actual paradigma de la liberación de neurotransmisores e intoxicación por toxina de Clostridium en una neurona central y periférica. La figura 1A muestra un diagrama esquemático para el mecanismo de liberación del neurotransmisor de una neurona central y periférica. El proceso de liberación puede ser descrito como comprendiendo dos etapas: 1) acoplamiento vesicular, donde la proteína SNARE unida a vesícula de una vesícula que contiene moléculas neurotransmisoras se asocia con las proteínas SNARE unidas a membrana localizadas en la membrana plasmática; y 2) liberación de neurotransmisores, donde la vesícula se fusiona con la membrana plasmática y las moléculas del neurotransmisor son exocitadas. La figura 1B muestra un diagrama esquemático del mecanismo de intoxicación para actividad de toxina tetánica y botulínica en una neurona central y periférica. Este proceso de intoxicación puede ser descrito como compuesto por cuatro etapas: 1) unión al receptor, donde la toxina clostridial toxina se une a un receptor Clostridial complejo e inicia el proceso de intoxicación; 2) internalización del complejo, donde después de la unión a la toxina, una vesícula que contiene un complejo de toxina/sistema receptor se introduce por endocitosis en la célula; 3) translocación de cadena ligera, donde se cree que se producen múltiples eventos, incluidos los cambios en el pH interno de la vesícula, la formación de un poro del canal que comprende el dominio H_N de la cadena pesada de la toxina de Clostridium, separación de la cadena ligera de la toxina de Clostridium de la cadena pesada y la liberación de la cadena ligera y 4), modificación de la diana enzimática donde la cadena ligera de la toxina de Clostridium escinde proteolíticamente sus sustratos SNARE diana, tales como, por ejemplo, SNAP-25, VAMP o sintaxina, evitando de este modo el acoplamiento vesicular y la liberación de neurotransmisores.

La figura 2 muestra una respuesta dosis completa a la endopeptidasa redirigida Noc/A en la línea celular clonal ORL-1Clon #6 que sobreexpresa ORL-1. La captación específica de Noc/A puede observarse en la línea celular clonal ORL-1Clon #6 que sobreexpresa ORL-1. El tratamiento con Noc/A (variante de nociceptina de ligando de unión LHN/A plus) y LH_N/A (LC/A y HN sin ningún dominio de unión) realizada en la línea celular estable ORL-1 clon #6 en la prueba ELISA con ECL para SNAP-25₁₉₇ escindidos demostró que la captación de Noc/A es específica en esta línea celular clonal. La línea celular clonal también muestra gran sensibilidad por Noc/A con una CE₅₀ de 1,2 nM.

La figura 3 muestra una respuesta de la dosis completa de Noc/en los clones derivados de una única célula SK-N-DZ #3 y #22. La captación específica de Noc/A en clones SK-N-DZ #3 y #22 en comparación con LHN/A (n = 4 experimentos independientes). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de poli-D-lisina en RPMI SFM + N2 + B27 + NGF. El tratamiento con compuestos duró 22 horas. El ensayo ELISA con ECL para SNAP-25₁₉₇ escindido demostró que la captación de Noc/A es específica en esta línea celular clonal. Las líneas de células clonales también muestran gran sensibilidad por Noc/A con una CE₅₀ de 0,3 nM para el clon #3 y un Eco de 0,9 nM para el clon #22.

La figura 4 muestra los resultados de un ensayo ELISA con ECL en sándwich de clones 1C11, 4B7 y 4C9 de ORL1 CD7 tratados con endopeptidasa redirigida Noc/A. Los clones CD7 y ORL1 CD7 parentales fueron tratados durante 24 horas con Noc/A seguido de dos días de incubación. La CE₅₀ de ND7 parental no podía calcularse dado que sólo alcanzaba aproximadamente el 50% de escisión de SNAP-25₁₉₇. Los clones 4B7 y 1C11 alcanzan más del 80% de escisión de SNAP-25₁₉₇. Se calculó que los valores de CE50 eran de 5,7±0,5, 6,7±61 y 8,6±2 nM respectivamente.

La figura 5 muestra que anticuerpos policlonales anti-nociceptina pueden bloquear la captación de endopeptidasa redirigida Noc/a en las líneas celulares SK-N-DZ clon #3, clon #22, y AGN P33 ORL-1 clon #6. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de poli-D-lisina en RPMI SFM + N2 + B27 + NGF y se trataron durante 22 horas en medio libre de suero que contenía los anticuerpos policlonales anti-nociceptina a diferentes diluciones (0-3 µg/ml) en Noc/A 1 nM.

La figura 6 muestra que células del clon AF4 de SiMa y la línea celular establecida PC-12 fueron tratadas con la endopeptidasa redirigida Dyn/A a concentraciones de 0,017 nanómetros a 1 µM tal como se muestra en la imagen de transferencia de Western. Pudo observarse captación dependiente de la dosis para ambas líneas celulares.

La figura 7 muestra curvas BIAcore SPR normalizadas de 7,8 nM de los anticuerpos 2E2A6, 1D3B8, 3C1A5 y 2C9B10 y MC-6050 y MC-6053 comerciales. La figura 7A muestra los datos normalizados para la constante de asociación de cada anticuerpo. La figura 7B muestra los datos normalizados para la constante de disociación de cada anticuerpo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente memoria descriptiva proporciona novedosos ensayos para determinar la presencia o ausencia de una endopeptidasa redirigida activa en una muestra y para la determinación de la actividad/potencia de una endopeptidasa redirigida. Los novedosos ensayos basados en células divulgados en la presente memoria descriptiva dependen de las células, reactivos y métodos de detección que permiten al ensayo detectar cantidades nanomolares de endopeptidasa redirigida en una muestra. Los ensayos basados en células divulgados en la presente memoria descriptiva que incluye la invención reflejada en la reivindicaciones sirven para analizar múltiples funciones de una endopeptidasa redirigida, es decir, endopeptidasa redirigida que se une a un receptor de superficie celular, internalización del complejo endopeptidasa-receptor, la translocación del dominio enzimático en el citoplasma, escisión del dominio enzimático del sustrato. Tal como se explica más adelante, los novedosos métodos y composiciones pueden utilizarse para analizar muestras impuras y a granel así como endopeptidasas redirigidas bicatenarias altamente purificadas y productos de endopeptidasa redirigida formulados y además son adaptables a formatos de ensayo automatizado de alto rendimiento.

Por lo tanto, uno aspecto desvelado en la presente memoria descriptiva proporciona composiciones que inducen una respuesta inmunitaria para la producción de anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un epítipo que comprende un producto de escisión de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión BoNT/A. Las composiciones que inducen una respuesta inmunitaria pueden comprender un adyuvante y una composición que induce una respuesta inmunitaria que incluye un antígeno de SNAP-25, un portador enlazado a un antígeno de SNAP-25, o un portador enlazado a un espaciador flexible enlazado a un antígeno de SNAP - 25, donde el enlazador flexible está entre el antígeno de SNAP - 25 y el portador. Está previsto que todos y cada uno de los antígenos de SNAP-25 que desencadenan una respuesta inmunitaria que producen un anticuerpo α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede ser útil como un antígeno de SNAP-25, incluyendo, sin limitación, un antígeno de SNAP-25 derivado de un SNAP-25 de origen natural, un antígeno de SNAP-25 derivado de un SNAP-25 de origen no natural y un antígeno de SNAP - 25 que comprende un fragmento inmunorreactivo del SNAP-25, el SNAP-25 de un SNAP-25 de origen natural o un SNAP-25 de origen no natural. Los antígenos de SNAP-25 útiles para la producción de anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A incluyen, sin limitación, antígenos de SNAP-25 que comprenden un péptido de SNAP-25 que tiene una glutamina C-terminal carboxilada enlazada a un péptido portador, incluyendo, sin limitación SEQ ID NO: 38. Otras composiciones inductoras de respuesta inmunitaria útiles para preparar anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un epítipo SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A incluyen, sin limitación, una composición inductora de respuesta inmunitaria que comprende un portador enlazado a un enlazador flexible enlazado a un antígeno de SNAP-25, una glutamina C-terminal carboxilada, en la que el enlazador flexible se interpone entre el antígeno de SNAP-25 y el portador. Se prevé que todos y cada uno de los adyuvantes pueden ser útiles en dicha composición inductora de respuesta inmunitaria, incluyendo, sin limitación, polietilenglicol (PEG) monometoxipolietilenglicol (mPEG), alcohol polivinílico (PVA), adyuvante completo e incompleto de Freund.

Otro aspecto desvelado en la presente memoria descriptiva proporciona métodos para producir un anticuerpo α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un epítipo que comprende un producto de escisión de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Los aspectos de este método comprenden las etapas de (a) administrar a un animal una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 desvelada en la presente memoria descriptiva; (b) recoger del animal una muestra que contiene un anticuerpo α -SNAP-25 o una célula productora de anticuerpos α -SNAP-25; y (c) aislar el anticuerpo α -SNAP-25 de la muestra. Los métodos desvelados son útiles para preparar anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un epítipo que comprende un producto de escisión de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de

escisión de BoNT/A o anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un epítipo que comprende un producto de escisión de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

5 Otro aspecto más desvelado en la presente memoria descriptiva proporciona los anticuerpos α -SNAP-25, incluyendo según la invención, los anticuerpos que se unen selectivamente a un epítipo que comprende un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Dichos anticuerpos α -SNAP-25 incluyen anticuerpos tanto de origen natural como de origen no natural, así como anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 o anticuerpos policlonales α -SNAP-25. Los anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 útiles como anticuerpos α -SNAP-25 que se unen selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, incluyen, sin limitación, los anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 producidos a partir de líneas de células de hibridoma 3C3E2, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 1D3B8.

10 Otro aspecto más desvelado en la presente memoria descriptiva proporciona métodos de detección de actividad endopeptidasa redirigida basados en inmunología. Los aspectos de este método comprenden las etapas de (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende un endopeptidasa redirigida, en la que la célula de una línea celular establecida son susceptible a la actividad de endopeptidasa redirigida por la endopeptidasa redirigida; (b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; (c) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 desvelado en la presente memoria descriptiva; y (d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad de endopeptidasa redirigida. El anticuerpo α -SNAP-25 de la etapa (c) opcionalmente puede enlazarse a un soporte de fase sólida.

15 Otro aspecto más desvelado en la presente memoria descriptiva proporciona métodos de base inmunológica de detección de actividad opioide-TVEMP. Los aspectos de este método comprenden las etapas de (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende endopeptidasa redirigida, en la que la célula de una línea celular establecida puede captar una endopeptidasa redirigida; (b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; (c) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 desvelado en la presente memoria descriptiva; y (d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad de endopeptidasa redirigida. El anticuerpo α -SNAP-25 de la etapa (c) opcionalmente puede enlazarse a un soporte de fase sólida.

20 Un aspecto adicional desvelado en la presente memoria descriptiva proporciona métodos de determinación de la inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en un mamífero. Los aspectos de este método comprenden las etapas de (a) añadir una endopeptidasa redirigida a una muestra obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos α neutralizantes de endopeptidasa redirigida a; (b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra, en la que la célula de una línea celular establecida es susceptible a actividad de endopeptidasa redirigida; (c) aislar a partir de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; (d) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 desvelado en la presente memoria descriptiva; (e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; (f) repetir las etapas a-e con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de ensayo; y (g) comparar la cantidad del complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa (e) con la cantidad del complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa (f), en la que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa (e) con respecto a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectada en la etapa (f) es indicativa de la presencia de anticuerpos α neutralizantes de endopeptidasa redirigida. El anticuerpo α -SNAP-25 de la etapa (d) opcionalmente puede enlazarse a un soporte de fase sólida. La muestra de control en la etapa (f) también puede incluir una muestra control positivo, además de la muestra de control negativo.

25 Las toxinas de Clostridium producidas por *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium baratii* y *Clostridium butyricum* son las más ampliamente utilizados en tratamientos terapéuticos y cosméticos de seres humanos y otros mamíferos. Las cepas de *C. botulinum* producen siete serotipos antigénicamente distintos de toxinas botulínicas (BoNT), que han sido identificados por la investigación de brotes de botulismo en el hombre (BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E y BoNT/F), animales (BoNT/C1 y BoNT/D), o aislado del suelo (BoNT/G). Aunque los siete serotipos de toxina botulínica tienen estructura y propiedades biológicas similares, también cada uno muestra características heterogéneas, tales como: por

ejemplo, diferentes propiedades farmacológicas. En contraste, la toxina tetánica (TeNT) es producida por un grupo uniforme de *C. tetani*. Otras dos especies de Clostridios, *C. baratii* y *C. butyricum*, también producen toxinas similares a BoNT/F y BoNT/E, respectivamente.

5 Las toxinas clostridiales son traducidas, cada una, como un polipéptido de cadena sencilla de aproximadamente 150 kDa que es posteriormente dividido por escisión proteolítica dentro de un bucle disulfuro por una proteasa de origen natural, tal como, por ejemplo, una proteasa de toxina de Clostridium endógena o una proteasa de origen natural producida en el medio ambiente. Este procesamiento postraduccional produce una molécula bicatenaria formada por una cadena ligera de aproximadamente 50 kDa (LC) y una cadena pesada de aproximadamente 100 kDa (HC) que se mantienen unidas por un
10 único puente disulfuro e interacciones no covalentes. Cada molécula bicatenaria madura comprende tres dominios funcionalmente diferenciados: 1) un dominio enzimático localizado en la LC que incluye una región de metaloproteinasas que contiene una actividad endopeptidasa dependiente de zinc que está específicamente dirigida a componentes fundamentales del aparato de liberación del neurotransmisor; 2) un dominio de translocación contenido dentro de la mitad amino-terminal de la HC (H_N) que facilita la liberación de la LC de vesículas intracelulares en el citoplasma de la célula diana; y 3) un dominio de unión descubierto dentro de la mitad carboxilo-terminal de la HC (H_C) que determina la actividad de unión y la especificidad de unión de la toxina al complejo receptor ubicado en la superficie de la célula diana.

La unión, translocación y actividad enzimática de estos tres dominios funcionales son todos necesarios para la toxicidad. Aunque todos los detalles de este proceso no se conocen todavía con precisión, el mecanismo de intoxicación celular global mediante el cual las toxinas clostridiales entran en una neurona e inhiben la liberación de neurotransmisores es similar, independientemente del serotipo o subtipo. Aunque los solicitantes no tienen ningún deseo de quedar limitados por la siguiente descripción, el mecanismo de intoxicación puede ser descrito como que comprende como mínimo cuatro etapas: unión al receptor 1), 2) internalización del complejo, translocación de cadena ligera 3) y modificación de la diana enzimática 4) (figura 1). El proceso se inicia cuando el dominio HC de una toxina de Clostridium se une a un sistema receptor de específico de toxina ubicado en la superficie de la membrana plasmática de una célula diana. La especificidad de unión de un complejo receptor está pensada para conseguirse, en parte, mediante combinaciones específicas de los gangliósidos y receptores de proteínas que parecen comprender claramente cada complejo receptor de toxinas clostridiales. Una vez unido, los complejos toxina/receptor son internalizados por endocitosis y las vesículas internalizadas son clasificadas para las rutas intracelulares específicas. La etapa de translocación parece estar desencadenada por la acidificación del compartimento de la vesícula. Este proceso parece iniciar importantes reorganizaciones estructurales dependientes de pH que aumentan la hidrofobia, promueven la formación de poros y facilitan la separación de las cadenas pesadas y ligeras de la toxina. Una vez separadas, la endopeptidasa de cadena ligera de la toxina se libera de la vesícula intracelular en el citosol donde aparece dirigirse específicamente a componentes fundamentales del aparato de liberación del neurotransmisor. Estas proteínas fundamentales, proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP)/sinaptobrevina, proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa (SNAP-25) y sintaxina, son necesarias para el acoplamiento de la vesícula sináptica y la fusión en la terminación nerviosa y constituyen los miembros de la familia del receptor de la proteína de unión sensible a N-etilmaleimida soluble (SNARE). BoNT/A y BoNT/E escinden SNAP-25 en la región carboxilo terminal, liberando un fragmento de nueve o veintiséis aminoácidos, respectivamente, y BoNT/C1 también escinde a SNAP-25 cerca del extremo carboxilo liberando un fragmento de ocho aminoácidos. Los serotipos botulínicos BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F y BoNT/G y toxina tetánica, actúan sobre la parte central conservada de VAMP y liberar la parte amino terminal de VAMP en el citosol. BoNT/C1 escinde a sintaxina en un único sitio cerca de la superficie de la membrana citosólica. La proteólisis selectiva de SNARE sinápticas explica el bloque de liberación de neurotransmisores causado por las toxinas clostridiales in vivo. Las dianas de proteínas SNARE de toxinas clostridiales son comunes a la exocitosis en una variedad de tipos no neuronales; en estas células, al igual que en las neuronas, la actividad de peptidasa de cadena ligera inhibe la exocitosis, véase, por ejemplo, el documento de Yann Humeau y col., How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release, 82 (5) Biochimie. 427 - 446 (2000); Kathryn Turton y col., Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Structure, Function and Therapeutic Utility, 27 (11) Trends Biochem. Sci. 552 - 558. (2002); Giovanna Lalli y col., The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons, 11 (9) Trends Microbiol. 431 - 437, (2003).

50 Las endopeptidasas redirigidas generalmente sustituyen al sitio de escisión de proteasa del bucle bicatenario de origen natural por un sitio de escisión de proteasa exógena. Véase por ejemplo, Dolly, J.O. y col., Activatable Clostridial Toxins, patente de los E.E.U.U. 7.419.676. Aunque las endopeptidasas redirigidas varían en su peso molecular total debido al tamaño de la molécula directora, el proceso de activación y su dependencia de la escisión en el sitio de escisión exógeno para producir una molécula bicatenaria es esencialmente igual a la de toxinas clostridiales. Véase por ejemplo, Steward, L.E. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2009/0005313; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, Solicitud de patente de los E.E.U.U. 11/776.075; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0241881.

60 Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una composición inductora de respuesta inmunitaria para la

producción de anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "composición inductora de respuesta inmunitaria" se refiere a una composición que comprende un antígeno de SNAP-25 que, cuando se administra a un animal, estimula una respuesta inmunitaria contra el antígeno de SNAP-25, produciendo de este modo anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. La expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a cualquier respuesta por el sistema inmunitario de un animal a una composición inductora respuesta inmunitaria. Las respuestas inmunitarias ejemplares incluyen, aunque no se limitan a, inmunidad celular así como humoral local y sistémica, tales como: por ejemplo, Respuestas CTL, incluyendo la inducción específica de antígeno de CD8 + CTL, respuestas de células T auxiliares, incluyendo respuestas proliferativas del células T y liberación de citoquinas y las respuestas de células B incluyendo, por ejemplo, una respuesta que produce anticuerpos. La expresión "que induce una respuesta inmunitaria" se refiere a la administración de una composición inductora de respuesta inmunitaria o un polinucleótido que codifica la composición inductora de respuesta inmunitaria, donde una respuesta inmunitaria es afectada, es decir, estimulada, iniciada o inducida.

Una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a una molécula que desencadena una respuesta inmunitaria y que incluye, sin limitación, péptidos, polisacáridos y conjugados de lípidos, tales como: por ejemplo, lipoproteínas y glucolípidos. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "antígeno de SNAP-25" se refiere a cualquier antígeno que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A que puede provocar una respuesta inmunitaria. Un antígeno de SNAP-25 utilizado en una composición inductora de respuesta inmunitaria debe ser lo suficientemente grande como para ser sustancialmente único en secuencia, reduciendo de este modo la posibilidad de producir anticuerpos que sean reactivos de forma cruzada contra antígenos diferentes de SNAP-25. Además, un antígeno de SNAP-25 utilizado en una composición inductora de respuesta inmunitaria debe ser lo suficientemente pequeño para desencadenar solamente una respuesta inmunitaria sustancialmente contra un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, aumentando de este modo la posibilidad de producir anticuerpos α -SNAP-25 que pueden distinguir un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Además, también es muy deseable generar anticuerpos α -SNAP-25 de una única secuencia de aminoácidos con un buen rendimiento que sean selectivos de forma reproducible y que se unen con avidez aceptable para permitir el diseño de un ensayo altamente sensible.

La secuencia que rodea a un sitio de escisión de BoNT/A presente en SNAP-25 se indica como P₅-P₄-P₃-P₂-P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅', con P₁-P₁' representando el enlace escindible. Durante la escisión con endopeptidasa redirigida, los productos de escisión resultantes producidos comprenden un fragmento que incluye la secuencia P₅-P₄-P₃-P₂-P₁ y un fragmento que incluye la P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅'. De este modo, tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A" se refiere a cualquier SNAP-25 que tiene el residuo P₁ como su aminoácido carboxilo-terminal. Por ejemplo, Q₁₉₇-R₁₉₈ de SNAP-25 humano (SEQ ID NO: 5) representa el enlace escindible P₁-P₁' para el sitio de escisión de BoNT/A. Como tal, "SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo terminal del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A" sería cualquier producto de escisión de SNAP-25 que tiene una glutamina en su aminoácido carboxilo terminal donde la glutamina representa Q₁₉₇ del enlace escindible. Como otro ejemplo, K₂₀₄-H₂₀₅ de SNAP-25 de *Torpedo marmorata* (SEQ ID NO: 16) representa el enlace escindible P₁-P₁' para el sitio de escisión de BoNT/A. Como tal, "SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo terminal del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A" sería cualquier producto de escisión de SNAP-25 que tiene una lisina en su aminoácido carboxilo terminal donde la lisina representa K₂₀₄ del enlace escindible.

El antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A desde el sitio de escisión de BoNT/A puede ser modificado para mejorar la inmunogenia de un antígeno de SNAP-25, un hapteno, o cualquier otro compuesto antigénico es inmunógeno, no inmunógeno o débilmente inmunógeno cuando no se asocia a la modificación. En un aspecto de esta realización, el residuo P₁ carboxilo terminal residuos del enlace escindible de un antígeno de SNAP-25 pueden estar carboxilado. La carboxilación aumenta las propiedades inmunógenas deseadas de un antígeno de SNAP-25 en dos sentidos. En primer lugar, porque los aminoácidos cargados mejoran la inmunogenia, la adición de un grupo COO- al residuo carboxilo terminal aumentará la inmunogenia global de un antígeno de SNAP-25. En segundo lugar, porque el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A está en un estado cargado durante la escisión, la adición de un grupo COO- al residuo carboxilo terminal imitará mejor al antígeno real que los anticuerpos α -SNAP-25 desvelados en la presente memoria descriptiva que están diseñados para unirse selectivamente.

En un aspecto de esta realización, el residuo amino terminal de un antígeno de SNAP-25 puede modificarse mediante la adición de un aminoácido adaptado para fijar el antígeno de SNAP-25 a una proteína transportadora, tal como, por ejemplo, un hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina de

suero bovino (BSA), un inhibidor de la tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP). Por ejemplo, un residuo de cisteína puede colocarse en el extremo amino con el fin de conjugar la proteína portadora KLH.

Por lo tanto, una realización, un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener, por ejemplo, como mínimo 5, como mínimo 6, como mínimo 7, como mínimo 8, como mínimo 9, como mínimo 10, como mínimo 11, como mínimo 12, como mínimo 13, como mínimo 14, como mínimo 15, como mínimo 16, como mínimo 17, como mínimo 18, como mínimo 19, como mínimo 20, como mínimo 25 o como mínimo 30 aminoácidos de longitud. En otra realización, un antígeno de SNAP-25 tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener, por ejemplo, como máximo 5, como máximo 6, como máximo 7, 8 como máximo, como máximo 9, como máximo 10, como máximo 11, como máximo 12, como máximo 13, como máximo 14, como máximo 15, como máximo 16, como máximo 17, como máximo 18, como máximo 19, como máximo 20, como máximo 25 o como máximo 30 aminoácidos de longitud. En otra realización más, un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, puede tener por ejemplo, entre 7 - 12 aminoácidos, entre 10-15 aminoácidos, o entre 13-18 aminoácidos.

En otra realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 33. En los aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38 o la SEQ ID NO: 39. En una realización adicional, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 40.

En otra realización más, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 41. En aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45, la SEQ ID NO: 46. En una realización adicional, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 47.

Está previsto que todos y cada uno de los antígenos de SNAP-25 que desencadenan una respuesta inmunitaria que produce anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede ser útil como antígeno de SNAP-25. Por lo tanto, variantes de la secuencia de aminoácidos que comprenden la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46 pueden ser útiles como antígeno de SNAP-25 para desencadenar una respuesta inmunitaria que produce anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. De este modo, en una realización, un antígeno de SNAP-25 puede sustituir como mínimo 1, como mínimo 2, como mínimo 3, como mínimo 4 o como mínimo 5 sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos a los antígenos de SNAP-25 que comprenden la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38 la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46. En otra realización más, un antígeno de SNAP-25 puede tener como mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con los antígenos de SNAP-25 que comprenden la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46.

Se prevé que uno o más portadores podrían estar enlazados a un antígeno de SNAP-25 para mejorar la inmunogenia de un antígeno de SNAP-25 que es inmunógeno, no inmunógeno o débilmente inmunógeno cuando no está asociado con el portador. Los ejemplos no limitantes, incluyen por ejemplo, una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de la tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP). Tal como se conoce bien en la técnica, un antígeno no antigénico o débilmente antigénico puede hacerse antigénico acoplado el antígeno a un portador. Diversos otros portadores y métodos para acoplar un antígeno a un portador son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*, 1998a; Harlow y Lane, *supra*, 1998b; y David W. Waggoner, Jr. y col., *Immunogenicity-enhancing Carriers and compositions thereof and methods of using the same*, publicación patente de E.E.U.U. Nº 20040057958 (25 de marzo de 2004). También se pueden generar un epítipo expresando el epítipo como una proteína de fusión. Métodos para expresar las fusiones del polipéptido son bien conocidos por los expertos en la materia, tal como se describe, por ejemplo, en Ausubel y col. *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento 47), John Wiley & Sons, Nueva York (1999). Como el extremo carboxilo terminal del antígeno de SNAP-25 debe ser el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, un portador debe estar enlazado al extremo amino del antígeno de SNAP-25.

Se prevé que uno o más espaciadores flexibles puedan estar enlazados a un antígeno de SNAP-25 con el fin de mejorar la inmunogenia de un antígeno de SNAP-25 que es inmunógeno, no inmunógeno o débilmente inmunógeno cuando no está asociado con los enlazadores flexibles. Un espaciador flexible aumenta la longitud peptídica total del antígeno de SNAP-25 y proporciona flexibilidad, facilitando la adecuada presentación del antígeno de SNAP-25 a las células inmunitarias. Como un ejemplo no limitante, una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 puede comprender un antígeno de SNAP-25 enlazado a uno o más espaciadores flexibles en tándem para presentar mejor el antígeno de SNAP-25 a las células inmunitarias, facilitando así la respuesta inmunitaria.

Un espacio flexible que comprende un péptido tiene como mínimo un aminoácido de longitud y comprende aminoácidos no cargados con grupos R de cadena lateral pequeña, tales como: por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina o serina. De este modo, en una realización un espaciador flexible puede tener, por ejemplo, como mínimo 1, como mínimo 2, como mínimo 3, como mínimo 4, como mínimo 5, como mínimo 6, como mínimo 7, como mínimo 8, como mínimo 9 o como mínimo 10 aminoácidos de longitud. En otra realización, un espaciador flexible puede tener, por ejemplo, como mínimo 1, como máximo 3, como máximo 4, como máximo 5, como máximo 6, como máximo 7, como máximo 8, como máximo 9 o como máximo 10 aminoácidos de longitud. En otra realización más, un espaciador flexible puede tener, por ejemplo, entre 1-3 aminoácidos, entre 2-4 aminoácidos, entre 3-5 aminoácidos, entre 4-6 aminoácidos o entre 5-7 aminoácidos. Los ejemplos no limitantes de un espaciador flexible, por ejemplo, un espaciador G tal como GGG, GGGG (SEQ ID NO: 57) y GGGGS (SEQ ID NO: 58) o un espaciador A como AAA, AAAA (SEQ ID NO: 59) y AAAAV (SEQ ID NO: 60). Un espaciador flexible está enlazado en marco al antígeno de SNAP-25 como una proteína de fusión.

Tal como se ha descrito anteriormente, un espaciador flexible se utiliza, en parte, para aumentar la longitud total del péptido del antígeno de SNAP-25. Por ejemplo, un antígeno de SNAP-25 de 5-10 aminoácidos puede tener su longitud total incrementada enlazando un espacio flexible de 3-5 aminoácidos al extremo amino del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno de SNAP-25 de 5-10 aminoácidos puede tener su longitud total incrementada enlazando un espacio flexible de 4-6 del aminoácidos al extremo amino del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno de SNAP-25 de 5-10 aminoácidos puede tener su longitud total incrementada enlazando un espacio flexible de 7 a 10 aminoácidos al extremo amino del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno de SNAP-25 de 7-12 aminoácidos puede tener su longitud total incrementada enlazando un espacio flexible de 1 a 3 aminoácidos al extremo amino del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno de SNAP-25 de 7-12 aminoácidos puede tener su longitud total incrementada enlazando un espacio flexible de 4-6 aminoácidos al extremo amino del antígeno de SNAP-25. La mayor longitud proporcionada por el espaciador flexible permite la selección de un antígeno de SNAP-25 tamaño pequeño, lo que aumenta la probabilidad de que el antígeno de SNAP-25 sólo desencadenará una respuesta inmunitaria substancialmente contra un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ de enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, aumentando así la posibilidad de producir anticuerpos α -SNAP-25 que pueden distinguir un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

Se prevé que una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 desvelada en la presente memoria descriptiva opcionalmente puede comprender un antígeno de SNAP-25 desvelado en la presente memoria descriptiva y uno o más adyuvantes. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "adyuvante" cuando se utiliza en referencia a una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 se refiere a cualquier sustancia o mezcla de sustancias que aumenta o diversifica la respuesta inmunitaria a un antígeno de SNAP-25. Un adyuvante inductor de respuesta inmunitaria puede, por ejemplo, servir para reducir el número de inmunizaciones o la cantidad de antígeno necesaria para la inmunización protectora. La utilización de los adyuvantes inductores de respuesta inmunitaria en una composición inductora respuesta inmunitaria es bien conocida. El objetivo principal de estos adyuvantes es permitir un aumento en la respuesta inmunitaria. Los adyuvantes no limitantes incluyen, por ejemplo, liposomas, fases oleosas, incluyendo, sin limitación, el tipo de Freund de adyuvantes, tales como: por ejemplo, Adyuvante completo de Freund (FCA); Adyuvante incompleto de Freund (FIA); saponina glucósidos, tales como: por ejemplo, saponinas; Carbopol; N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (comúnmente conocida como Muramil dipéptido o "MDP"); y lipopolisacárido (LPS). Dichos adyuvantes son utilizados generalmente en forma de una emulsión con una fase acuosa o, más comúnmente, pueden consistir de sales inorgánicas insolubles en agua. Estas sales inorgánicas pueden consistir, por ejemplo, de hidróxido de aluminio, sulfato de zinc, hidróxido de hierro coloidal, fosfato de calcio o cloruro de calcio. El hidróxido de aluminio (Al (OH)₃) es un coadyuvante utilizado habitualmente. En la actualidad, el único adyuvante aprobado por la FDA-para utilización en seres humanos es sales de aluminio (alumbre) que se utilizan para los antígenos de "depósito" mediante la precipitación de los antígenos. Los adyuvantes proporcionados anteriormente son meramente ejemplares. De hecho, cualquier adyuvante inductor de respuesta inmunitaria puede utilizarse en una composición inductora de respuesta inmunitaria desvelada en la presente memoria descriptiva mientras el adyuvante cumpla las características necesarias para inducir una respuesta inmunitaria.

Un portador desvelado en la presente memoria descriptiva también puede actuar como adyuvante. Los adyuvantes y métodos específicos de fabricación y utilización se describirán en, por ejemplo, Gupta y col., Vaccine 11: 993-306, 1993;

AMON, R. (Ed.) *Synthetic Vaccines 1*: 83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987; y David W. Waggoner, Jr. y col., *Immunogenicity-Enhancing Carriers and Compositions Thereof and Methods of Using the Same*, publicación patente de E.E.U.U. Nº 20040057958 (25 de marzo de 2004). Los adyuvantes adicionales incluyen cualquier compuesto descrito en el capítulo 7 (págs 141-227) del documento "Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach" (eds. Powell, M. F. y Newman, J. M.) *Pharmaceutical Biotechnology*, volumen 6, Plenum Press (Nueva York). Los ejemplos de este compendio incluyen Muramil dipéptido (MDP) y Montanide 720. Moléculas tales como Poliinosina:Citosina (Poli me: C) o ADN plasmídico que contiene motivos CpG también puede administrarse como adyuvantes en combinación con antígenos encapsulados en micropartículas. En otro ejemplo, el adyuvante es un agente que facilita la entrada del complejo antigénico en el citoplasma de una célula, tal como listeriolisina, estreptolisina o una mezcla de los mismos.

De este modo, en una realización, una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo terminal carboxilada enlazada a un péptido portador. En aspectos de esta realización, un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo terminal carboxilada comprende la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38 o la SEQ ID NO: 39. En otro aspecto de esta realización, un antígeno de SNAP-25 comprende la SEQ ID NO: 40. En aspectos de esta realización, el péptido portador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de la tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP).

En otra realización, una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo terminal carboxilada enlazada a un péptido portador. En aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo terminal carboxilada comprende la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46. En otro aspecto de esta realización, un antígeno de SNAP-25 comprende la SEQ ID NO: 47. En aspectos de esta realización, el péptido portador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de la tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP).

En otra realización, una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina C-terminal carboxilada enlazada a uno o más enlazadores flexibles y un péptido portador en el que los enlazadores flexibles se interponen entre el antígeno de SNAP-25 y el péptido portador. En aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo terminal carboxilada comprende la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38 o la SEQ ID NO: 39. En otra realización, un antígeno de SNAP-25 comprende la SEQ ID NO: 46. En aspectos de esta realización, el péptido portador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de la tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP). En aspectos de esta realización, el enlazador flexible es un espaciador G o un espaciador A.

En otra realización más, una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una lisina c-terminal carboxilada enlazada a un enlazador flexible y un péptido portador en el que el enlazador flexible se interpone entre el antígeno de SNAP-25 y el péptido portador. En aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo terminal carboxilada comprende la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46. En otro aspecto de esta realización, un antígeno de SNAP-25 comprende la SEQ ID NO: 47. En aspectos de esta realización, el péptido portador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de la tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP). En aspectos de esta realización, el enlazador flexible es un espaciador G o un espaciador A.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un método para producir anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede producirse mediante muy diversos métodos que son bien conocidos en la técnica. Protocolos específicos para preparar y utilizar los anticuerpos así como para detectar y medir la especificidad de unión del anticuerpo, afinidad de unión y avidéz de unión son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow y David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1998a); y USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL: PORTABLE PROTOCOL n° I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998b); Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2001; and Current Protocols in Molecular Biology, 2004; David Anderson y col., *Therapeutic Polypeptides, Nucleic Acids Encoding Same, and Methods of Use*, Patente de los E.E.U.U. 7.034.132 (25 de abril de 2005); y Beatriz M. Carreño y col., *Antibodies Against CTLA4*, Patente de los E.E.U.U. 7.034.121 (25 de abril de 2006).

Como un ejemplo no limitante, anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que se unen selectivamente a un SNAP-25 que tiene

un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A pueden producirse inyectando a un animal, tal como: por ejemplo, un conejo, una cabra, un ratón u otro mamífero, con una o más inyecciones de una composición inductora de respuesta inmunitaria desvelada en la presente memoria descriptiva. Como otro ejemplo no limitante, anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que se unen selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede producirse inyectando a un huevo, tal como: por ejemplo, un huevo de gallina, con una o más inyecciones de una composición inductora de respuesta inmunitaria desvelada en la presente memoria descriptiva. El título de anticuerpos en el animal inmunizado puede monitorizarse a lo largo del tiempo mediante técnicas estándar, tales como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando antígeno inmovilizado o un ensayo basado en la actividad de la célula. Si se desea, los anticuerpos policlonales para un anticuerpo α -SNAP-25 que se una selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A pueden aislarse los mamíferos (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas conocidas, como la cromatografía por afinidad a proteína A para obtener la fracción IgG, o purificación por afinidad contra el péptido utilizado para producir los anticuerpos.

Como otro no ejemplo limitante, el anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede producirse utilizando un método de hibridoma. Por ejemplo, ver el capítulo 6 del documento Monoclonal Antibodies, págs. 196 244, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; y el capítulo 7 del documento Growing Hybridomas, págs. 245 - 282, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; y Delta, págs. 59 - 103, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986). En este método, un animal huésped, tal como, por ejemplo, un ratón, un hámster u otro animal huésped apropiado, es típicamente expuesto a una o varias inyecciones de un antígeno de SNAP-25 desvelado en la presente memoria descriptiva para activar a los linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos α -SNAP-25 que se unirán específicamente a un SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. El título de anticuerpos en el animal inmunizado puede monitorizarse a lo largo del tiempo mediante técnicas estándar, tales como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando antígeno inmovilizado o un ensayo basado en actividad celular. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro* utilizando una línea de cultivo celular adecuada. En el momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos son más altos, células productoras de anticuerpos se aíslan del animal. En general, se utilizan linfocitos de sangre periférica, si se desean células de origen humano, o se utilizan células del bazo o células de los ganglios linfáticos, si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Las células productoras de anticuerpos aisladas se fusionan con una línea celular inmortal utilizando un agente fusión conveniente, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Las líneas celulares inmortalizadas son generalmente células de mamíferos transformadas, particularmente células de mieloma de origen bovino, roedor y humano. Por lo general, una línea celular de mieloma murino se fusiona con esplenocitos recogidos de un ratón apropiadamente inmunizado para producir los hibridomas. Las líneas celulares inmortales preferidas: son líneas de células de mieloma de ratón que son sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Cualquiera de una serie de líneas celulares de mieloma puede utilizarse como un socio de fusión según las técnicas estándar, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x 63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan entonces utilizando medio HAT, que mata las células del mieloma no fusionadas y fusionadas de forma improductiva (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días en el cultivo porque no se transforman). El medio de cultivo en el que las células del hibridoma se cultivan pueden ensayarse entonces para la presencia de anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 que se unen selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Por ejemplo, pueden cribarse sobrenadantes de hibridoma utilizando medios positivos α -SNAP-25 en un ensayo de inmunoprecipitación, ensayo de unión *in vitro*, tal como, por ejemplo, un radioinmunoensayo (RIA) un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) o en un ensayo basado en la actividad celular. Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase el capítulo 11 del Immunoblotting, págs. 421 - 470, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; el Capítulo 12 del documento Immunoblotting, págs. 471 - 510, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; el Capítulo 14 del documento immunoassays, págs. 553 - 612, Harlow & Lane, *supra*, 1998a. Estudios adicionales pueden hacerse a continuación para determinar si el anticuerpo también es no reactivo con un SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. También se puede determinar la afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard. Véase, por ejemplo, Peter J. Munson y David Rodbard, ligando: A Versatile Computerized Approach For Characterization of Ligand- Binding Systems, 107 (1) Anal. Biochem. 220 - 239 (1980). Después de que las células de hibridoma deseadas se identifican, se utilizan procedimientos de dilución limitante para aislar clones procedentes de una sola célula hasta obtener una línea celular clonal que expresa el anticuerpo monoclonal deseado. Aquellos anticuerpos suficientemente selectivos para un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A y que se unen con avidez suficientemente alta son elegidos para estudio y caracterización adicionales.

Otra alternativa para la preparación de un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A es cribando una

biblioteca combinatoria recombinante de la inmunoglobulina, tal como: por ejemplo, un biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos, con un péptido de SNAP-25 y miembros de la biblioteca de inmunoglobulina aislados que se unen a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Kits para la generación y el cribado de bibliotecas de presentación en fagos están disponibles en el mercado, tales como, por ejemplo el Recombinant Phage Antibody System (Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ); y el SurfZAP™ Phage Display Kit (Stratagene, La Jolla, California). Además, pueden encontrarse ejemplos de métodos y útiles en la generación y cribado de biblioteca de presentación de anticuerpos reactivos en, por ejemplo, los documentos Ladner y col patentes de Estados Unidos 5.223.409; Borrebaeck y col patente de E.E.U.U 5.712.089; Griffiths y col. patente de E.E.U.U 5.885.793; Griffiths y col. patente de E.E.U.U 5.962.255; McCafferty y col patente de E.E.U.U 5.969.108; Griffiths y col. patente de E.E.U.U 6.010.884; Jespers y col patente de E.E.U.U 6.017.732; Borrebaeck y col patente de E.E.U.U 6.027.930; Johnson y col patente de E.E.U.U 6.140.471; McCafferty y col patente de E.E.U.U 6.172.197.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, recoger una muestra que contiene un anticuerpo α -SNAP-25 o células productoras de anticuerpos α -SNAP-25. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "muestra que contiene un anticuerpo α -SNAP-25 o células productoras de anticuerpos α -SNAP-25" se refiere a cualquier sustancia biológica que contiene o contiene potencialmente como mínimo un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Se prevé que todas y cada una de las muestras que pueden contener un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede utilizarse en este método, incluyendo, sin limitación, sangre, plasma, suero y fluido linfático. También se prevé que cualquier célula capaz de producir un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede utilizarse en este método, incluyendo, sin limitación, células CD8, una célula CTL, una célula T auxiliar y una célula B. Diversos métodos bien conocidos pueden ser utilizados para recoger de un individuo una muestra que contiene el anticuerpo α -SNAP-25 o células productoras de anticuerpos α -SNAP-25, véase, por ejemplo, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; y Harlow & Lane, *supra*, 1998b. Del mismo modo, pueden utilizarse diversos métodos bien conocidos para procesar una muestra para aislar un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Un procedimiento para la recogida de una muestra puede seleccionarse en función del tipo de anticuerpo a aislar. Como un ejemplo no limitante, cuando se aísla un anticuerpo policlonal α -SNAP-25 que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, una muestra adecuada puede ser una muestra de sangre que contienen tales anticuerpos α -SNAP-25, mientras que cuando se aísla un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, una muestra adecuada puede ser una célula productora de anticuerpos α -SNAP-25 como una célula del bazo o hibridoma.

Los aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, aislar un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de la muestra. Métodos de aislar un dicho anticuerpo α -SNAP-25, tales como: por ejemplo, los anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que se unen selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A o anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 que se unen selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A son bien conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*, 1998a; y Harlow y Lane, *supra*, 1998b. Por ejemplo, dichos anticuerpos policlonales α -SNAP-25 pueden ser aislados de la muestra mediante técnicas conocidas, tales como, por ejemplo, cromatografía por afinidad utilizando la proteína A o proteína G, que proporcionan principalmente la fracción IgG del suero inmunitario. Posteriormente, o como alternativa, un antígeno específico de SNAP-25 puede ser inmovilizado en una columna o perlas magnéticas para purificar los anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que se unen selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A mediante cromatografía por inmovilización. Un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede ser aislado del medio de cultivo o líquido ascítico mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxipatita, cromatografía por afinidad, diálisis o electroforesis en gel.

De este modo, en una realización, un método de producir un anticuerpo α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende las etapas (a) administrar a un animal una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 que comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina c-terminal carboxilada enlazada a un péptido portador; (b) recoger del animal una muestra que contiene un anticuerpo α -SNAP-25 o una célula productora de anticuerpos α -SNAP-25; y (c) aislar el componente del anticuerpo α -SNAP-25 de la muestra. En un aspecto de esta realización, el anticuerpo α -SNAP-25 que

puede unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A es un anticuerpo policlonal. En otro aspecto de esta realización, el anticuerpo α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A es un anticuerpo monoclonal. En otro aspecto de esta realización, un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A producido es un subtipo de IgG. En otros aspectos de esta realización, la composición que induce una respuesta inmunitaria de SNAP-25 comprende además un adyuvante, tal como: por ejemplo, Polietilenglicol (PEG), monometoxipolietilenglicol (mPEG) o alcohol polivinílico (PVA).

En otra realización, un método para producir anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende las etapas (a) administrar a un animal una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 que comprende un péptido de SNAP-25 que tiene una glutamina c-terminal carboxilada enlazada a un enlazador flexible y un péptido portador en el que el enlazador flexible se interpone entre el péptido de SNAP-25 y el péptido portador; (b) recoger del animal una muestra que contiene un anticuerpo α -SNAP-25 o células productoras de anticuerpos α -SNAP-25; y (c) aislar el anticuerpo α -SNAP-25 de la muestra. En un aspecto de esta realización, los anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A es un anticuerpo policlonal. En otro aspecto de esta realización, el anticuerpo α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A es un anticuerpo monoclonal. En otro aspecto de esta realización, el anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A producido en un subtipo de IgG. En otros aspectos de esta realización, composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 comprende además un adyuvante, tal como: por ejemplo, Polietilenglicol (PEG), monometoxipolietilenglicol (mPEG) o alcohol polivinílico (PVA).

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un anticuerpo α -SNAP-25 aislado, que incluye un anticuerpo según la invención, que se un selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula generada por un sistema inmunitario que se preparó en respuesta a un antígeno particular que se une específicamente a ese antígeno e incluye tanto anticuerpos de origen natural como anticuerpos de origen no natural. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aislar" se refiere a separar una molécula de su ambiente natural mediante la utilización de la intervención humana. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un dímero, un multímero, un anticuerpo multispecífico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, anticuerpo bifuncional, un anticuerpo asociado a una célula como un receptor de Ig, un anticuerpo lineal, un dímero o un minicuerpo, mientras el fragmento exhiba la actividad biológica deseada y derivados de cadena sencilla de la misma. Un anticuerpo puede ser una molécula de inmunoglobulina de longitud completa que comprende los dominios V_H y V_L, así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y los dominios constantes de cadena pesada, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}, o un fragmento inmunológicamente activo de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, tal como: por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fc, un fragmento Fd, un fragmento Fv. Un anticuerpo puede obtenerse de cualquier especie de vertebrados (por ejemplo, ser humano, cabra, caballo, burro, ratón, rata, conejo o pollo) y puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) o subclase (IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). Para divulgación general sobre la estructura de anticuerpos de origen natural, anticuerpos de origen no natural y fragmentos de unión a un compuesto antigénico, véase, por ejemplo, Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994); Borrabeck, *Antibody Engineering*, 2ª ed. (Oxford University Press, 1995).

Los Anticuerpos de origen natural generalmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas de (H). Cada cadena ligera está enlazada a una cadena pesada por un puente disulfuro covalente, mientras que el número de puentes disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios equidistantes. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios de cadena ligera y de cadena pesada variables.

El sitio de completo reconocimiento del antígeno y de unión del antígeno está contenido dentro de los dominios variables del anticuerpo, es decir, el fragmento Fv. Este fragmento incluye un dímero de un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) en asociación estrecha, no-covalente. Cada dominio comprende de cuatro

regiones marco (FR), que en gran medida adoptan una configuración de lámina β , conectados por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman, la estructura de la lámina β . Cada región hipervariable comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región determinante de complementariedad (CDR). Colectivamente, es la configuración tridimensional de las seis regiones CDR la que define un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L que confiere especificidad de unión del antígeno. Véase por ejemplo, Cyrus Chothia, y col., Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions, *Nature* 342(6252): 877-883 (1989); Elvin A. Kabat, y col. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. (1991). Los dominios constantes del anticuerpo no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Un antígeno diana general tiene uno o más sitios de unión, también llamados epítomos, que son reconocidos por el sitio de unión al antígeno formado en CDR. Tal como se utiliza en el presente documento, un "epítomo" es sinónimo de "determinante antigénico" y se refiere al sitio de un antígeno diana, tal como, por ejemplo, un péptido, polisacárido o molécula que contienen lípidos, capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de células T o de interactuar de otra manera con una molécula. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítomo diferente tiene una estructura diferente. Por lo tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente.

Anticuerpos policlonales se refieren a una población heterogénea de moléculas de anticuerpo que contienen como mínimo dos especies de anticuerpos capaces de unirse a un antígeno particular. Por definición, un anticuerpo policlonal incluye dos anticuerpos diferentes que se unen a como mínimo dos epítomos diferentes. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" o "anticuerpos monoclonales" se refieren a una población sustancialmente homogénea de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie de anticuerpos capaces de unirse a un antígeno particular, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades secundarias. Por definición, un anticuerpo monoclonal se une a un único epítomo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con los anticuerpos policlonales, cada anticuerpo monoclonal es dirigido contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que ellos pueden ser sintetizados sin contaminar por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población substancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que requiere la producción de anticuerpos por cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán según la presente divulgación podrán prepararse mediante el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y col (1975) *Nature* 256: 495, o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo: La Patente de E.E.U.U. N° 4.816.567; Patente de E.E.U.U. N° 5.807.715). Los anticuerpos monoclonales también pueden ser aislados de bibliotecas de anticuerpos fago utilizando las técnicas descritas en Clackson y col (1991) *Nature*, 352:624 - 628; Marks y col (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581 - 597; por ejemplo.

De este modo, en una realización, un anticuerpo α -SNAP-25 comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de unión de BoNT/A. En un aspecto de esta realización, el dominio variable de cadena pesada (V_H) es la SEQ ID NO: 72, la SEQ ID NO: 74, la SEQ ID NO: 76, la SEQ ID NO: 80, la SEQ ID NO: 82 o la SEQ ID NO: 133. En otro aspecto de esta realización, el dominio variable de cadena ligera (V_L) es la SEQ ID NO: 84, la SEQ ID NO: 86, la SEQ ID NO: 88, la SEQ ID NO: 90 o la SEQ ID NO: 92.

En otra realización, una secuencia de ácido nucleico codifica un anticuerpo α -SNAP-25, incluyendo un anticuerpo de la invención según lo definido por las reclamaciones, que comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. En un aspecto de esta realización, el dominio variable de cadena pesada (V_H) está codificado por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81 o SEQ ID NO: 132. En otro aspecto de esta realización, el dominio variable de cadena pesada (V_H) está codificada por una secuencia de ácido nucleico que es como mínimo el 70% idéntica, como mínimo el 75% idéntica, como mínimo el 80% idéntica, como mínimo el 85% idéntica, como mínimo el 90% idéntica, como mínimo el 95% idéntica, como mínimo el 96% idéntica, como mínimo el 97% idéntica, como mínimo el 98% idéntica o como mínimo el 99% idéntica a la SEQ ID NO: 71, la SEQ ID NO: 73, la SEQ ID NO: 75, la SEQ ID NO: 77, la SEQ ID NO: 79, la SEQ ID NO: 81 o la SEQ ID NO: 132. En otro aspecto de esta realización, el dominio variable de cadena ligera (V_L) está codificado por la SEQ ID NO: 83, la SEQ ID NO: 85, la SEQ ID NO: 87, la SEQ ID NO: 89 o la SEQ ID NO: 91. En otro aspecto de esta realización, el dominio variable de cadena ligera (V_L) está codificado por una secuencia de ácido nucleico que es como mínimo el 70% idéntica, como mínimo el 75% idéntica, como mínimo el 80% idéntica, como mínimo el 85% idéntica, como mínimo el 90% idéntica, como mínimo el 95% idéntica, como mínimo el 96% idéntica, como mínimo el 97% idéntica, como mínimo el 98% idéntica o como mínimo el 99% idéntica a la SEQ ID NO: 83, la SEQ ID NO: 85, la SEQ ID

NO: 87, la SEQ ID NO: 89 o la SEQ ID NO: 91.

5 En otra realización, un anticuerpo α -SNAP-25 comprende una región CDR1, región CDR2, región CDR3 o cualquier combinación de éstas de dominio variable de cadena pesada (V_H) que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. En un aspecto de esta realización, la región CDR1 del dominio variable de cadena pesada (V_H) es la SEQ ID NO: 93, la SEQ ID NO: 94, la SEQ ID NO: 95, la SEQ ID NO: 118, la SEQ ID NO: 119 o la SEQ ID NO: 120. En otro aspecto de esta realización, la región CDR2 del dominio variable de cadena pesada (V_H) es la SEQ ID NO: 96, la SEQ ID NO: 97, la SEQ ID NO: 98, la SEQ ID NO: 99, la SEQ ID NO: 121, la SEQ ID NO: 122 o la SEQ ID NO: 123. En otro aspecto de esta realización, la región CDR3 del dominio variable de cadena pesada (V_H) es la SEQ ID NO: 100, la SEQ ID NO: 101, la SEQ ID NO: 102, la SEQ ID NO: 124, la SEQ ID NO: 134 o la SEQ ID NO: 135.

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

25 En otra realización, un anticuerpo α -SNAP-25 se une específicamente a un epítipo que comprende un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. En un aspecto de esta realización, el epítipo comprende la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36 o la SEQ ID NO: 37. En un aspecto de esta realización, el epítipo comprende la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43 o la SEQ ID NO: 44.

30 Tal como se ha descrito anteriormente, la secuencia que rodea a un sitio de escisión de BoNT/A presente en SNAP-25 se denota como P_5 - P_4 - P_3 - P_2 - P_1 - P_{-1} - P_{-2} - P_{-3} - P_{-4} - P_{-5} , con P_1 - P_{-1} representando el enlace escindible. Durante la escisión de BoNT/A, los productos de escisión resultantes producidos comprenden un fragmento que incluye la secuencia P_5 - P_4 - P_3 - P_2 - P_1 y un fragmento que incluyen la secuencia P_{-1} - P_{-2} - P_{-3} - P_{-4} - P_{-5} . Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "anticuerpos α -SNAP-25 que se unen selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A" se refiere a un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a cualquier fragmento del producto de escisión de SNAP-25 compuesto por la secuencia P_5 - P_4 - P_3 - P_2 - P_1 , pero no a cualquier fragmento del producto de escisión de SNAP-25 compuesto por la secuencia P_{-1} - P_{-2} - P_{-3} - P_{-4} - P_{-5} o a cualquier SNAP-25 que tiene un enlace escindible P_1 - P_{-1} intacto de un sitio de escisión de BoNT/A. Tal como se utiliza en el presente documento, La expresión "un anticuerpo α -SNAP-25197" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un residuo P_1 en el extremo carboxilo que corresponde a la glutamina 197 de SEQ ID NO: 5. tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpos α -SNAP-25204" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente a un SNAP-25 teniendo un residuo P_1 en el extremo carboxilo que corresponde a la lisina 204 de la SEQ ID NO: 16.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "selectivamente" se refiere a tener un efecto único o influencia o reaccionar de una sola manera o con una sola cosa. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "se une selectivamente", o "unión selectiva" cuando se emplea en referencia a un anticuerpo, se refiere a la unión discriminatoria del anticuerpo al epítipo diana indicado de modo que el anticuerpo no reaccione de forma cruzada substancialmente con epítopos no diana. El tamaño mínimo de un epítipo peptídico, tal como se define en el presente documento, es aproximadamente cinco aminoácidos, y un epítipo peptídico típicamente comprende como mínimo 5, como mínimo 6, como mínimo 7, como mínimo 8, como mínimo 9, como mínimo 10, como mínimo 15 o como mínimo 20 aminoácidos. Un epítipo peptídico puede ser discontinuo, es decir, comprende residuos de aminoácidos que no son adyacentes en la estructura primaria del péptido sino que se reúnen en un epítipo a través de la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria del péptido. Además, también se observa que un epítipo podría comprender una parte de una molécula que no sea una secuencia de aminoácidos, como, por ejemplo, un grupo de hidratos de carbono, un resto lipídico como lipoproteínas o glucolípidos o un resto de aminoácidos modificados químicamente como un aminoácido fosforilado. En aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A que comprende como mínimo 5, como mínimo 6, como mínimo 7, como mínimo 8, como mínimo 9, como mínimo 10, como mínimo 15 o como mínimo 20 aminoácidos. En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se una

selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A que comprende como máximo 5, como máximo 6, como máximo 7, como máximo 8, como máximo 9, como máximo 10, como máximo 15 o como máximo 20 aminoácidos.

5

Unión selectiva incluye propiedades de unión tales como, por ejemplo, afinidad de unión, especificidad de unión y avidez de unión. Véase David J. King, *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies*, págs. 240 (1998). La afinidad de unión se refiere al periodo de tiempo que los anticuerpos residen en su sitio de unión al epítipo y puede considerarse como la fuerza con la que un anticuerpo une su epítipo. La afinidad de unión puede describirse como la constante de disociación de en equilibrio de un anticuerpo (KD), que se define como la relación Kd/Ka en equilibrio. Donde Ka es la constante de velocidad de asociación del anticuerpo y kd es la constante de velocidad de disociación del anticuerpo. La afinidad de unión se determina por la asociación y la disociación y en solitario ni una asociación alta o una baja disociación puede asegurar alta afinidad. La constante de velocidad de asociación (Ka), o constante de asociación (Kon), mide el número de eventos de unión por unidad de tiempo, o la propensión de los anticuerpos y los antígenos a asociarse de forma reversible en su complejo antígeno-anticuerpo. La constante de velocidad de asociación se expresa en M⁻¹ s⁻¹ y se simboliza como sigue: [Ab] x [Ag] x Kon. Cuanto mayor sea la constante de velocidad de asociación, más rápidamente se une el anticuerpo a su antígeno, o mayor será la afinidad de unión entre el antígeno y el anticuerpo. La constante de velocidad de disociación (Kd) o constante de disociación (Koff), mide el número de eventos de disociación por unidad de tiempo o la propensión de un complejo antígeno-anticuerpo a separarse (disociarse) de forma reversible en sus componentes moleculares, es decir el anticuerpo y el antígeno. La constante de velocidad de disociación se expresa en s⁻¹ y se simboliza como sigue: [Ab + Ag] x Koff. Cuanto menor sea la constante de velocidad de disociación, más fuertemente unido está el anticuerpo a su antígeno, o mayor será la afinidad de unión entre el antígeno y anticuerpo. La constante de disociación en equilibrio (KD) mide la velocidad a la cual se formaron nuevos complejos antígeno-anticuerpo es igual a la velocidad a la que los complejos anticuerpo-antígeno se disocian en equilibrio. La constante de disociación en equilibrio se expresa en M y se define como Koff/Kon = [Ab] x [Ag]/[Ab + Ag], donde [Ab] es la concentración molar del anticuerpo, [Ag] es la molar concentración del antígeno y [Ab + Ag] es la concentración molar del complejo antígeno-anticuerpo, donde están todas las concentraciones de dichos componentes cuando el sistema está en equilibrio. Cuanto menor sea la constante de disociación en equilibrio, más fuertemente unido está el anticuerpo a su antígeno, o mayor será sea la afinidad de unión entre el antígeno y anticuerpo.

10

15

20

25

30

De este modo, en una realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación de, por ejemplo, menos de 1 x 10⁵ M⁻¹ s⁻¹, menos de 1 x 10⁶ M⁻¹ s⁻¹, menos de 1 x 10⁷ M⁻¹ s⁻¹, o menos de 1 x 10⁸ M⁻¹ s⁻¹. En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación de, por ejemplo, más de 1 x 10⁶ M⁻¹ s⁻¹, más de 1 x 10⁷ M⁻¹ s⁻¹, o más de 1 x 10⁸ M⁻¹ s⁻¹. En otros aspectos, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación entre 1 x 10⁵ M⁻¹ s⁻¹ 1 x 10⁸ M⁻¹ s⁻¹ 1 x 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ 1 x 10⁸ M⁻¹ s⁻¹ 1 x 10⁵ M⁻¹ s⁻¹ 1 x 10⁷ M⁻¹ s⁻¹ o 1 x 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ 1 x 10⁷ M⁻¹ s⁻¹.

35

40

En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de disociación de menos de 1 x 10⁻³ s⁻¹, menos de 1 x 10⁻⁴ s⁻¹, o menos de 1 x 10⁻⁵ s⁻¹. En otros aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de disociación de, por ejemplo, menos de 1,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, menos de 2,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, menos de 3,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, menos de 4,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, menos de 5,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, menos de 6,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, menos de 7,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, menos de 8,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, o menos de 9,0 x 10⁻⁴ s⁻¹. En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de disociación de, por ejemplo, más de 1 x 10⁻³ s⁻¹, más de 1 x 10⁻⁴ s⁻¹, o más de 1 x 10⁻⁵ s⁻¹. En otros aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de disociación de por ejemplo, más de 1,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, más de 2,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, más de 3,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, más de 4,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, más de 5,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, más de 6,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, más de 7,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, más de 8,0 x 10⁻⁴ s⁻¹, o más de 9,0 x 10⁻⁴ s⁻¹.

45

50

55

En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de disociación en equilibrio del menos de 0,500 nM. En aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un anticuerpo

60

5 α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de disociación en equilibrio de por ejemplo, menos de 0,500 nM, menos 0,450 nM, menos 0,400 nM, menos 0,350 nM, menos de 0,300 nM, menos de 0,250 nM, menos de 0,200 nM, menos de 0,150 nM, menos de 0,100 nM, o menos de 0,050 nM. En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de disociación en equilibrio de más de 0,500 nM. En aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de disociación en equilibrio de, por ejemplo, más de 0,500 nM, más de 0,450 nM, más 0,400 nM, más de 0,350 nM, más de 0,300 nM, más de 0,250 nM, más de 0,200 nM, más de 0,150 nM, más de 0,100 nM, o más de 0,050 nM.

15 En otra realización más, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación para el SNAP-25 intacto de por ejemplo, menos de $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o menos de $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación para el SNAP-25 intacto de por ejemplo, como máximo $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o como máximo $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

25 La especificidad de unión es la capacidad de un anticuerpo para discriminar entre una molécula que contiene su epítipo y una molécula que no contiene ese epítipo. Una manera de medir la especificidad de unión es comparar la velocidad de asociación Kon del anticuerpo para una molécula que contiene su epítipo en comparación con la velocidad de asociación Kon del anticuerpo para una molécula que no contiene ese epítipo. Por ejemplo, comparando la constante de velocidad de asociación (K_a) de un anticuerpo α -SNAP-25 a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A en relación con un SNAP-25 que no comprende ese epítipo, tal como: por ejemplo, un epítipo de SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A o un epítipo SNAP-25 que tiene un enlace escindible P₁-P₁' de un sitio de escisión de BoNT/A. En aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para un SNAP-25 que no comprende su epítipo de, por ejemplo, menos de $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o menos de $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para un SNAP-25 que no comprende su epítipo de, por ejemplo, como máximo $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o como máximo $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

40 En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para su epítipo con respecto a un SNAP-25 que no comprende el epítipo de, por ejemplo, como mínimo 2 veces más, más como mínimo 3 veces más, como mínimo 4 veces más, como mínimo 5 veces más, como mínimo 6 veces más, como mínimo 7 veces más, como mínimo 8 veces más o como mínimo 9 veces más. En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para su epítipo con respecto a un SNAP-25 que no comprende ese epítipo de, por ejemplo, como mínimo 10 veces más, como mínimo 100 veces más, como mínimo 1000 veces más, como mínimo 10.000 veces más. En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para su epítipo con respecto a un SNAP-25 que no comprende el epítipo de, por ejemplo, como máximo 1 vez más, como máximo 2 veces más, como máximo 3 veces más, como máximo 4 veces más, como máximo 5 veces más, como máximo 6 veces más, como máximo 7 veces más, como máximo 8 veces más o como máximo 9 veces más. En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para su epítipo en relación con un SNAP-25 que no comprende el epítipo de, por ejemplo, como máximo 10 veces más, como máximo 100 veces más, como máximo 1000 veces más o como máximo 10.000 veces más.

60 La especificidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede también ser caracterizada

como una relación que dicho un anticuerpo α -SNAP-25 puede discriminar su epítipo SNAP-25 con respecto a un SNAP-25 que no comprende ese epítipo, tal como, por ejemplo, un epítipo de SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A o un epítipo de SNAP-25 que tiene un enlace escindible P₋₁-P₋₁' intacto de un sitio de escisión de BoNT/A. En aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una relación de especificidad de unión para su epítipo de SNAP-25 con respecto a un SNAP-25 que no comprende ese epítipo de por ejemplo, como mínimo 2:1, como mínimo 3:1, como mínimo 4:1, como mínimo 5:1, como mínimo 64:1, como mínimo 7:1, como mínimo 8:1, como mínimo 9:1, como mínimo 10:1, como mínimo 15:1, como mínimo 20:1, como mínimo 25:1, como mínimo 30:1, como mínimo 35:1, o como mínimo 40:1. En otros aspectos más de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ de la enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una relación de especificidad de unión para su epítipo de SNAP-25 con respecto a un SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de por ejemplo, como mínimo 2:1, como mínimo 3:1, como mínimo 4:1, como mínimo 5:1, como mínimo 6:1, como mínimo 7:1, como mínimo 8:1, como mínimo 9:1, como mínimo 10:1, como mínimo 15:1, como mínimo 20:1, como mínimo 25:1, como mínimo 30:1, como mínimo 35:1, o como mínimo 40:1. En otros aspectos más de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una relación de especificidad de unión para su epítipo de SNAP-25 con respecto a un SNAP-25 con un enlace escindible P₁-P₁' intacto de un sitio de escisión de BoNT/A, de por ejemplo, como mínimo 2:1, como mínimo 3:1, como mínimo 4:1, como mínimo 5:1, como mínimo 64:1, como mínimo 7:1, como mínimo 8:1, como mínimo 9:1, como mínimo 10:1, como mínimo 15:1, como mínimo 20:1, como mínimo 25:1, como mínimo 30:1, como mínimo 35:1 o como mínimo 40:1.

La avides de unión, también conocida como afinidad funcional, se refiere a la suma total de la fuerza de unión funcional entre su antígeno y un anticuerpo multivalente. Las moléculas de anticuerpo pueden tener más de un sitio de unión (por ejemplo, 2 para IgG, 10 para IgM), y muchos antígenos contienen más de un sitio antigénico. Aunque la avides de unión de un anticuerpo depende de las afinidades de unión de los sitios de unión del anticuerpo individual, la avides de unión de un anticuerpo depende de las afinidades de unión de los sitios de unión del anticuerpo individual, la avides de unión es mayor que la afinidad de unión dado que deben romperse simultáneamente para que el anticuerpo se disocie completamente todas las interacciones antígeno-anticuerpo. Se prevé que un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A pueda unirse selectivamente a todos y cada uno de los epítipos para ese anticuerpo.

De este modo, en una realización, un anticuerpo α -SNAP-25 es un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. En aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 es un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo terminal o un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo terminal. En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 es un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un residuo P₁ en el extremo carboxilo que corresponde a la glutamina 197 de SEQ ID NO: 5 o un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo SNAP-25 teniendo un residuo P₁ en el extremo carboxilo que corresponde a la lisina 204 de la SEQ ID NO: 16. En otros aspectos más de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 es un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene una secuencia de aminoácidos carboxilo terminal de la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un método basado en inmunología de detectar actividad endopeptidasa redirigida que incluye un método de la invención según lo definido por las reivindicaciones. Los métodos basados en inmunología desvelados en la presente memoria descriptiva pueden evaluarse mediante varios parámetros incluyendo, por ejemplo, exactitud, precisión, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), intervalo, especificidad, selectividad, linealidad, robustez y adecuación del sistema. La exactitud de un método es la medida de la exactitud de un método analítico o la cercanía del acuerdo entre el valor medido y el valor que se acepta como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado. La precisión de un método es el grado de acuerdo entre los resultados de las pruebas individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. Como tal, la precisión evalúa 1) la variabilidad dentro del ensayo; 2) la variabilidad en días (repetibilidad); y 3) la variabilidad entre días (precisión intermedia); y 4) variabilidad entre laboratorios (reproducibilidad). El coeficiente de variación (CV %) es una medida cuantitativa de la precisión expresada en relación con el valor observado o teórico.

Un método basado en la inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva debe ser capaz de detectar, sobre el

fondo, la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo α -SNAP-25 que comprende un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. El límite de detección (LOD) de un método se refiere a la concentración de analito que da lugar a una señal que es significativamente diferente del control negativo o en blanco y representa la menor concentración de analito que puede distinguirse del fondo.

5

De este modo, en una realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva puede detectar el LOD de endopeptidasa redirigida en una cantidad que es significativamente diferente de un control negativo o en blanco. En el aspecto de esta realización, el método basado en inmunología, desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de por ejemplo, 10 ng o menos, 9 ng o menos, 8 ng o menos, 7 ng o menos, 6 ng o menos, 5 ng o menos, 4 ng o menos, 3 ng o menos, 2 ng o menos, 1 ng o menos de una endopeptidasa redirigida. En todavía aspectos más de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de por ejemplo, 900 pg o menos, 800 pg o menos, 700 pg o menos, 600 pg o menos, 500 pg o menos, 400 pg o menos, 300 pg o menos, 200 pg o menos, 100 pg o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de por ejemplo, 90 pg o menos, 80 pg o menos, 70 pg o menos, 60 pg o menos, 50 pg o menos, 40 pg o menos, 30 pg o menos, 20 pg o menos, 10 pg o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ejemplo, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de por ejemplo, 0,9 pg o menos, 0,8 pg o menos, 0,7 pg o menos, 0,6 pg o menos, 0,5 pg o menos, 0,4 pg o menos, 0,3 pg o menos, 0,2 pg o menos, 0,1 pg o menos de una endopeptidasa redirigida.

10

15

20

En otro aspecto de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de por ejemplo, 100 nM o menos o menos, 90 nM o menos o menos, 80 nM o menos o menos, 70 nM o menos o menos, 60 nM o menos o menos, 50 nM o menos o menos, 40 nM o menos o menos, 30 nM o menos o menos, 20 nM o menos o menos, 10 nM o menos o menos, 9 nM o menos, 8 nM o menos, 7 nM o menos, 6 nM o menos, 5 nM o menos, 4 nM o menos, 3 nM o menos, 2 nM o menos o 1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de por ejemplo, 900 pM o menos, 800 pM o menos, 700 pM o menos, 600 pM o menos, 500 pM o menos, 400 pM o menos, 300 pM o menos, 200 pM o menos, o 100 pM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de por ejemplo, 100 pM o menos, 90 pM o menos, 80 pM o menos, 70 pM o menos, 60 pM o menos, 50 pM o menos, 40 pM o menos, 30 pM o menos, 20 pM o menos, o 10 pM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de por ejemplo, 10 pM o menos endopeptidasa redirigida, 9 pM o menos, 8 pM o menos, 7 pM o menos, 6 pM o menos, 5 pM o menos, 4 pM o menos, 3 pM o menos, 2 pM o menos, o 1 pM o menos de una endopeptidasa redirigida.

25

30

35

Los límites de cuantificación (LOQ) son las más bajas y las más altas concentraciones de analito en una muestra o espécimen que se pueden medir con un nivel aceptable de exactitud y precisión. El límite inferior de cuantificación se refiere a la dosis más baja que un método de detección puede medir consistentemente desde el fondo. El límite de cuantificación es la dosis más alta que un método de detección puede medir constantemente antes de que se produzca la saturación de la señal. El intervalo lineal del método es el área entre los límites inferiores y superiores de cuantificación. El intervalo lineal se calcula restando el límite inferior de cuantificación del límite superior de cuantificación. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "relación señal a ruido para la asíntota inferior" se refiere a la señal detectada en el método en el límite inferior de detección dividido por la señal de fondo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "relación señal a ruido para la asíntota superior" se refiere a la señal detectada en el método en el límite superior de detección dividida por la señal de fondo.

40

45

De este modo, en una realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva puede detectar el LOQ de endopeptidasa redirigida en una cantidad que es significativamente diferente de un control negativo o en blanco. En el aspecto de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de por ejemplo, 10 ng o menos, 9 ng o menos, 8 ng o menos, 7 ng o menos, 6 ng o menos, 5 ng o menos, 4 ng o menos, 3 ng o menos, 2 ng o menos, 1 ng o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos más de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de por ejemplo, 900 pg o menos, 800 pg o menos, 700 pg o menos, 600 pg o menos, 500 pg o menos, 400 pg o menos, 300 pg o menos, 200 pg o menos, 100 pg o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de por ejemplo, 90 pg o menos, 80 pg o menos, 70 pg o menos, 60 pg o menos, 50 pg o menos, 40 pg o menos, 30 pg o menos, 20 pg o menos, 10 pg o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de por ejemplo, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una endopeptidasa redirigida. En

50

55

60

otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de por ejemplo, 0,9 pg o menos, 0,8 pg o menos, 0,7 pg o menos, 0,6 pg o menos, 5 pg o menos, 0,4 pg o menos, 0,3 pg o menos, 0,2 pg o menos, 0,1 pg o menos de una endopeptidasa redirigida.

5 En otro aspecto de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de por ejemplo, 100 nM o menos o menos, 90 nM o menos o menos, 80 nM o menos o menos, 70 nM o menos o menos, 60 nM o menos o menos, 50 nM o menos o menos, 40 nM o menos o menos, 30 nM o menos o menos, 20 nM o menos o menos, 10 nM o menos o menos, 9 nM o menos, 8 nM o menos, 7 nM o menos, 6 nM o menos, 5 nM o menos, 4 nM o menos, 3 nM o menos, 2 nM o menos, o 1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta
10 realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de por ejemplo, 900 pM o menos, 800 pM o menos, 700 pM o menos, 600 pM o menos, 500 pM o menos, 400 pM o menos, 300 pM o menos, 200 pM o menos, o 100 pM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de por ejemplo, 100 pM o menos, 90 pM o menos, 80 pM o menos, 70 pM o menos, 60 pM o menos, 50 pM o menos, 40 pM o menos, 30 pM o menos,
15 20 pM o menos, o 10 pM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de por ejemplo, 10 pM o menos de una endopeptidasa redirigida, 9 pM o menos, 8 pM o menos, 7 pM o menos, 6 pM o menos, 5 pM o menos, 4 pM o menos, 3 pM o menos, 2 pM o menos, o 1 pM o menos de una endopeptidasa redirigida.

20 Un ensayo basado en inmunología útil para poner en práctica un aspecto de los métodos desvelados debe tener una precisión de no más del 50%. En los aspectos de esta realización, un ensayo basado en inmunología tiene una precisión de no más del 50%, no más del 40%, no más del 30%, o no más del 20%. En otros aspectos de esta realización, un ensayo basado en inmunología tiene una precisión de no más del 15%, no más del 10%, o no más del 5%. En otros aspectos de esta realización, un ensayo basado en inmunología tiene una precisión de no más del 4%, no más del 3%, no más del 2%,
25 o no más del 1%.

Un ensayo basado en inmunología útil para poner en práctica un aspecto de los métodos desvelados debe tener una precisión de como mínimo el 50%. En aspectos de esta realización, un ensayo basado en inmunología tiene una precisión de como mínimo el 50%, como mínimo el 60%, como mínimo el 70% o como mínimo el 80%. En otros aspectos de esta
30 realización, un ensayo basado en inmunología tiene una precisión de como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95%. En otros aspectos de esta realización, un ensayo basado en inmunología tiene una precisión de como mínimo el 96%, como mínimo el 97%, como mínimo el 98% o como mínimo el 99%.

Un método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva debe tener una relación señal a ruido para la asíntota inferior que es estadísticamente significativa y una relación señal a ruido para la asíntota superior que es estadísticamente significativa. En aspectos de esta realización, un método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene una relación señal a ruido para la asíntota inferior de por ejemplo, como mínimo 3:1, como mínimo 4:1, como mínimo 5:1, como mínimo 6:1, como mínimo 7:1, como mínimo 8:1, como mínimo 9:1, como mínimo 10:1, como mínimo 15:1 o como mínimo 20:1. En otros aspectos de esta realización, un método basado en
40 inmunología tiene una relación señal a ruido para la asíntota superior de por ejemplo, como mínimo 10:1, como mínimo 15:1, como mínimo 20:1, en como mínimo 25, como mínimo 30:1, como mínimo 35:1, como mínimo 40:1, como mínimo 45:1, como mínimo 50:1, como mínimo 60:1, como mínimo 10:1, como mínimo 80:1, como mínimo 90:1, o como mínimo 100:1, como mínimo 150:1, como mínimo 200:1, como mínimo 250:1, como mínimo 300:1, como mínimo 350:1, como mínimo 400:1, como mínimo 450:1, como mínimo 500:1, como mínimo 550:1, o como mínimo 600:1.

45 La especificidad de un método define la capacidad del método para medir los analitos de interés con la exclusión de otros componentes relevantes, tales como: por ejemplo, analito parcialmente activo o inactivo. La selectividad de un método describe la capacidad de un método analítico para distinguir diferentes sustancias en una muestra. La linealidad del método es su capacidad para obtener resultados que son directamente, o mediante una transformación matemática bien definida, proporcionales a la concentración de analito en la muestra. De este modo, en una realización, un método basado
50 en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva puede distinguir endopeptidasa redirigida completamente activa de endopeptidasa redirigida parcialmente activa qt, por ejemplo, el 70% o menos, el 60% o menos, el 50% o menos, el 40% o menos, el 30% o menos, el 20% o menos o el 10% o menos de la actividad de la endopeptidasa redirigida totalmente activa.

55 La solidez del método es la reproducibilidad de los resultados obtenidos para muestras idénticas en condiciones de ensayo normales (pero variables). La robustez de un procedimiento es una medida de su capacidad para permanecer inafectado por variaciones pequeñas, pero deliberadas en los parámetros de método y proporciona una indicación de su fiabilidad en la utilización normal. Por lo tanto, mientras que la solidez evalúa cambios inevitables, la robustez evalúa cambios deliberados. Parámetros típicos evaluadas por solidez y robustez incluyen los efectos de congelación/descongelación, tiempos de incubación, temperatura de incubación, longevidad de reactivo, preparación de muestras, almacenamiento de
60

muestras, número de paso celular, lotes de endopeptidasa redirigida, variabilidad entre purificaciones y la variabilidad entre las reacciones de corte/digestión. Parámetros de robustez para ensayos basados en células incluyen el banco celular (principio, medio y final de congelación), nivel de paso celular, densidad de siembra, densidad de solución madre celular (Cuántos días en cultivo), edad de la célula en frasco (tiempo de espera para la siembra), tiempo de incubación, diferentes placas, cantidades excesivas de suero y fuente de reactivos. La idoneidad del sistema del método es la determinación del rendimiento de análisis, incluyendo el rendimiento de los reactivos y los instrumentos, a lo largo del tiempo mediante el análisis de un estándar de referencia o una molécula de referencia. La idoneidad del sistema se resalta en la orientación de la FDA en referencia al hecho de que el equipo, los aparatos electrónicos, el rendimiento del ensayo y las muestras para ser analizadas, constituyen un sistema integrado. La idoneidad del sistema puede ser evaluada ensayando el paralelismo, que es cuando se representa gráficamente la dosis logarítmica frente a la respuesta, diluciones sucesivas de la referencia y diluciones sucesivas de las muestras deben dar lugar a curvas paralelas.

Aspectos de la presente divulgación constituyen, en parte, una célula de una línea celular establecida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "célula" se refiere a cualquier célula eucariota susceptible a actividad endopeptidasa redirigida por endopeptidasa redirigida o cualquier célula eucariota que puede captar endopeptidasa redirigida. El término célula abarca las células de una variedad de organismos, tales como: por ejemplo, ratón, rata, porcino, bovino, equino, primates y células humanas; de una variedad de tipos de células tales como, por ejemplo, neuronales y no neuronales; y puede ser aislada de o formar parte de una población heterogénea de células, tejido u organismo. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "línea celular establecida" es sinónimo de "línea celular inmortal", o "línea celular transformada" y se refiere a un cultivo celular de las células seleccionadas para propagación indefinida de una población de células derivada de una fuente del organismo, tejido u órgano. Por definición, una línea celular establecida excluye un cultivo celular de células primarias. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "células primarias" son las células recogidas directamente de tejidos u órganos frescos y no tienen el potencial de propagarse indefinidamente. Una línea celular establecida puede constar de una población heterogénea de células o una población uniforme de células. Una línea celular establecida derivada de una sola célula se conoce como una línea celular clonal. Una línea celular establecida puede ser una cuyas células expresan de forma endógena todos los componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo general celular mediante el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25 y abarca la unión de la endopeptidasa redirigida a su receptor, la internalización del complejo endopeptidasa/receptor, la translocación de la cadena ligera de la endopeptidasa redirigida de una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de un SNAP-25. Como alternativa, una línea celular establecida puede ser una en cuyas células ha sido introducido, desde una fuente exógena, como mínimo uno de los componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo general celular mediante el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25 y abarca la unión de la endopeptidasa redirigida a su receptor, la internalización del complejo endopeptidasa/receptor, la translocación de la cadena ligera de la endopeptidasa redirigida de una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de un SNAP-25. También referido como una línea celular manipulada genéticamente, las células de dicha una línea celular establecida pueden, por ejemplo, expresar una endopeptidasa redirigida exógena, tal como: por ejemplo, un ORL1 exógeno, un DOR exógeno, un KOR exógeno, un MOR exógeno, un receptor de galanina exógeno 1, un receptor de galanina exógeno 2, un receptor de galanina exógeno 3 o cualquier combinación de éstos.

Aspectos de la presente divulgación constituyen, en parte, una célula de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "células susceptibles a la actividad endopeptidasa redirigida" "células susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida por una endopeptidasa redirigida" o "células de una línea celular establecida susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida por una endopeptidasa redirigida" ser refieren a células que pueden experimentar el mecanismo general celular mediante el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25 inhibiendo de este modo la exocitosis y abarca la unión de la endopeptidasa redirigida a su receptor, la internalización del complejo endopeptidasa/receptor, la translocación de la cadena de actividad endopeptidasa redirigida de una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de un SNAP-25. Por definición, células susceptibles a la actividad endopeptidasa redirigida deben expresar o diseñarse para expresar, como mínimo un receptor de endopeptidasa redirigida y como mínimo un sustrato de SNAP-25. Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "células que pueden captar endopeptidasa redirigida" o "células que comprenden una línea de células establecidas que pueden captar endopeptidasa redirigida" se refieren a las células que pueden experimentar el mecanismo general celular mediante el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25 inhibiendo de este modo la exocitosis y abarca la unión de la endopeptidasa redirigida a su receptor, la internalización del complejo endopeptidasa/receptor, la translocación de la cadena ligera de la endopeptidasa redirigida de una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de un SNAP-25. Por definición, células que pueden captar endopeptidasa redirigida deben expresar o diseñarse para expresar, como mínimo un receptor de endopeptidasa redirigida y como mínimo un sustrato de SNAP-25.

Por lo tanto, en una realización, las células de una línea celular establecida son susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, son susceptibles a la actividad endopeptidasa redirigida, las células de una

línea celular establecida por ejemplo, aproximadamente 100 nM o menos o menos, aproximadamente 90 nM o menos o menos, aproximadamente 80 nM o menos o menos, cerca de 70 nM o menos o menos, aproximadamente 60 nM o menos o menos, aproximadamente 50 nM o menos o menos, aproximadamente 40 nM o menos o menos, aproximadamente 30 nM o menos o menos, aproximadamente 20 nM o menos o menos, aproximadamente 10 nM o menos o menos de la endopeptidasa redirigida. En otros aspectos, las células de una línea celular establecida son susceptibles a la actividad endopeptidasa redirigida a por ejemplo, aproximadamente 9 nM o menos, aproximadamente 8 nM o menos, aproximadamente 7 nM o menos, aproximadamente 6 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 4 nM o menos, aproximadamente 3 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos, las células de una línea celular establecida son susceptibles a la actividad endopeptidasa redirigida a por ejemplo, aproximadamente 0,9 nM o menos, aproximadamente 0,8 nM o menos, aproximadamente 0,7 nM o menos, aproximadamente 0,6 nM o aproximadamente 0,5 nM o menos, aproximadamente 0,4 nM o menos aproximadamente 0,3 nM o menos, aproximadamente 0,2 nM o aproximadamente 0,1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "aproximadamente" cuando califica a un valor de un elemento declarado, número, porcentaje o término se refiere a un intervalo de más o menos el diez por ciento del valor del artículo, parámetro o término indicado.

En otra realización, las células que componen una línea celular establecida pueden captar endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, las células que componen una línea celular establecida pueden captar, por ejemplo, aproximadamente 100 nM o menos o menos, cerca de 90 nM o menos o menos, aproximadamente 80 nM o menos o menos, aproximadamente 70 nM o menos o menos, aproximadamente 60 nM o menos o menos, aproximadamente 50 nM o menos o menos, aproximadamente 40 nM o menos o menos, aproximadamente 30 nM o menos o menos, aproximadamente 20 nM o menos o menos, aproximadamente 10 nM o menos o menos de la endopeptidasa redirigida. En otros aspectos, las células que componen una línea celular establecida poseen la capacidad de captación de aproximadamente 9 nM o menos, aproximadamente 8 nM o menos, aproximadamente 7 nM o menos, aproximadamente 6 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 4 nM o menos, aproximadamente 3 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos, las células que componen una línea celular establecida poseen la capacidad de captación de aproximadamente 0,9 nM o menos, aproximadamente 0,8 nM o menos, aproximadamente 0,7 nM o menos, aproximadamente 0,6 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos, aproximadamente 0,4 nM o menos, aproximadamente 0,3 nM o menos, aproximadamente 0,2 nM o menos, o aproximadamente 0,1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, células de una línea celular establecida que exhiben una unión selectiva para endopeptidasa redirigida desvelada en la presente memoria descriptiva. En este documento, la expresión "se une selectivamente", o "unión selectiva" que cuando hace referencia a una endopeptidasa redirigida, se refiere a la unión discriminatorias de endopeptidasa redirigida al receptor diana indicado, tal que la endopeptidasa redirigida no se une sustancialmente a un receptor no diana. El grado en que las células de una exposición de línea celular establecida se unen selectivamente a endopeptidasa redirigida puede medirse mediante el grado de captación no selectiva que estas células exhiben para una molécula que carece del dominio de dirección de la endopeptidasa redirigida. Es una forma de evaluar la captación no selectiva para una molécula que carece del dominio de dirección de la endopeptidasa redirigida es medir la captación no selectiva de un fragmento LH_N. Un fragmento LH_N es uno que se compone de un dominio de translocación de toxinas clostridiales y un dominio enzimático de toxinas clostridiales, pero carece de cualquier dominio de dirección en conjunto. Los ejemplos no limitantes de un fragmento LH_N incluyen un fragmento LH_N/A fragmento, un fragmento LH_N/B, un fragmento LH_N/C, un fragmento LH_N/D, un fragmento LH_N/E, un fragmento LH_N/F y un fragmento LH_N/G. Un fragmento LH_N/A ejemplar es la SEQ ID NO: 146 que es codificada por la molécula de polinucleótido SEQ ID NO: 147.

De este modo, en una realización, las células de una línea celular establecida exhiben unión selectiva para una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida exhiben unión selectiva para una endopeptidasa redirigida que representa, por ejemplo, como mínimo el 75% de la actividad total ensayada, como mínimo el 80% de la actividad total ensayada, como mínimo el 85% de la actividad total ensayada, como mínimo el 90% de la actividad total ensayada, o como mínimo el 95% de la actividad total ensayada. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida exhiben unión selectiva para una endopeptidasa redirigida que representa, por ejemplo, aproximadamente el 75% a aproximadamente el 100% de la actividad total ensayada, cerca del 80% a aproximadamente el 100% de la actividad total ensayada, cerca del 85% a cerca del 100% de la actividad total ensayada, aproximadamente el 90% a aproximadamente el 100% de la actividad total ensayada.

En otra realización, las células de una línea celular establecida exhiben captación no selectiva mínima de un fragmento LH_N. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida muestran captación no selectiva de un fragmento LH_N que es, por ejemplo, como máximo el 25% de la captación total medida, como máximo el 20% de la captación total medida, como máximo el 15% de la captación total medida, como máximo el 10% de la captación total medida, o como máximo el 5% de la captación total medida. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida muestran captación no selectiva de un fragmento LH_N que es, por ejemplo, aproximadamente el 0% a

aproximadamente el 25% de la captación total medida, aproximadamente el 0% a aproximadamente el 20% de la captación total medida, aproximadamente el 0% a aproximadamente el 15% de la captación total medida, aproximadamente el 0% a cerca del 10% de la captación total medida, o aproximadamente el 0% a aproximadamente el 5% de la captación total medida.

5

En otra realización, las células de una línea celular establecida exhiben captación no selectiva mínima de un fragmento LH_N/A . En los aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida muestran captación no selectiva de un fragmento LH_N/A que es, por ejemplo, como máximo el 25% de la captación total medida, como máximo el 20% de la captación total medida, como máximo el 15% de la captación total medida, como máximo el 10% de la captación total medida, como máximo el 5% de la captación total medida. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida muestran captación no selectiva de un fragmento LH_N/A que está por ejemplo, aproximadamente el 0% a aproximadamente el 25% de la captación total medida, aproximadamente el 0% a aproximadamente el 20% de la captación total medida, aproximadamente el 0% a aproximadamente el 15% de la captación total medida, aproximadamente el 0% a aproximadamente el 10% de la captación total medida, o aproximadamente el 0% a cerca del 5% de la captación total medida.

10

15

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, las células de una línea celular establecida que exhiben un número suficiente de sitios de unión del receptor en la membrana plasmática para conferir unión sensible y selectiva para endopeptidasa redirigida. Un ensayo de unión de saturación en equilibrio mide la unión total e inespecífica de un ligando a diferentes concentraciones. La constante de disociación en equilibrio (K_d) para el ligando y el número máximo de sitios de unión al receptor, B_{max} , pueden calcularse a partir de la unión específica mediante el análisis de regresión no lineal. La unión específica se calcula restando la unión inespecífica de un ligando de la unión total observada. K_d es la concentración de ligando requerida para alcanzar la mitad de la unión máxima y se mide en términos de molaridad. B_{max} es el número máximo de sitios de unión presentes en la membrana plasmática y se mide en términos de pmol/mg, pmol/célula, fmol/célula o sitios/célula.

20

25

De este modo, en una realización, las células de una línea celular establecida exhiben un número suficiente de sitios de unión al receptor en la membrana plasmática para conferir unión sensible y selectiva para endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida exhiben un valor B_{max} de, por ejemplo, como mínimo 0,1 fmol/célula, como mínimo 0,2 fmol/célula, como mínimo 0,3 fmol/célula, como mínimo 0,4 fmol/célula, como mínimo 0,5 fmol/célula, como mínimo 0,6 fmol/célula, como mínimo 0,7 fmol/célula, como mínimo 0,8 fmol/célula, como mínimo 0,9 fmol/célula, o como mínimo 1,0 fmol/célula, para la ligando de dirección de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida exhiben un valor B_{max} de, por ejemplo, como mínimo 1 fmol/célula, como mínimo 2 fmol/célula, como mínimo 3 fmol/célula, como mínimo 4 fmol/célula, como mínimo 5 fmol/célula, como mínimo 6 fmol/célula, como mínimo 7 fmol/célula, como mínimo 8 fmol/célula, como mínimo 9 fmol/célula, o como mínimo 10 fmol/célula, para el ligando de dirección de una endopeptidasa redirigida.

30

35

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, las células de una línea de células clonales establecidas susceptible a actividad endopeptidasa redirigida que son más estables que las células de la línea celular parental de la que deriva la línea celular clonal. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "estable" se refiere a células de una línea celular clonal establecida para un número de pase particular que exhiben una CE_{50} relativa, sensibilidad, eficacia, asíntota superior bien definida y/o una curva de respuesta a la dosis bien definida para actividad endopeptidasa redirigida que es similar a los valores de CE_{50} relativa, sensibilidad, eficacia, asíntota superior bien definida o una curva de respuesta a la dosis bien definida exhibida por las células de la línea celular parental de la cual se deriva la línea celular clonal, en el número de pase igual o similar, donde se utilizan las mismas condiciones de ensayo y la misma endopeptidasa redirigida en ambos ensayos.

40

45

Por lo tanto, en una realización, las células de una línea celular clonal establecida son más estables en comparación con las de la línea celular parental de la que se deriva la línea celular clonal. En un aspecto de esta realización, las células de una línea celular clonal establecida son más estables en comparación con la línea celular parental SK-N-DZ. En otro aspecto de esta realización, las células de una línea celular clonal establecida son más estables en comparación con la línea celular parental SK-N-DZ ATCC CRL-2149. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular clonal establecida son más estables por ejemplo, como mínimo 5 pases más, como mínimo 10 pases más, como mínimo 15 pases más, como mínimo 20 pases más, como mínimo 25 pases más o como mínimo 30 pases más, en comparación con la de la línea celular parental de la que deriva la línea celular clonal. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular clonal establecida son más estables por ejemplo, como mínimo 5 pases más, como mínimo 10 pases más, como mínimo 15 pases más, como mínimo 20 pases más, como mínimo 25 pases más o como mínimo 30 pases más, en comparación con la de la línea celular parental de la que deriva la línea celular clonal.

50

55

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, las células de una línea celular clonal establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida que son estables en una pluralidad de pases de la célula. Tal como se utiliza en el

60

presente documento, el término "estable" se refiere a células de una línea celular clonal establecida para un número de pase particular que exhiben una CE_{50} relativa, sensibilidad, eficacia, asíntota superior bien definida o una curva de respuesta a la dosis bien definida para actividad endopeptidasa redirigida que es similar a los valores de CE_{50} relativa, sensibilidad, eficacia, asíntota superior bien definida o una curva de respuesta a la dosis bien definida exhibida por las células de la misma línea celular clonal establecida, sino de un pase o pases previos, donde se utilizan las mismas condiciones de ensayo y la misma endopeptidasa redirigida en ambos ensayos.

Las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva pueden exhibir una sensibilidad consistente para actividad endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pases de la célula. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sensibilidad por actividad endopeptidasa redirigida" se refiere a la dosis más baja que un ensayo puede medir consistentemente por encima de la señal detectada por una señal de control o fondo no de tratamiento.

De este modo, en una realización, las células de la línea celular clonal establecida exhiben una sensibilidad para actividad endopeptidasa redirigida para cualquier pase dado que es por ejemplo, 100 nM o menos, aproximadamente 80 nM o menos, cerca de 70 nM o menos, aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 30 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 0.9 nM o menos, aproximadamente 0,8 nM o menos, aproximadamente 0,7 nM o menos, aproximadamente 0,6 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos, aproximadamente 0,4 nM o menos, aproximadamente 0,3 nM o menos, aproximadamente 0,2 nM o menos, o aproximadamente 0,1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, las células de la línea celular clonal establecida exhiben una sensibilidad para actividad endopeptidasa redirigida para cualquier pase dado, por ejemplo, aproximadamente 0.01 nM a aproximadamente 100 nM, aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 75 nM, aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 50 nM, aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 25 nM, aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 20 nM, aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 15 nM, aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 10 nM, aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 5 nM, aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 100 nM, aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 75 nM, aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 50 nM, aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 25 nM, aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 20 nM, aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 15 nM, aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 10 nM o aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 5 nM de una endopeptidasa redirigida.

En otra realización, las células de la línea celular clonal establecida exhiben una sensibilidad para la actividad endopeptidasa redirigida que es de aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, menos aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente de 15 nM o menos, aproximadamente de 10 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos para, por ejemplo, 5 o más pases de la célula, 10 o más pases de la célula, 15 o más pases de la célula, 20 o más pases de la célula, 25 o más pases de la célula, 30 o más pases de la célula, 35 o más pases de la célula, 40 o más pases de la célula, 45 o más pases de la célula o 50 o más pases de la célula. En otros aspectos de esta realización, las células de la línea celular clonal establecida exhiben una sensibilidad para la actividad endopeptidasa redirigida que es de aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, menos aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 15 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos para, por ejemplo, aproximadamente 15 a 60 pases, aproximadamente 20 a 60 pases, aproximadamente 25 a 60 pases, aproximadamente 30 a 60 pases, aproximadamente 35 a 60 pases, aproximadamente 40 a 60 pases, aproximadamente 45 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 50 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 15 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 20 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 25 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 30 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 35 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 40 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 15 a aproximadamente 40 pases, aproximadamente 20 a aproximadamente 40 pases, alrededor de 25 a 40 pases, o aproximadamente 30 a aproximadamente 40 pases.

Las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva pueden exhibir una eficacia relativa consistente de captación de endopeptidasa redirigida o actividad endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pases de la célula. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "eficacia relativa" se refiere a lo bien que compara la asíntota superior para la actividad endopeptidasa redirigida detectada en el ensayo actual ejecutado con la asíntota superior para la actividad endopeptidasa redirigida detectada en un estándar de referencia, una molécula de referencia o un número de pase de referencia utilizado en ese ensayo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "relación señal a ruido para la asíntota superior" se refiere a la señal detectada en un ensayo en el límite superior de detección dividido por la señal detectada por una señal de control o fondo no de tratamiento. El límite superior de detección es la dosis más alta que un ensayo puede medir de forma consistente antes de que se produzca la saturación de la señal.

De este modo, en una realización, células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva pueden exhibir una asíntota superior bien definida en una pluralidad de pases de la célula y mantener una relación señal a ruido que es consistente y adecuada para el análisis. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva deben tener una bien definida relación señal a ruido para la asíntota superior para actividad endopeptidasa redirigida por ejemplo, como mínimo 3:1, como mínimo 4:1, como mínimo 5:1, como mínimo 6:1, como mínimo 7:1, como mínimo 8:1, como mínimo 9:1, como mínimo 10:1, como mínimo 15:1, como mínimo 20:1, como mínimo 25:1, como mínimo 30:1, como mínimo 35:1, como mínimo 40:1, como mínimo 45:1, como mínimo 50:1, como mínimo 60:1, como mínimo 70:1, como mínimo 80:1, como mínimo 90:1, o como mínimo 100:1, como mínimo 150:1, como mínimo 200:1, como mínimo 250:1, como mínimo 300:1, como mínimo 350:1, como mínimo 400:1, como mínimo 450:1, como mínimo 500:1, como mínimo 550:1 o como mínimo 600:1, en, por ejemplo, 5 o más pases de la célula, 10 o más pases de la célula, 15 o más pases de la célula, 20 o más pases de la célula, 25 o más pases de la célula, 30 o más pases de la célula, 35 o más pases de la célula, 40 o más pases de la célula, 45 o más pases de la célula o 50 o más pases de la célula. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva deben tener una bien definida relación señal a ruido para la asíntota superior para actividad endopeptidasa redirigida por ejemplo, como mínimo 3:1, como mínimo 4:1, como mínimo 5:1, como mínimo 6:1, como mínimo 7:1, como mínimo 8:1, como mínimo 9:1, como mínimo 10:1, como mínimo 15:1, como mínimo 20:1, como mínimo 25:1, como mínimo 30:1, como mínimo 35:1, como mínimo 40:1, como mínimo 45:1, como mínimo 50:1, como mínimo 60:1, como mínimo 70:1, como mínimo 80:1, como mínimo 90:1, o como mínimo 100:1, como mínimo 150:1, como mínimo 200:1, como mínimo 250:1, como mínimo 300:1, como mínimo 350:1, como mínimo 400:1, como mínimo 450:1, como mínimo 500:1, como mínimo 550:1 o como mínimo 600:1, en, por ejemplo, aproximadamente 15 a 60 pases, aproximadamente 20 a 60 pases, aproximadamente 25 a 60 pases, aproximadamente 30 a 60 pases, aproximadamente 35 a 60 pases, aproximadamente 40 a 60 pases, aproximadamente 45 a 60 pases, aproximadamente 50 a 60 pases, aproximadamente 15 a 50 pases, aproximadamente 20 a 50 pases, aproximadamente 25 a 50 pases, aproximadamente 30 a 50 pases, aproximadamente 35 a 50 pases, aproximadamente 40 a 50 pases, aproximadamente 15 a 40 pases, aproximadamente 20 a 40 pases, aproximadamente 25 a 40 pases, o aproximadamente 30 a 40 pases.

Células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva pueden exhibir una curva de respuesta a la dosis bien definida para la actividad endopeptidasa redirigida a una pluralidad de pases de la célula. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "curva de respuesta a la dosis" se refiere a lo bien que los datos brutos encajan en el modelo estadístico de elección para el ensayo. Como un ejemplo no limitante, una curva sigmoide con un ajuste logístico de cuatro parámetros es una curva de respuesta a la dosis para un ensayo de actividad enzimática, tal como, por ejemplo un ensayo de potencia. Como otro ejemplo no limitante, un ligando con un ajuste de saturación del sitio es una curva de respuesta a la dosis para un ensayo de unión ligando/anticuerpo.

De este modo, en una realización, las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva exhiben una curva de respuesta a la dosis bien definida para actividad endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pases de la célula. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva exhiben una curva de respuesta a la dosis viene definida para actividad endopeptidasa redirigida en por ejemplo, 5 o más pases de la célula, 10 o más pases de la célula, 15 o más pases de la célula, 20 o más pases de la célula, 25 o más pases de la célula, 30 o más pases de la célula, 35 o más pases de la célula, 40 o más pases de la célula, 45 o más pases de la célula o 50 o más pases de la célula. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva exhiben una curva de respuesta a la dosis bien definida para actividad endopeptidasa redirigida en por ejemplo, aproximadamente 15 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 20 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 25 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 30 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 35 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 40 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 45 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 50 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 15 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 20 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 25 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 30 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 35 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 40 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 15 a aproximadamente 40 pases, aproximadamente 20 a aproximadamente 40 pases, aproximadamente 25 a aproximadamente 40 pases, o aproximadamente 30 a aproximadamente 40 pases.

Las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva pueden exhibir un valor de CE_{50} relativa consistente de actividad endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pases de la célula. En este documento, el término " CE_{50} relativa" o "valor de CE_{50} relativa" se refiere a un valor de CE_{50} de actividad endopeptidasa redirigida que se normaliza contra la CE_{50} calculada para un estándar de referencia, una molécula de referencia o un número de pase de referencia utilizado en el ensayo.

De este modo, en una realización, las células de una línea celular clonal establecida exhiben una CE_{50} relativa consistente para la actividad endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pases de la célula. En aspectos de esta realización, las

5 células de una línea celular clonal establecida exhiben una CE₅₀ relativa consistente para actividad endopeptidasa redirigida es decir, por ejemplo, aproximadamente ± 10%, aproximadamente ± 20%, aproximadamente ± 30%, aproximadamente ± 40%, aproximadamente ± 50%, aproximadamente ± 60%, ± aproximadamente 70% o aproximadamente ± 75% la CE₅₀ relativa para actividad endopeptidasa redirigida en por ejemplo, 5 o más pases de la célula, 10 o más pases de la célula, 15 o más pases de la célula, 20 o más pases de la célula, 25 o más pases de la célula, 30 o más pases de la célula, 35 o más pases de la célula, 40 o más pases de la célula, 45 o más pases de la célula o 50 o más pases de la célula. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular clonal establecida exhiben una CE₅₀ relativa para actividad endopeptidasa redirigida es decir, por ejemplo, aproximadamente ± 10% a aproximadamente el 75%, aproximadamente ± 10% a aproximadamente el 70%, aproximadamente ± 10% a aproximadamente el 60%, aproximadamente ± 10% a aproximadamente el 50%, aproximadamente ± 10% a aproximadamente el 40%, aproximadamente ± 10% a aproximadamente el 30% o aproximadamente ± 10% a aproximadamente el 20% la CE₅₀ relativa para actividad endopeptidasa redirigida por ejemplo en, 5 o más pases de la célula, 10 o más pases de la célula, 15 o más pases de la célula, 20 o más pases de la célula, 25 o más pases de la célula, 30 o más pases de la célula, 35 o más pases de la célula, 40 o más pases de la célula, 45 o más pases de la célula o 50 o más pases de la célula.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "endopeptidasa redirigida" es sinónimo de "Proteína Moduladora de Exocitosis Vesicular Dirigida" o "TVEMP". Los ejemplos no limitantes de endopeptidasa redirigida se desvelan por ejemplo, en Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, Patente de los E.E.U.U. 5.989.545; Clifford C. Shone y col., *Recombinant Toxin Fragments*, Patente de los E.E.U.U. 6.461.617; Conrad P. Quinn y col., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, Patente de los E.E.U.U. 6.632.440; Lance E. Steward y col., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, Patente de los E.E.U.U. 6.843.998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, publicación de patente de E.E.U.U. 2002/0037833; Keith A. Foster y col., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente de E.E.U.U. 2003/0180289; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, 2001 WO/014570; Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2005/023309; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Solicitud de patente nº 11/376.696; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, Solicitud de patente nº 11/776.075; Dolly, J.O. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, Solicitud de patente nº 11/829.475; Foster, K.A. y col., *Fusion Proteins*, Publicación de patente internacional 2006 WO/059093; y Foster, K.A. y col., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2006/059105. Ejemplos no limitantes de las endopeptidasas redirigidas incluyen la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 130 y la SEQ ID NO: 131.

De este modo en una realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una endopeptidasa redirigida desvelada Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, Patente de los E.E.U.U. 5.989.545; Clifford C. Shone y col., *Recombinant Toxin Fragments*, Patente de los E.E.U.U. 6.461.617; Conrad P. Quinn y col., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, Patente de los E.E.U.U. 6.632.440; Lance E. Steward y col., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, Patente de los E.E.U.U. 6.843.998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, publicación de patente de E.E.U.U. 2002/0037833; Keith A. Foster y col., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente de E.E.U.U. 2003/0180289; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, 2001 WO/014570; Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2005/023309; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Solicitud de patente nº 11/376.696; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, Solicitud de patente nº 11/776.075; Dolly, J.O. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, Solicitud de patente nº 11/829.475; Foster, K.A. y col., *Fusion Proteins*, Publicación de patente internacional 2006 WO/059093; y Foster, K.A. y col., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2006/059105. En aspectos de esta realización, una endopeptidasa redirigida es la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 130 o la SEQ ID NO: 131.

En otra realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una endopeptidasa redirigida que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con una endopeptidasa redirigida desvelada en Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, Patente de los E.E.U.U. 5.989.545; Clifford C. Shone y col., *Recombinant Toxin Fragments*, Patente de los E.E.U.U. 6.461.617; Conrad P. Quinn y col., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, Patente de los E.E.U.U. 6.632.440; Lance E. Steward y col., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, Patente de los E.E.U.U. 6.843.998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, publicación de patente de E.E.U.U. 2002/0037833;

Keith A. Foster y col., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente de E.E.U.U. 2003/0180289; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, 2001 WO/014570; Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2005/023309; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Solicitud de patente nº 11/376.696; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, Solicitud de patente nº 11/776.075; Dolly, J.O. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, Solicitud de patente nº 11/829.475; Foster, K.A. y col., *Fusion Proteins*, Publicación de patente internacional 2006 WO/059093; y Foster, K.A. y col., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2006/059105. En otra realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de endopeptidasa redirigida que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con una endopeptidasa redirigida de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 130 o la SEQ ID NO: 131.

En otros aspectos de esta realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una endopeptidasa redirigida que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con respecto a una endopeptidasa redirigida desvelada en Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, Patente de los E.E.U.U. 5.989.545; Clifford C. Shone y col., *Recombinant Toxin Fragments*, Patente de los E.E.U.U. 6.461.617; Conrad P. Quinn y col., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, Patente de los E.E.U.U. 6.632.440; Lance E. Steward y col., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, Patente de los E.E.U.U. 6.843.998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, publicación de patente de E.E.U.U. 2002/0037833; Keith A. Foster y col., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente de E.E.U.U. 2003/0180289; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, 2001 WO/014570; Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2005/023309; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Solicitud de patente nº 11/376.696; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, Solicitud de patente nº 11/776.075; Dolly, J.O. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, Solicitud de patente nº 11/829.475; Foster, K.A. y col., *Fusion Proteins*, Publicación de patente internacional 2006 WO/059093; y Foster, K.A. y col., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2006/059105. En otros aspectos de esta realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una endopeptidasa redirigida que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con respecto a una endopeptidasa redirigida de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 130, o la SEQ ID NO: 131.

En otros aspectos de esta realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una variante endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos contiguos con respecto a una endopeptidasa redirigida desvelada en Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, Patente de los E.E.U.U. 5.989.545; Clifford C. Shone y col., *Recombinant Toxin Fragments*, Patente de los E.E.U.U. 6.461.617; Conrad P. Quinn y col., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, Patente de los E.E.U.U. 6.632.440; Lance E. Steward y col., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, Patente de los E.E.U.U. 6.843.998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, publicación de patente de E.E.U.U. 2002/0037833; Keith A. Foster y col., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente de E.E.U.U. 2003/0180289; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, 2001 WO/014570; Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2005/023309; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Solicitud de patente nº 11/376.696; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, Solicitud de patente nº 11/776.075; Dolly, J.O. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, Solicitud de patente nº 11/829.475; Foster, K.A. y col., *Fusion Proteins*, Publicación de patente internacional 2006 WO/059093; y Foster, K.A. y col., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, La publicación de patente WO 2006/059105. En otros aspectos de esta realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una variante de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos contiguos con respecto a una endopeptidasa redirigida de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 130 o la SEQ ID NO: 131.

En otra realización más, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una endopeptidasa redirigida a opioides. Se describen ejemplos no limitantes de endopeptidasa redirigida a opioides o TVEMP de opiodes, por ejemplo, Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin. Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions* Patente de los

E.E.U.U. 5.989.545; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Patente de los E.E.U.U. 7.132.259; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de los E.E.U.U. 7.244.437; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de los E.E.U.U. 7.413.742; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de los E.E.U.U. 7.415.338; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Patente de los E.E.U.U. 7.514.088; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0064092; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2009/0035822; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2009/0048431; Keith A. Foster, *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2009/0162341; Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación de patente internacional WO 2005/023309; y Lance E. Steward, *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente WO 2008/008805.

En otra realización más, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de endopeptidasa redirigida a galanina. Se describen ejemplos no limitantes de endopeptidasa redirigida a galanina o TVEMP de galanina, en, por ejemplo, Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capability and Enhanced Targeting Activity*, solicitud de patente de E.E.U.U. nº 11/776.043 (11 de julio de 2007); Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente estadounidense Nº 11/776.052 (11 de julio de 2007); Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente estadounidense Nº 11/776.075 (11 de julio de 2007).

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un SNAP-25. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "SNAP-25" se refiere a un SNAP-25 de origen natural o un SNAP-25 de origen no natural que preferentemente es escindido por una endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "preferentemente escindido" se refiere a que la tasa de escisión del SNAP-25 por endopeptidasa redirigida es como mínimo un orden de magnitud superior a la de cualquier otro sustrato por una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, la tasa de escisión de SNAP-25 por una endopeptidasa redirigida es como mínimo dos órdenes de magnitud mayor, como mínimo tres órdenes de magnitud mayor, como mínimo cuatro órdenes de magnitud mayor o como mínimo cinco órdenes de magnitud mayor entonces que la tasa de escisión de cualquier otro sustrato por endopeptidasa redirigida.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "SNAP-25 de origen natural" se refiere a cualquier SNAP-25 producida por un proceso natural, incluyendo, sin limitación, isoformas de SNAP-25 producidas a partir de una modificación post traduccional, una transcripción cortada y empalmada de forma alternativa, o una mutación espontánea y subtipos de SNAP-25. Un SNAP-25 de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24, o una que sustituye, elimina o agrega, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "SNAP-25 de origen no natural" se refiere a cualquier SNAP-25 cuya estructura se modificó con ayuda de manipulación humana, incluyendo, sin limitación, un SNAP-25 producido por ingeniería genética mediante mutagénesis al azar o diseño racional y un SNAP-25 producido por síntesis química in vitro. Ejemplos no limitantes de SNAP-25 de origen no natural se describen en, por ejemplo, Steward, L.E. y col., *FRET Protease Assays for Clostridial Toxins*, Patente de los E.E.U.U. 7.332.567; Fernandez-Salas y col., *Lipophilic Dye-based FRET Assays for Clostridial Toxin Activity*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0160561. Un SNAP-25 de origen no natural puede sustituir, deleccionar o añadir, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24.

Por lo tanto en una realización, un SNAP-25 es SNAP-25 de origen natural. En aspectos de esta realización, el SNAP-25 es una isoforma de SNAP-25 o un subtipo de SNAP-25. En aspectos de esta realización, el SNAP-25 de origen natural es el SNAP-25 de origen natural de la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22,

la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta realización, el SNAP-25 es un SNAP-25 de origen natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70% de identidad de aminoácidos, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24.

En otra realización, un SNAP-25 es un SNAP-25 de origen no natural. En otros aspectos de esta realización, el SNAP-25 es un SNAP-25 de origen no natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4. En otros aspectos de esta realización, el SNAP-25 es un SNAP-25 de origen no natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con respecto a la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta realización, el SNAP-25 es un SNAP-25 de origen no natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos contiguos con respecto a la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24.

Un SNAP-25 puede ser un SNAP-25 endógeno o un SNAP-25 exógeno. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "SNAP-25 endógeno" se refiere a un SNAP-25 naturalmente presente en la célula porque está codificado naturalmente dentro del genoma de la célula, tal que la célula inherentemente expresa el SNAP-25 sin necesidad de una fuente externa de SNAP-25 o una fuente externa de material genético que codifica un SNAP-25. La expresión de un SNAP-25 endógeno puede ser con o sin estimulación ambiental como, por ejemplo, la diferenciación celular. Por definición, sólo puede ser un SNAP-25 endógeno un SNAP-25 de origen natural o sus variantes. Por ejemplo, las siguientes líneas celulares establecidas expresan un SNAP-25 endógeno: 2-M17, Kelly, LA1-55n, N1E - 115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108 - 15, PC12, SH - SY5Y, SiMa, SK-N-DZ y SK - N - BE 2-C.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "SNAP-25 exógeno" se refiere a un SNAP-25 expresado en una célula a través de la introducción de una fuente externa de SNAP-25 o una fuente externa de material genético que codifica un SNAP-25 por manipulación humana. La expresión de un SNAP-25 exógeno puede ser con o sin estimulación ambiental como, por ejemplo, diferenciación celular. Como un ejemplo no limitante, las células de una línea celular establecida pueden expresar un SNAP-25 exógeno por transfección transitoria o estable de un SNAP-25. Como otro ejemplo no limitante, las células de una línea celular establecida pueden expresar un SNAP-25 exógeno por transfección de proteína de un SNAP-25. Un SNAP-25 exógeno puede ser un SNAP-25 de origen natural o sus variantes, o un SNAP-25 de origen no natural o sus variantes.

De este modo, en una realización, células de una línea celular establecida expresan un SNAP-25 endógeno. En aspectos de esta realización, el SNAP-25 endógeno expresado por las células de una línea celular establecida es un SNAP-25 de origen natural. En otros aspectos de esta realización, el SNAP-25 endógeno expresado por las células de una línea celular establecida es la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta realización, el SNAP-25 endógeno expresado por las células de una línea celular establecida es un SNAP-25 de origen natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de SNAP-25 o un subtipo de SNAP-25. En otros aspectos de esta realización, el SNAP-25 endógeno expresado por las células de una línea celular establecida es un SNAP-25 de origen natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70% de identidad de aminoácidos, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24.

En otra realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 exógeno. En un aspecto de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 de origen natural. En otros aspectos de esta

realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar el SNAP-25 de origen natural de la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23, o la SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 de origen natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de SNAP-25 o un subtipo de SNAP-25. En otros aspectos más de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 de origen natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70% de identidad de aminoácidos, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24.

En otro aspecto de la realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 de origen no natural. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 de origen no natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea de células establecidas están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 de origen no natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos no contiguos respecto a la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea de células establecidas están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 de origen no natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos contiguos respecto a la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24.

Los ensayos que detectan la escisión de un SNAP-25 después de la exposición a una endopeptidasa redirigida pueden utilizarse para evaluar si una célula está expresando un SNAP-25 endógeno o exógeno. En estos ensayos, se detectaría en las células que expresan un SNAP-25 después del tratamiento con endopeptidasa redirigida la generación de un producto de escisión de SNAP-25. Los ejemplos no limitantes de de análisis de transferencia de Western específicos, así como los reactivos bien caracterizados, condiciones y protocolos están disponibles de proveedores comerciales que incluyen, sin limitación, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; BioRad laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI y Stratagene, Inc., La Jolla, CA. Se entiende que estos y ensayos similares para escisión de SNAP-25 pueden ser útiles en la identificación de las células que expresan un SNAP-25 endógeno o exógeno.

Como ejemplos no limitantes, puede utilizarse análisis de transferencia de Western utilizando un anticuerpo que reconoce un producto de escisión de SNAP-25 o tanto las formas de SNAP-25 escindida como no escindida para ensayo para la captación de la endopeptidasa redirigida. Los ejemplos de anticuerpos α -SNAP-25 útiles para estos ensayos incluyen, sin limitación, anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 SMI-81 (Stemberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 Cl 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 Cl 71.2 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 SP12 (Abcam, Cambridge, MA), antisuero policlonal de conejo α -SNAP-25 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), antisuero policlonal de conejo α -SNAP-25 (AbcamCambridge, MA), y antisuero policlonal de conejo α -SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO).

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un receptor de endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "receptor de endopeptidasa redirigida" se refiere a cualquier recepción endopeptidasa redirigida de origen natural o un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que interactúa preferentemente con una endopeptidasa redirigida de una manera que provoca una respuesta de actividad endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "interactúa preferentemente" se refiere a la constante de disociación

en equilibrio (KD) de endopeptidasa redirigida para un receptor de endopeptidasa redirigida es como mínimo un orden de magnitud inferior a la de la endopeptidasa redirigida para cualquier otro receptor en la superficie celular. La constante de disociación en equilibrio, un tipo específico de la constante de equilibrio que mide la propensión de un complejo endopeptidasa redirigida – receptor de endopeptidasa redirigida para separarse (disociarse) de forma reversible en sus componentes moleculares, es decir la endopeptidasa redirigida y el receptor de endopeptidasa redirigida, se define como $KD = Ka/Kd$ en equilibrio. La constante de asociación (Ka) se define como $Ka = [C]/[L][R]$ y la constante de disociación (Kd) se define como $Kd = [L][R]/[C]$, donde [L] es igual a la concentración molar de endopeptidasa redirigida, [R] es la concentración molar de un receptor de endopeptidasa redirigida, [C] es la concentración molar del complejo endopeptidasa-receptor, y donde están todas las concentraciones de dichos componentes cuando el sistema está en equilibrio. Cuanto menor sea la constante de disociación, más fuertemente unida está la endopeptidasa redirigida a su receptor, o mayor será la afinidad entre endopeptidasa redirigida y el receptor de endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, la constante de disociación de endopeptidasa redirigida para su receptor es como mínimo dos órdenes de magnitud menor, como mínimo tres órdenes de magnitud menor, como mínimo cuatro órdenes de magnitud menor, o como mínimo cinco órdenes de magnitud menor que la de la endopeptidasa redirigida para cualquier otro receptor. En otros aspectos de esta realización, la afinidad de unión de la endopeptidasa redirigida que preferentemente interactúa con su receptor puede tener una constante de disociación en equilibrio (KD) por ejemplo, de 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM o menos 100 nM o menos. En otros aspectos de esta realización, la afinidad de unión de la endopeptidasa redirigida que preferentemente interactúa con su receptor puede tener una constante de disociación en equilibrio (KD) por ejemplo, de 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM o menos de 10 nM o menos. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "provoca una respuesta de actividad endopeptidasa redirigida" se refiere a la capacidad de un receptor de endopeptidasa redirigida para interactuar con una endopeptidasa redirigida para formar un complejo endopeptidasa/ receptor y la posterior internalización de ese complejo en el citoplasma de la célula.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural " se refiere a cualquier receptor de endopeptidasa redirigida producido por un proceso natural, incluyendo, sin limitación, isoformas de receptor de endopeptidasa redirigida producidas a partir de una modificación post-traducciona, una transcripción cortada y empalmada de forma alternativa, o una mutación espontánea y subtipos de receptores de endopeptidasa redirigida. Un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural incluye, sin limitación, receptores de opioides de origen natural como un receptor similar a opioide 1 (ORL1), un receptor opioide δ (DOR), un receptor opioide κ (KOR) y un receptor opioide μ (MOR), tales como los descritos en Christopher Evans y col., *Opioid Receptor Genes*, Patente de los E.E.U.U. 6.265.563; Christopher Evans y col., *Methods of Screening Modulators of Opioid Receptor Activity*, Patente de los E.E.U.U. 6.432.652; Christopher Evans y col., *Opioid Receptors and Methods of Use*, Patente de los E.E.U.U. 7.282.563; y Christopher Evans y col., *Delta Opioid Receptor Proteins*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0219925. Otros ejemplos de un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural incluyen, sin limitación, el receptor de galanina 1, el receptor de galanina 2 y el receptor de galanina 3. En la técnica se conocen receptores opioides de origen natural de otras especies de vertebrados, tales como: por ejemplo, primate, vaca, perro, ratón, rata, pollo, pescado y pueden ser utilizados en aspectos de la presente memoria descriptiva.

Un ORL1 de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 26, o uno que sustituye, deletiona o añade: por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 o la SEQ ID NO: 26. Un DOR de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28, o uno que sustituye, deletiona o añade: por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 o la SEQ ID NO: 28. Un KOR de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 29 y la SEQ ID NO: 30, o uno que sustituye, deletiona o añade: por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 o la SEQ ID NO: 30. Un MOR de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 31 o uno que sustituye, deletiona o añade: por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 31.

Un receptor de galanina 1 de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137 y la SEQ ID NO: 138, o uno que sustituye, deletiona o añade, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137 o la SEQ ID NO: 138. Un receptor de galanina 2 de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 139, o uno que sustituye, deletiona o añade: por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 139. Un receptor de galanina 3 de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 140, o uno que sustituye, deletiona o añade, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, o 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 140.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "variante del receptor de endopeptidasa redirigida receptor de origen no natural" se refiere a cualquier receptor de endopeptidasa redirigida producido con ayuda de manipulación humana o de diseño, incluyendo, sin limitación, un receptor de endopeptidasa redirigida producido por ingeniería genética mediante mutagénesis al azar o diseño racional y un receptor de endopeptidasa redirigida producido por síntesis química.

5 Ejemplos no limitantes de variantes del receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural incluyen, por ejemplo, variantes conservativas del receptor de endopeptidasa redirigida, variantes no conservativas del receptor de endopeptidasa redirigida, variantes quiméricas del receptor de endopeptidasa redirigida y fragmentos activos del receptor de endopeptidasa redirigida.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural" se refiere a cualquier receptor de endopeptidasa redirigida cuya estructura se modificó con la ayuda de manipulación humana, incluyendo, sin limitación, un receptor de endopeptidasa redirigida producido por ingeniería genética mediante mutagénesis al azar o diseño racional y un receptor de endopeptidasa redirigida producido por síntesis química in vitro. Un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural puede sustituir, deleciónar o añadir, por ejemplo, 1 o más, 2 o

15 más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140.

20 De este modo, en una realización, un receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural tal como: por ejemplo, ORL1, DOR, KOR o MOR. En aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es una isoforma del receptor de endopeptidasa redirigida o un subtipo del receptor de endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural es el receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural de la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ

25 ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 31. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70% de identidad de aminoácidos, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 31.

30 En otra realización, un receptor de endopeptidasa redirigida es un no-natural receptor de endopeptidasa redirigida, tal como: por ejemplo, un ORL1 manipulado genéticamente, un DOR manipulado genéticamente, un KOR manipulado genéticamente o un MOR manipulado genéticamente. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70%,

35 como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 31. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos no contiguos respecto a la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 31. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ejemplo, 1 o

40 más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos contiguos respecto a la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 31.

45 En otra realización, un receptor de endopeptidasa redirigida es receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural tal como: por ejemplo, receptor de galanina 1, receptor de galanina 2 o receptor de galanina 3. En aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es una isoforma del receptor de endopeptidasa redirigida o un subtipo del receptor de endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural es el receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural de la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural que tiene, por ejemplo, como

50 mínimo el 70% de identidad de aminoácidos, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140.

55 En otra realización, un receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural, tales como: por ejemplo, un receptor de galanina 1 manipulado genéticamente, un receptor de galanina 2 manipulado o un receptor de galanina 3 manipulado genéticamente. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ejemplo, como

60

mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140. En otros aspectos de esta realización, el receptor endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida no manipulado que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos no contiguos respecto a la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos contiguos respecto a la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140.

Un receptor de endopeptidasa redirigida puede ser un receptor de endopeptidasa redirigida endógeno o un receptor de endopeptidasa redirigida exógeno. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "receptor de endopeptidasa redirigida endógeno" se refiere a un receptor de endopeptidasa redirigida naturalmente presente en la célula dado que está codificado naturalmente dentro del genoma de la célula, tal que la célula inherentemente expresa el receptor de endopeptidasa redirigida sin la necesidad de una fuente externa de receptor de endopeptidasa redirigida o una fuente externa de material genético que codifica un receptor de endopeptidasa redirigida. La expresión de un receptor endógeno de endopeptidasa redirigida puede ser con o sin estimulación ambiental tal como por ejemplo, diferenciación celular o activación del promotor. Por ejemplo, las siguientes líneas celulares establecidas expresan como mínimo un receptor endógeno de endopeptidasa redirigida: P33 AGN, Neuro-2a, SiMa y SK-N-DZ. Un receptor endógeno de endopeptidasa redirigida sólo puede ser un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural o variantes de origen natural del mismo.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "receptor de endopeptidasa redirigida exógeno" se refiere a un receptor de endopeptidasa redirigida expresado en una célula a través de la introducción de una fuente externa de receptor de endopeptidasa redirigida o una fuente externa de material genético que codifica un receptor de endopeptidasa redirigida por manipulación humana. La expresión de un receptor de endopeptidasa redirigida exógeno puede ser con o sin estimulación del medio ambiente tal como, por ejemplo, diferenciación celular o activación del promotor. Como ejemplo no limitante, las células de una línea celular establecida pueden expresar uno o más receptores de endopeptidasa redirigida exógenos mediante la transfección transitoria o estable de una molécula de polinucleótido que codifica un receptor de endopeptidasa redirigida, tal como: por ejemplo, un ORL1, un DOR, un KOR, un MOR, un receptor de galanina 1, un receptor de galanina 2 o un receptor de galanina 3. Como otro ejemplo no limitante, células de una línea celular establecida pueden expresar uno o más receptores de endopeptidasa redirigida exógenos mediante transfección de proteínas de los receptores de endopeptidasa redirigida, tales como: por ejemplo, un ORL1, un DOR, un KOR, un MOR, un receptor de galanina 1, un receptor de galanina 2 o un receptor de galanina 3. Un receptor de endopeptidasa redirigida exógeno puede ser un receptor de endopeptidasa redirigido de origen natural o variantes de origen natural del mismo, o un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural o variantes de origen no natural del mismo.

De este modo, en una realización, células de una línea celular establecida expresan un receptor endógeno de endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, el receptor endógeno de endopeptidasa redirigida expresado por las células de una línea celular establecida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural. En otros aspectos de esta realización, el receptor endógeno de endopeptidasa redirigida expresado por las células de una línea celular establecida es la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140. En otros aspectos de esta realización, el receptor endógeno de endopeptidasa redirigida expresado por las células de una línea celular establecida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural, tal como, por ejemplo, una isoforma del receptor de endopeptidasa redirigida o un subtipo del receptor de endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el receptor endógeno de endopeptidasa redirigida expresado por las células de una línea celular establecida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70% de identidad de aminoácidos, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140.

En otra realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida exógeno. En un aspecto de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140. En otros aspectos más de esta realización, las

- células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural, tal como: por ejemplo, una isoforma del receptor de endopeptidasa redirigida o un subtipo de receptores de endopeptidasa redirigida. En otros aspectos más de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70% de identidad de aminoácidos, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140.
- 5
- 10 En otro aspecto de la realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos no contiguos de la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos contiguos respecto a la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140.
- 15
- 20
- 25
- 30 En otra realización, células de una línea de células establecidas están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un ORL1 exógeno, un DOR exógeno, un KOR exógeno, un MOR exógeno o cualquier combinación de éstos. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un ORL1 de origen natural, un DOR de origen natural, un KOR de origen natural, un MOR de origen natural o cualquier combinación de éstos. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un ORL1 de origen no natural, un DOR de origen no natural, un KOR de origen no natural o cualquier combinación de éstos. En otros aspectos más de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un ORL1 de origen natural o un ORL1 de origen no natural, un DOR de origen natural o un DOR de origen no natural, un KOR de origen natural o un KOR de origen no natural, un MOR de origen natural o un MOR de origen no natural o cualquier combinación de éstos.
- 35
- 40
- En otra realización, células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de galanina 1 exógeno, un receptor de galanina 2 exógeno, un receptor de galanina 3 exógeno o cualquier combinación de éstos. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de galanina 1 de origen natural, un receptor de galanina 2 de origen natural, un receptor de galanina 3 de origen natural o cualquier combinación de éstos. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de galanina 1 de origen no natural, un receptor de galanina 2 de origen no natural, un receptor de galanina 3 de origen no natural, o cualquier combinación de éstos. En otros aspectos más de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de galanina 1 de origen natural o un receptor de galanina 1 de origen no natural, un receptor de galanina 2 de origen natural o un receptor de galanina 2 de origen no natural, un receptor de galanina 3 de origen natural o un receptor de galanina 3 de origen no natural o cualquier combinación de éstos.
- 45
- 50
- 55 Las células que expresan uno o más receptores endógenos o exógenos de endopeptidasa redirigida pueden identificarse por métodos rutinarios incluyendo ensayos directos e indirectos para captación de endopeptidasa redirigida. Pueden utilizarse ensayos que determinan propiedades de unión o captación de endopeptidasa redirigida para evaluar si una célula está expresando un receptor de endopeptidasa redirigida. Dichos ensayos incluyen, sin limitación, ensayos de reticulación utilizando endopeptidasa redirigida marcada, tales como, por ejemplo, [125I] endopeptidasa redirigida, véase, por ejemplo, Noriko Yokosawa y col., Binding of Clostridium botulinum type C neurotoxin to different neuroblastoma cell lines, 57 Infect . Immun. 272-277 (1989); Noriko Yokosawa y col., Binding of botulinum type CI, D and E neurotoxins to
- 60

neuronal cell lines and synaptosomes, 29 *Toxicon* 261-264 (1991); y Tei-ichi Nishiki y col., Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes, 269(14) *J. Biol. Chem.* 10498-10503 (1994). Otros ensayos no limitantes incluyen ensayos inmunocitoquímicos que detectan la unión a endopeptidasa redirigida utilizando anticuerpos marcados o sin marcar, véase, por ejemplo, Atsushi Nishikawa y col., The receptor and transporter for internalization of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin into HT-29 cells, 319(2) *Biochem. Biophys. Res Commun.* 327-333 (2004) y ensayos de inmunoprecipitación, véase, por ejemplo, Yukako Fujinaga y col., Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes, *Microbiology* 150(Pt 5) 1529-1538 (2004), que detectan endopeptidasa redirigida unida utilizando anticuerpos marcados o sin marcar. Los anticuerpos útiles para estos ensayos incluyen, sin limitación, anticuerpos seleccionados contra endopeptidasa redirigida o anticuerpos seleccionados contra un receptor de endopeptidasa redirigida, tal como, por ejemplo, ORL1, DOR, KOR, MOR, receptor de galanina 1, receptor de galanina 2 o receptor de galanina 3. Si el anticuerpo está marcado, la unión de la molécula puede ser detectada por diversos medios, incluyendo el análisis de transferencia de Western, observación microscópica directa de la localización celular del anticuerpo, medición del anticuerpo unido a la célula o sustrato después de una etapa de lavado, citometría de flujo, electroforesis o electroforesis capilar, empleando las técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Si el anticuerpo no está marcado, se puede emplear un anticuerpo secundario marcado para la detección indirecta de la molécula unida y la detección puede proceder como para un anticuerpo marcado. Se entiende que estos ensayos similares que determinan las propiedades o características de captación de endopeptidasa redirigida pueden ser útiles en la identificación de las células que expresan receptores endógenos o exógenos de endopeptidasa redirigida.

Ensayos que monitorizan la liberación de una molécula después de exposición a una endopeptidasa redirigida pueden utilizarse también para determinar si una célula está expresando uno o más receptores de endopeptidasa redirigida endógenos o exógenos. En estos ensayos, la inhibición de la liberación de la molécula se produciría en las células que expresan un receptor de endopeptidasa redirigida después del tratamiento con endopeptidasa redirigida. Ensayos bien conocidos incluyen métodos que miden la inhibición de la liberación de catecolaminas radiomarcadas de neuronas, tales como, por ejemplo, [3H] noradrenalina o la liberación de dopamina [3H], véase por ejemplo, A Fassio y col., Evidence for calcium-dependent vesicular transmitter release insensitive to tetanus toxin and botulinum toxin type F, 90(3) *Neuroscience* 893-902 (1999); Sara Stigliani y col., The sensitivity of catecholamine release to botulinum toxin C1 and E suggests selective targeting of vesicles set into the readily releasable pool, 85(2) *J. Neurochem.* 409-421 (2003), o mide la liberación de catecolamina mediante un procedimiento fluorométrico, véase, por ejemplo, Anton de Paiva y col., A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly, 268(28) *J. Biol. Chem.* 20838-20844 (1993); Gary W. Lawrence y col., Distinct exocytotic responses of intact and permeabilised chromaffin cells after cleavage of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) or synaptobrevin by botulinum toxin A or B, 236(3) *Eur. J. Biochem.* 877-886 (1996); y Patrick Foran y col., Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release, 35(8) *Biochemistry* 2630-2636 (1996). Otros ejemplos no limitantes incluyen ensayos que miden la inhibición de la liberación de la hormona de las células endocrinas, tales como, por ejemplo, pituitaria anterior o células ováricas. Se entiende que estos ensayos similares para la liberación de la molécula pueden ser útiles en la identificación de las células que expresan receptores endógenos o exógenos de endopeptidasa redirigida.

Análisis que detectan la escisión de un sustrato de SNAP-25 después de exposición a una endopeptidasa redirigida también puede utilizarse para evaluar si una célula está expresando uno o más receptores de endopeptidasa redirigida endógenos o exógenos. En estos ensayos, la generación de un producto de escisión de SNAP-25, o la desaparición de la SNAP-25 intacta, se detectaría en las células que expresan un receptor de endopeptidasa redirigida después de un tratamiento con endopeptidasa redirigida. Los ejemplos no limitantes de análisis de transferencia de Western específicos, así como los reactivos bien caracterizados, condiciones y protocolos están disponibles de proveedores comerciales que incluyen, sin limitación, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; BioRad laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI y Stratagene, Inc., La Jolla, CA. Se entiende que estos ensayos similares para escisión de SNAP-25 pueden ser útiles en la identificación de las células que expresan receptores de endopeptidasa redirigida endógenos o exógenos.

Como ejemplos no limitantes, análisis de transferencia de Western utilizando un anticuerpo que reconoce el producto de SNAP-25 escindido o las formas de SNAP-25 tanto escindida como sin escindir pueden utilizarse para ensayar para la captación de una endopeptidasa redirigida. Los ejemplos de anticuerpos α -SNAP-25 útiles para estos ensayos incluyen, sin limitación, anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 CI 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 CI 71.2 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 SP12 (Abcam, Cambridge, MA), antisuero policlonal de conejo α -SNAP-25 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), antisuero policlonal de conejo α -SNAP-25 S9684 (SigmaSt. Louis, MO), y antisuero policlonal de conejo α -SNAP-25 (Abcam, Cambridge, MA).

Aspectos de la presente divulgación proporcionan células que a través de manipulación genética o ingeniería recombinante se les hace expresar un SNAP-25 exógeno y/o uno o más receptores de endopeptidasa redirigida exógenos. Las células útiles para expresar un SNAP-25 exógeno o uno o más receptores de endopeptidasa redirigida exógenos a través de manipulación genética o ingeniería recombinante incluyen células neuronales y células no neuronales que pueden o no expresar un SNAP-25 endógeno o uno o más receptores endógenos de endopeptidasa redirigida. Además, se entiende que dicha células genéticamente manipuladas o manipuladas por vía recombinante pueden expresar un SNAP-25 exógeno y uno o más receptores exógenos de endopeptidasa redirigida bajo control de un elemento promotor, elemento potenciador constitutivo, específico de tejido, específico de células o inducible, o ambos. Se entiende que cualquier célula es útil mientras la célula pueda ser manipulada genéticamente o por vía recombinante para expresar un SNAP-25 exógeno o uno o más receptores de endopeptidasa redirigida exógenos y sea capaz de experimentar actividad endopeptidasa redirigida.

Métodos útiles para introducir en una célula una molécula de Polinucleótido exógena que codifica un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25, tales como: por ejemplo, un SNAP-25, un ORL1, un DOR, un KOR o un MOR, incluyen, sin limitación, métodos de administración mediados químicamente, tales como: por ejemplo, mediado por fosfato de calcio, mediado por dietil-aminoetil (DEAE) dextrano, mediado por lípidos, mediado por polietileneimina (PEI), mediado por polilisina y mediado por polibreno; métodos de administración mediado físicamente, tales como: por ejemplo, suministro mediante partículas biolísticas, Microinyección, fusión de protoplasto y electroporación; y métodos de administración mediado por virus, tales como: por ejemplo, transfección mediada por retrovirus, véase por ejemplo, el documento *Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells*, págs. 16.1-16.62 (Sambrook & Russell, eds., *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Vol. 3, 3ª ed. 2001); Alessia Colosimo y col., *Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells*, (2) *Biotechniques* 314 - 318, 320 - 322, 324 (2000); Philip Washbourne & A. Kimberley McAllister, *Techniques for Gene Transfer into Neurons*, 12 (5) *Curr. Opin. Neurobiol.* 566 - 573 (2002); y *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & sons, págs 9.16.4-9.16.11 (2000). Un experto en la materia entiende que la selección de un método específico para introducir una molécula polinucleotídica en una celda de dependerá, en parte, de si la célula contendrá de forma estable o transitoria un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente a un sustrato de SNAP-25. Ejemplos no limitantes de molécula polinucleotídica que codifica un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25 son los siguientes: molécula polinucleotídica de ORL1 de la SEQ ID NO: 61 o la SEQ ID NO: 62; Molécula polinucleotídica de DOR de la SEQ ID NO: 63 o la SEQ ID NO: 64; Molécula polinucleotídica de KOR de la SEQ ID NO: 65 o la SEQ ID NO: 66; Molécula polinucleotídica de MOR de la SEQ ID NO: 67; molécula polinucleotídica del receptor de galanina 1 de la SEQ ID NO: 141, la SEQ ID NO: 142 o la SEQ ID NO: 143, molécula polinucleotídica del receptor de galanina 2 de la SEQ ID NO: 144, o molécula polinucleotídica del receptor de galanina 3 de la SEQ ID NO: 145 y molécula polinucleotídica de la SNAP-25 de la SEQ ID NO: 68 o la SEQ ID NO: 69.

Métodos de administración mediados químicamente son conocidos por un experto en la materia y se describen en, por ejemplo, Martin Jordan & Florian Worm, *Transfection of Adherent and Suspended Cells by Calcium Phosphate*, 33 (2) *Methods* 136 - 143 (2004); Chun Zhang y col., *Polyethylenimine Strategies for Plasmid Delivery to Brain-Derived Cells*, 33 (2) *Methods* 144 - 150 (2004). Tales métodos de administración mediados químicamente pueden prepararse mediante los procedimientos estándar y están disponibles en el mercado, véase, por ejemplo, el Kit de transfección CellPfect (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); Kit de transfección en mamíferos, fosfato de calcio y DEAE dextrano, (Stratagene, Inc., La Jolla, CA); Reactivo de transfección Lipofectamine™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); kit de transfección ExGen 500 (Fermentas, Inc., Hanover, MD) y kits de transfección SuperFect y Effectene (Qiagen, Inc., Valencia, CA).

Métodos de administración mediados físicamente son conocidos por un experto en la materia y se describen en, por ejemplo, Jeike E. Biewenga y col., *Plasmid-Mediated Gene Transfer in Neurons using the Biolistics Technique* plásmido 71 (1) *J. Neurosci. Methods.* 67 - 75 (1997); John o' Brien & Sarah C. R. Lummis, *Biolistic and Diolistic Transfection: Using the Gene Gun to Deliver DNA and Lipophilic Dyes into Mammalian Cells*, 33 (2) *Methods* 121 - 125 (2004); M. Golzio y col., *In Vitro and In Vivo Electric Field-Mediated Permeabilization*, 33 (2) *Methods* 126 - 135 (2004); y Oliver Greschet y col., *New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells*, 33 (2) *Methods* 151 - 163 (2004).

Métodos de administración mediados por virus son conocidos a un experto en la materia y se describen en, por ejemplo, Chooi M. Lai y col., *Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors*, 21(12) *DNA Cell Biol* 895 - 913 (2002); Ilya Frolov y col., *Alphavirus-Based Expression Vectors: Strategies and Applications*, 93 (21) *Proc. National Acad. sci. E.E.U.U.* "11371 - 11377 (1996); Roland Wolkowicz y col., *Lentiviral Vectors for the Delivery of DNA into Mammalian Cells*, 246 *Methods Mol. Biol.* 391-411 (2004); A. Huser & C. Hofmann, *Baculovirus Vectors: Novel Mammalian Cell Gene-Delivery Vehicles and Their Applications*, 3(1) *Am. J. Pharmacogenomics* 53-63 (2003); Tiziana Tonini y col., *Transient Production of Retroviral- and Lentiviral-Based Vectors for the Transduction of Mammalian Cells*, 285 *Methods Mol. Biol.*) ; Manfred

Gossen & Hermann Bujard, *Tight Control of Gene Expression in Eukaryotic Cells by Tetracycline-Responsive Promoters* patente de E.E.U.U N° 5. 464.758; Hermann Bujard & Manfred Gossen, *Methods for Regulating Gene Expression*, patente de E.E.U.U N° 5.814.618; David S. Hogness, *Polynucleotides Encoding Insect Steroid Hormone Receptor Polypeptides and Cells Transformed With Same*, patente de E.E.U.U N° 5.514.578; David S. Hogness, *Polynucleotide Encoding Insect Ecdysone Receptor*, Patente de los E.E.U.U. 6.245.531; Elisabetta Vegeto y col., *Progesterone Receptor Having C-Terminal Hormone Binding Domain Truncations*, patente de E.E.U.U N° 5.364.791; Elisabetta Vegeto y col., *Mutated Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy*, patente de E.E.U.U N° 5.874.534. Dichos métodos de administración mediados por virus pueden prepararse mediante los procedimientos estándar y están disponibles en el mercado, véase, por ejemplo, el sistema de expresión Adenoviral ViraPower™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y el manual de instrucciones del sistema de expresión adenoviral ViraPower™ 25 - 0543 versión A, Invitrogen, Inc., (15 de julio de 2002); y el sistema vectorial adenoviral AdEasy™ (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) y el manual de instrucciones del sistema vectorial adenoviral AdEasy™ 064004f, Stratagene, Inc. Además, dichos sistemas de vectores virales puede prepararse mediante métodos estándar y están disponibles en el mercado, véase, por ejemplo, los sistemas de expresión génica BD™ Tet - Off y Tet - On (BD Biosciences - Clontech, Palo Alto, CA) y el manual del usuario de los sistemas de expresión génica BD™ Tet - Off y Tet - On, PT3001 - 1, BD Biosciences Clontech, (Mar. 2003), el sistema GeneSwitch™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y el sistema de expresión regulado por mifepristona GeneSwitch™ System A para las células de mamíferos, versión D, 25 - 0313, Invitrogen, Inc., (04 de noviembre de 2002); El sistema de expresión lentiviral ViraPower™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y el manual de instrucciones del sistema de expresión lentiviral ViraPower™ 25 - 0501 versión E, Invitrogen, Inc., (08 de diciembre de 2003); y el sistema de expresión en mamífero inducible retroviral Complet Control® (Stratagene, La Jolla, California) y el manual de instrucciones del sistema de expresión en mamífero inducible retroviral Complete Control®, 064005e.

De este modo, en una realización, células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen una molécula polinucleotídica que codifica un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular en general por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25. En otra realización, células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen una molécula polinucleotídica que codifica una pluralidad de componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo celular en general por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25. En aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen una molécula polinucleotídica que codifica ORL1, DOR, KOR, MOR o SNAP-25. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 61 o la SEQ ID NO: 62 que codifica ORL1. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 63 o la SEQ ID NO: 64 que codifican DOR. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 65 o la SEQ ID NO: 66 que codifican KOR. En otros aspectos más de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 67 que codifica MOR.

En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 141, la SEQ ID NO: 142 o la SEQ ID NO: 143 que codifica el receptor de galanina 1. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 144 que codifica el receptor de galanina 2. En otros aspectos más de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 145 que codifica el receptor de galanina 3. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 68 o la SEQ ID NO: 69 que codifica SNAP-25.

En otra realización, células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable una molécula polinucleotídica que codifica un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25. En otra realización, células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable una molécula polinucleotídica que codifica una pluralidad de componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo celular global por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25. En aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable una molécula polinucleotídica que codifica ORL1, DOR, KOR, MOR o SNAP-25. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 61 o la SEQ ID NO: 62 que codifica ORL1. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a la

actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 63 o la SEQ ID NO: 64 que codifica DOR. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 65 o la SEQ ID NO: 66 que codifica KOR. En otros aspectos más de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 67 que codifica MOR

En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 141, la SEQ ID NO: 142 o la SEQ ID NO: 143 que codifica el receptor de galanina 1. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 144 que codifica el receptor de galanina 2. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 145 que codifica el receptor de galanina 3. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 68 o la SEQ ID NO: 69 que codifica SNAP-25.

Tal como se mencionó anteriormente, un componente exógeno necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25, tales como, por ejemplo, un SNAP-25, un ORL1, un DOR, un KOR, un MOR, un receptor de galanina 1, un receptor de galanina 2 o un receptor de galanina 3, desvelado en la presente memoria descriptiva puede introducirse en una célula. Cualquier método útil para introducir dicho componente exógeno con un agente de administración a una población celular puede ser útil con la salvedad de que este método introduce transitoriamente el componente exógeno desvelado en la presente memoria descriptiva en como mínimo el 50% de las células dentro de una población celular dada. De este modo, aspectos de esta realización pueden incluir una población celular en la cual, por ejemplo, como mínimo el 50%, como mínimo el 60%, como mínimo el 70%, como mínimo el 80% o como mínimo el 90% de la población celular dada transitoriamente contiene un componente exógeno necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25, tal como, por ejemplo, un SNAP-25, un ORL1, un DOR, un KOR, un MOR, un receptor de galanina 1, un receptor de galanina 2 o un receptor de galanina 3, desvelado en la presente memoria descriptiva. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "agente de administración" se refiere a cualquier molécula que permite o favorece la interiorización de un unido covalentemente, unido no covalentemente o unido de cualquier otra manera con un polipéptido en una célula. Por lo tanto, La expresión "agente de administración" incluye, sin limitación, las proteínas, péptidos, peptidomiméticos, pequeñas moléculas, las moléculas polinucleotídicas, liposomas, lípidos, virus, retrovirus y células que, sin limitación, transportan una molécula enlazada covalente o no covalentemente a la membrana de la célula, el citoplasma de las células o el núcleo. Además, se entiende que la expresión "agente de administración" abarca las moléculas que son internalizadas por cualquier mecanismo, incluyendo agentes de administración que funcionan mediante endocitosis mediada por receptores y aquellas que son independientes de endocitosis mediada por receptores.

Un agente de administración también puede ser un agente que permite o mejora la captación celular de un componente enlazado covalentemente, como SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, receptor de galanina 1, receptor de galanina 2 o receptor de galanina 3, tales como: por ejemplo, por conjugación química o por proteínas de fusión producidas genéticamente. Métodos que enlazan covalentemente agentes de administración y métodos de utilización de tales agentes se describen en, por ejemplo, Steven F. Dowdy, *Protein Transduction System and Methods of Use Thereof*, Publicación internacional No WO 00/34308; Gerard Chassaing & Alain Prochiantz, *Peptides which can be Used as Vectors for the Intracellular Addressing of Active Molecules*, patente de E.E.U.U. nº 6.080.724; Alan Frankel y col., *Fusion Protein Comprising TAT-derived Transport Moiety*, patente de E.E.U.U. nº 5.674.980; Alan Frankel y col., *TAT-derived Transport Polypeptide Conjugates*, patente de E.E.U.U. nº 5.747.641; Alan Frankel y col., *TAT-derived Transport Polypeptides and Fusion Proteins*, patente de E.E.U.U. nº 5.804.604; Peter F. J. O'Hare y col., *Use of Transport Proteins* patente de E.E.U.U. nº 6.734.167; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, patente de E.E.U.U. nº 5.807.746; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, patente de E.E.U.U. nº 6.043.339; Yao-Zhong Lin y col., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, patente de E.E.U.U. nº 6.248.558; Yao-Zhong Lin y col., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, patente de E.E.U.U. nº 6.432.680; Jack J. Hawiger y col., *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, patente de E.E.U.U. nº 6.495.518; Yao-Zhong Lin y col., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity* patente de E.E.U.U. nº 6.780.843; Jonathan B. Rothbard & A Paul Wender, *Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes*, patente de E.E.U.U. nº 6.306.993; Jonathan B. Rothbard & A Paul Wender, *Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes*, patente de E.E.U.U. nº 6.495.663; y Pamela B. Davis y col., *Fusion Proteins for Protein Delivery*, Nº de patente US 6.287.817.

Un agente de administración también puede ser un agente que permite o mejora la captación celular de un componente no covalentemente asociado, como SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, receptor de galanina 1, receptor de galanina 2 o receptor de galanina 3. Métodos que funcionan en ausencia de enlace covalente y métodos de utilización de tales agentes se describen en, por ejemplo, Gilles Divita y col, *Peptide-Mediated Transfection Agents and Methods of Use*, patente de E.E.U.U. nº 6.841.535; Philip L Felgner y Olivier Zelphati, *Intracellular Protein Delivery Compositions and Methods of Use*, Publicación de patente de Estados Unidos Nº 2003/0008813; y Michael Karas, *Intracellular Delivery of Small Molecules, Proteins and Nucleic Acids*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2004/0209797. Tales agentes de administración peptídicos pueden ser preparados y utilizados mediante los métodos estándar y están disponibles en el mercado, véase, por ejemplo el reactivo CHARIOT™ (Active Motif, Carlsbad, CA); Reactivo BIO-PORTER® (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA), reactivo de administración proteico BIO TREK™ (Stratagene, La Jolla, California) y reactivo de transfección de proteínas PROJECT™ (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

Aspectos de la presente divulgación constituyen, en parte, una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "muestra que comprende una endopeptidasa redirigida" se refiere a cualquier materia biológica que contiene o potencialmente contiene una endopeptidasa redirigida activa. Una variedad de muestras puede ensayarse según un método establecido en la presente memoria descriptiva incluyendo, sin limitación, endopeptidasa redirigida purificada, parcialmente purificada o no purificada; endopeptidasa redirigida de cadena única recombinante o de doble cadena con una secuencia de origen natural o de origen no natural; endopeptidasa redirigida recombinante con una especificidad de proteasa modificada; endopeptidasa redirigida recombinante con una especificidad celular alterada; endopeptidasa redirigida a granel; un producto de endopeptidasa redirigida formulado; y las células o lisados celulares impuros, fraccionados o parcialmente purificados de por ejemplo, bacterias, levaduras, insectos o fuentes mamíferas; sangre, plasma o suero; alimentos crudos, parcialmente cocinados, cocinados o procesados; bebidas; alimentos para animales; muestras de suelo; muestras de agua; sedimentos de estanque; lociones; cosméticos; y formulaciones clínicas. Se entiende que el término la muestra abarca muestras de tejido, incluyendo, sin limitación, muestras de tejidos de mamíferos, las muestras de tejido de animales como ovejas, muestras de tejido de vaca y cerdo; muestras de tejido de primates; y muestras de tejido humano. Dichas muestras comprenden, sin limitación, muestras intestinales tales como muestras intestinales infantiles, y muestras de tejido obtenidas de una herida. Como ejemplos no limitantes, un método para detectar cantidades picomolares de actividad endopeptidasa redirigida puede ser útil para determinar la presencia o actividad de la endopeptidasa redirigida en una muestra de comida o bebida; ensayar una muestra de un humano o animal, por ejemplo, expuesta a una endopeptidasa redirigida o que tiene uno o más síntomas de botulismo; para seguir la actividad durante la producción y purificación de endopeptidasa redirigida a granel; ensayar un producto de endopeptidasa redirigida formulado utilizado en aplicaciones farmacéuticas o cosméticos; o ensayar un suero sanguíneo del sujeto para la presencia o ausencia de anticuerpos α -endopeptidasa redirigida neutralizantes.

Por lo tanto, en una realización, una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida es una muestra que comprende cualquier cantidad de endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida comprende aproximadamente 100 ng o menos, aproximadamente 10 ng o menos, aproximadamente 1 ng o menos, aproximadamente 100 pg o menos, aproximadamente 10 pg o menos o aproximadamente 1 pg o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida comprende aproximadamente 1 mM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.

Aspectos de la presente divulgación constituyen, en parte, aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "componente de SNAP-25 que comprende un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A" se refiere a un componente celular que contiene el producto de escisión de SNAP-25. Se prevé que cualquier método conveniente para enriquecer o aislar a un componente de SNAP-25 pueda ser útil, incluyendo, sin limitación, protocolos de lisis celular, protocolos de purificación en columna, inmunoprecipitación, purificación por afinidad y cromatografía de proteínas.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un anticuerpo α -SNAP-25 enlazado a un soporte de fase sólida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "soporte de fase sólida" es sinónimo de "fase sólida" y se refiere a cualquier matriz que puede utilizarse para inmovilizar a un anticuerpo α -SNAP-25 desvelado en la presente memoria descriptiva. Ejemplos no limitantes de soportes de fase sólida incluyen, por ejemplo, un tubo; una placa; una columna; clavijas o "tiras reactivas"; una partícula magnética, una perla u otros medios cromatográficos esféricos o fibrosos, como, por ejemplo, agarosa, sefarosa, sílice y plástico; y las láminas o membranas, tales como, por ejemplo, nitrocelulosa y fluoruro de polivinilideno (PVDF). El soporte de fase sólida puede ser construido utilizando una amplia variedad de materiales tales como: por ejemplo, vidrio, carbono, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, diazocelulosa o almidón. El soporte de fase sólida seleccionado puede tener una propiedad física que hace que sea fácilmente separable de material soluble o no unido y generalmente permite que los materiales no unidos,

tales como: por ejemplo, el exceso de reactivos, subproductos de la reacción o disolventes, se separaren o se retiren de otra forma (mediante, por ejemplo, lavado, filtración, centrifugación, etc.) del componente de ensayo unido al soporte de fase sólida. Ejemplos no limitantes de cómo realizar y utilizar un soporte de fase sólida se describen en, por ejemplo, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, *supra*, (2001); y Current Protocols in Molecular Biology, *supra*, (2004).

5 Aspectos de la presente divulgación que incluyen realizaciones de la invención definida por las reivindicaciones comprenden, en parte, detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A y un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Se prevé que pueda utilizarse cualquier sistema de detección para poner en práctica los aspectos de este método basado en inmunología desvelado, con la salvedad de que la relación señal a ruido puede distinguir de manera estadísticamente significativa la señal del complejo antígeno-anticuerpo de la señal de fondo. Ejemplos no limitantes de sistemas de detección de base inmunológica incluyen el análisis de *immunoblot*, como transferencia de Western y *dot-Blot*, análisis de inmunoprecipitación, análisis de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y ELISA en sándwich. La detección de la señal puede lograrse mediante autorradiografía con imaginería o fosforimagería (AU), quimioluminiscencia (CL), electroquimioluminiscencia (ECL), bioluminiscencia (BL), fluorescencia, transferencia de energía de resonancia, polarización en plano, colormétrica o por citometría de flujo (FC). Descripciones de sistemas de detección de base inmunológica se desvelan por ejemplo, en Michael M. Rauhut, Chemiluminescence, en Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (Ed. Grayson, 3^a ed., John Wiley and Sons, 1985); A. W. caballero, A Review of Recent Trends in Analytical Applications of Electrogenenerated Chemiluminescence, Trends Anal. Chem 18: 47-62 (1999); K Fahrnich. A., y col., Recent Applications of Electrogenenerated Chemiluminescence in Chemical Analysis, Talanta 54(4): 531-559 (2001); Commonly Used Techniques in Molecular Cloning, págs. A8.1-A8-55 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Vol. 3, 3^a ed. 2001); Detection Systems, págs. A9.1-A9-49 (Sambrook & Russell, eds., Vol. 3, Molecular Cloning a Laboratory Manual 3^a ed. 2001); Electrogenerated Chemiluminescence, (Ed. Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004).

Un ELISA en sándwich (o inmunoensayo en sándwich) es un método basado en dos anticuerpos, que se unen a diferentes epítopos en el antígeno. Un anticuerpo de captura que tiene una elevada especificidad de unión por el antígeno de interés, está unido a una superficie sólida. El antígeno se añade a continuación seguido por la adición de un segundo anticuerpo conocido como el anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección se une al antígeno en un epítipo diferente que el anticuerpo de captura. El antígeno, por lo tanto, es 'emparedado' entre los dos anticuerpos. La afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno suele ser el principal determinante de la sensibilidad del inmunoensayo. A medida que aumenta la concentración de antígeno, aumenta la cantidad de anticuerpo de detección conduciendo a una mayor respuesta medida. Para cuantificar el grado de unión, pueden utilizarse diferentes sistemas informadores, tales como, por ejemplo, una enzima unida al anticuerpo secundario y un sustrato informador donde la reacción enzimática constituye una lectura como la señal de detección. La señal generada es proporcional a la cantidad de antígeno diana presente en la muestra. El sustrato informador utilizado para medir el evento de unión determina el modo de detección. Un lector de placas espectrofotométrico se utiliza para la detección colorimétrica. Se han desarrollado sustratos quimioluminiscentes y electroquimioluminiscentes que amplifican adicionalmente la señal y pueden leerse en un lector luminescente. El informador también puede ser una lectura fluorescente donde la etapa enzimática del ensayo se sustituye por un fluoróforo y la lectura se mide a continuación mediante un lector fluorescente. Los reactivos y protocolos necesarios para llevar a cabo un ELISA en sándwich con ECL están disponibles en el mercado, incluyendo, sin excepción, la plataforma de detección MSD sandwich ELISA-ECL (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

45 Así, en una realización de acuerdo con la invención definida en las reivindicaciones, detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A y un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede realizarse mediante un análisis *immunoblot*, un análisis de la inmunoprecipitación, un ELISA o un ELISA en sándwich. En aspectos de esta realización, la detección se realiza utilizando un análisis *immunoblot* AU, CL, ECL, o BL, un análisis de inmunoprecipitación AU, CL, ECL, BL, o FC, un ELISA AU, CL, ECL, BL, o FC o un ELISA en sándwich, AU, CL, ECL, BL o FC.

55 Aspectos de la presente divulgación pueden ponerse en práctica de manera singleplex o multiplex. Un método basado en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida practicado de manera singleplex es uno que sólo detecta la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo α -SNAP-25 y un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Un método basado en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida practicado de manera multiplex es uno que detecta de forma concurrente la presencia de dos o más complejos antígeno-anticuerpo; uno de los cuales es el complejo anticuerpo-antígeno que comprende un anticuerpo α -SNAP-25 y un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; y el otro(s) de los cuales es el complejo

antígeno-anticuerpo a una segunda, tercera, cuarta, etc., diferente proteína. Puede utilizarse una segunda proteína, por ejemplo, como control interno para minimizar la variabilidad de muestra a muestra normalizando la cantidad del complejo antígeno-anticuerpo α -SNAP-25/SNAP-25 detectada respecto a la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado para la segunda proteína. Como tal, la segunda proteína generalmente es una que es expresada consistentemente por la célula, tal como una proteína constitutiva. Los ejemplos no limitantes de una segunda útil, incluyen, por ejemplo, una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), sintaxina, citoquinas. Se describen los métodos de realización de un ensayo basado en inmunología en un modo múltiplex por ejemplo, en U. B. Nielsen y B. H. Geierstanger, Multiplexed Sandwich Assays in Microarray Format, *J. Immunol. Methods*, 290 (1 - 2): 107-120 (2004); R. Barry y M. Soloviev, Quantitative Protein Profiling using Antibody Arrays, *Proteomics*, 4 (12): 3717-3726 (2004); M. M. Ling y col., Multiplexing Molecular Diagnostics and Immunoassays using Emerging Microarray Technologies, *Expert Rev Mol Diagn.* 7 (1): 87 - 98 (2007); S. X. Leng y col., ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 63 (8): 879 - 884 (2008).

Así, en una realización, un método basado en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida practicado de manera singleplex sólo detecta la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo α -SNAP-25 y un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. En otra realización, un método basado en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida practicado de manera multiplex detectando de forma concurrente la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo α -SNAP-25 y un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A y como mínimo otro complejo antígeno-anticuerpo para una proteína diferente de SNAP-25, como, por ejemplo, GAPDH o sintaxina.

Aspectos de la presente divulgación, en parte, proporcionan un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida" significa un mamífero que no responde plenamente a una terapia con endopeptidasa redirigida, o muestra un reducido efecto beneficioso de una terapia con endopeptidasa redirigida debido a que la respuesta inmunitaria de ese mamífero, directa o indirectamente, reduce la eficacia de la terapia. Un ejemplo no limitante de eficacia reducida sería la presencia en un mamífero de como mínimo un anticuerpo de neutralizante α -endopeptidasa redirigida que se une a endopeptidasa redirigida de una manera que reduce o evita la especificidad o actividad de la endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "terapia con endopeptidasa redirigida" significa un tratamiento, remedio, cura, curación, rehabilitación o cualquier otro medio de contrarrestar algo indeseable en un mamífero que requiere neuromodulación utilizando endopeptidasa redirigida o administrando a un mamífero una o más dosis controladas de un medicamento, preparación o mezcla de endopeptidasa redirigida que tiene un efecto medicinal, terapéutico, curativo, cosmético, correctivo o cualquier otro efecto beneficioso. La terapia con endopeptidasa redirigida abarca, sin limitación, la utilización de cualquier fragmento de la misma de origen natural o modificado, en cualquier formulación, combinado con cualquier portador o ingrediente activo y administrado mediante cualquier vía de administración.

Aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, una muestra de ensayo obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "muestra" se refiere a cualquier materia biológica que contiene o potencialmente contiene como mínimo un anticuerpo α -endopeptidasa redirigida. Un anticuerpo α -endopeptidasa redirigida puede ser un anticuerpo neutralizante α -endopeptidasa redirigida o un anticuerpo no neutralizante α -endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida" significa cualquier anticuerpo α -endopeptidasa redirigida que, en condiciones fisiológicas, se une a una región de una endopeptidasa redirigida de tal manera que reduzca o prevenga que la endopeptidasa redirigida ejerza su efecto en una terapia con endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpos no neutralizantes α -endopeptidasa redirigida" significa cualquier anticuerpo α -endopeptidasa redirigida que, en condiciones fisiológicas, se une a una región de una endopeptidasa redirigida, pero no impide que la endopeptidasa redirigida ejerza su efecto en una terapia con endopeptidasa redirigida. Se prevé que se puedan utilizar todas y cada una de las muestras que pueden contener anticuerpos α -endopeptidasa redirigida en este método, incluyendo, sin limitación, sangre, plasma, suero y fluido linfático. Además, todos y cada uno de los organismos capaces de generar anticuerpos α -endopeptidasa redirigida contra una endopeptidasa redirigida pueden servir como una fuente para una muestra que incluye, aunque sin limitarse a, aves y mamíferos, como ratones, ratas, cabras, ovejas, caballos, burros, vacas, primates y seres humanos. Se describen ejemplos no limitantes de protocolos específicos para la recogida de sangre y la preparación de suero en, por ejemplo, Marjorie Schaub Di Lorenzo & Susan King Strasinger, BLOOD COLLECTION IN HEALTHCARE (F.A. Davis Company, 2001); y Diana Garza & Kathleen Becán-McBride, PHLEBOTOMY HANDBOOK: BLOOD COLLECTION ESSENTIALS (Prentice Hall, 6a ed., 2002). Estos protocolos son procedimientos de rutina bien al alcance de un experto en la materia y de la enseñanza en el presente documento. Una muestra de ensayo puede obtenerse de un organismo antes de la exposición a una endopeptidasa redirigida, después de un único tratamiento con endopeptidasa redirigida, después de múltiples tratamientos con endopeptidasa redirigida, antes del inicio de la resistencia a la terapia con

endopeptidasa redirigida o después de la aparición de resistencia a la terapia con endopeptidasa redirigida.

Aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, una muestra de control. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "muestra de control" significa cualquier muestra en la que la presencia o ausencia de la muestra de ensayo es conocida e incluye muestras de control tanto positivo como negativo. Con respecto a anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida, una muestra de control negativo puede ser obtenida de un individuo que nunca había sido expuesto a endopeptidasa redirigida y puede incluir, sin limitación, una muestra del mismo individuo que suministra la muestra de ensayo, pero tomada antes de someterse a una terapia con endopeptidasa redirigida; una muestra tomada de un individuo diferente que nunca ha sido expuesto a endopeptidasa redirigida; una muestra reunida tomada de una pluralidad de individuos diferentes nunca expuestos a BoNT/A. Con respecto a anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida, una muestra de control positivo puede obtenerse de un individuo que manifiesta inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida e incluye, sin limitación, individuo que da positivo en un ensayo de pruebas basadas en pacientes; individuo que da positivo en un bioensayo in vivo; e individuo que muestra hiperinmunidad, por ejemplo, un individuo vacunado contra endopeptidasa redirigida.

Además está previsto que los anticuerpos α -endopeptidasa redirigida pueden ser purificados de una muestra. Los anticuerpos α -endopeptidasa redirigida pueden ser purificados de una muestra, utilizando diversos procedimientos incluyendo, sin limitación, cromatografía de proteínas A/G y cromatografía por afinidad. Se describen ejemplos no limitantes de protocolos específicos para purificar anticuerpos de una muestra en, por ejemplo, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1998); USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL: PORTABLE PROTOCOL NO. I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998); y clonación MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, *supra*, (2001). Además, ejemplos no limitantes de métodos de purificación de anticuerpos, así como reactivos bien caracterizados, condiciones y protocolos están disponibles de proveedores comerciales que incluyen, sin limitación, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; y Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA. Estos protocolos son procedimientos de rutina al alcance de un experto en la materia.

Así, en una realización, una muestra comprende sangre. En el aspecto de esta realización, la muestra comprende sangre de ratón, sangre de rata, sangre de cabra, sangre de oveja, sangre de caballo, sangre de burro, sangre de vaca, sangre de primate o sangre humana. En otra realización, una muestra comprende plasma. En un aspecto de esta realización, una muestra de ensayo comprende plasma del ratón, plasma de rata, plasma de cabra, plasma de oveja, plasma de caballo, plasma de burro, plasma de vaca, plasma de primate o plasma humano. En otra realización, una muestra comprende suero. En un aspecto de esta realización, la muestra comprende suero de ratón, suero de rata, suero de cabra, suero de oveja, suero de caballo, suero de burro, suero de vaca, suero de primate y suero humano. En otra realización, una muestra comprende líquido linfático. En el aspecto de esta realización, una muestra comprende líquido linfático de ratón, líquido linfático de rata, líquido linfático de cabra, líquido linfático de oveja, líquido linfático de caballo, líquido linfático de burro, líquido linfático de vaca, líquido linfático de primate o líquido linfático humano. En otra realización, una muestra es una muestra de ensayo. En otra realización, una muestra es una muestra de control. En aspectos de esta realización, una muestra de control es una muestra de control negativo o una muestra de control positivo.

Aspectos de la divulgación actual proporcionan, en parte, comparación de la cantidad de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A detectada en la etapa (d) con la cantidad de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ de la enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A detectada en la etapa (e). En una realización, la cantidad de producto de escisión de SNAP-25 en la muestra es mayor en comparación con la cantidad de producto de escisión de SNAP-25 en la muestra de control. En un aspecto de esta realización, una mayor cantidad de producto de escisión de SNAP-25 en la muestra en comparación con una muestra de control positivo indica una reducción o falta de inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en el mamífero. En otro aspecto de esta realización, una cantidad equivalente de producto de escisión de SNAP-25 en la muestra en comparación con una muestra de control negativo indica una reducción o falta de inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en el mamífero. En otra realización, la cantidad de producto de escisión de SNAP-25 en la muestra es menor en comparación con la cantidad de producto de escisión de SNAP-25 en la muestra de control. En un aspecto de esta realización, una cantidad equivalente o inferior del producto de escisión de SNAP-25 en la muestra en comparación con una muestra de control positivo indica un aumento o presencia de inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en el mamífero. En otro aspecto de esta realización, una menor cantidad de producto de escisión de SNAP-25 en la muestra en comparación con una muestra de control negativo indica un aumento o presencia de inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en el mamífero.

Se prevé que todas y cada una de las condiciones de ensayo convenientes para detectar la presencia de un anticuerpo neutralizante α -endopeptidasa redirigida en una muestra sean útiles en los métodos desvelados en la presente memoria descriptiva, tales como, por ejemplo, condiciones de ensayo lineales y condiciones de ensayo no lineales. En una realización, las condiciones de ensayo son lineales. En un aspecto de esta realización, la cantidad de ensayo de una

endopeptidasa redirigida está en exceso. En otro aspecto de esta realización, la cantidad de ensayo de una endopeptidasa redirigida es limitante de la velocidad. En otro aspecto de esta realización, la cantidad de ensayo de una muestra de ensayo es limitante de la velocidad.

5 Aspectos de la presente divulgación también pueden ser descritos como sigue:

1. Un método de detección de reorientarse actividad endopeptidasa, comprendiendo el método las etapas de de: a) tratar una célula de de una línea celular establecida con una muestra que comprende endopeptidasa redirigida, en el que la célula de una célula establecida es susceptible a la actividad endopeptidasa redirigida de endopeptidasa redirigida; b) 10 aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; c) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo 15 α -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad endopeptidasa redirigida.

2. Un método de detección de actividad endopeptidasa redirigida que incluye un método de la invención según lo definido por las reivindicaciones, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar a una célula de una línea celular establecida con 20 una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida, en el que las células de una línea celular establecida son susceptibles a la actividad endopeptidasa redirigida por una endopeptidasa redirigida; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; c) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 enlazado a un soporte de fase sólida, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 une un epítipo que comprende un 25 extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad endopeptidasa redirigida.

3. Un método de detección de actividad endopeptidasa redirigida, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar a una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida, en el que las células de una línea celular establecida son susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida por endopeptidasa redirigida; b) 30 aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; c) fijar el componente de SNAP-25 a un soporte de fase sólida; d) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; y e) detectar la presencia de un complejo 35 antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad endopeptidasa redirigida.

4. Un método de detección de actividad endopeptidasa redirigida, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida, en el que las células de una línea celular establecida pueden captar endopeptidasa redirigida; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace 40 escindible del sitio de escisión de BoNT/A; c) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; en el que la 45 detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad endopeptidasa redirigida.

5. Un método de detección de actividad endopeptidasa redirigida, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida, en el que las células de una línea celular establecida pueden captar endopeptidasa redirigida; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace 50 escindible del sitio de escisión de BoNT/A; c) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 enlazado a un soporte de fase sólida, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad endopeptidasa 55 redirigida.

60

6. Un método de detección de actividad endopeptidasa redirigida, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida, en el que las células de una línea celular establecida pueden captar endopeptidasa redirigida; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; c) fijar el componente de SNAP-25 en un soporte de fase sólida; d) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; y e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad endopeptidasa redirigida.

7. Un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una endopeptidasa redirigida a una muestra de ensayo obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de ensayo, en el que las células de una línea celular establecida son susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ de enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; d) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de ensayo, comprendiendo la muestra de control negativo una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida; y g) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con respecto a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida.

8. Un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una endopeptidasa redirigida a una muestra de ensayo obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida; b) tratar a una célula de una línea celular establecida con la muestra de ensayo, en el que las células de una línea celular establecida son susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; d) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 enlazado a un soporte de fase sólida, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -endopeptidasa redirigida y el producto de escisión de SNAP-25; f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de ensayo, comprendiendo la muestra de control negativo una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida; y g) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con respecto a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida.

9. Un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una endopeptidasa redirigida a una muestra de ensayo obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de ensayo, en el que las células de una línea celular establecida son susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; d) fijar el componente de SNAP-25 a un soporte de fase sólida; e) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; f) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; g) repetir las etapas b-f con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de ensayo, comprendiendo la muestra de control negativo endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida; y h) comparar la cantidad de complejos antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f con la cantidad del complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa g, en el que la detección de

una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f en relación con la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en la etapa g es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida.

5 10. Un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una endopeptidasa redirigida a una muestra de ensayo obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de ensayo, en el que las células de una línea celular establecida pueden captar endopeptidasa redirigida; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; d) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de ensayo, comprendiendo la muestra de control negativo una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida; y g) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con respecto a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida.

11. Un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir endopeptidasa redirigida a una muestra obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida; b) tratar a una célula de una línea celular establecida con la muestra de ensayo, en el que las células de una línea celular establecida pueden captar endopeptidasa redirigida; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; d) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 enlazado a un soporte de fase sólida, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de ensayo, comprendiendo la muestra de control negativo una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida; y g) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con respecto a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida.

12. Un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una endopeptidasa redirigida a una muestra de ensayo obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida; b) tratar a una célula de una línea celular establecida con la muestra de ensayo, en el que las células de una línea celular establecida pueden captar endopeptidasa redirigida; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; d) fijar el componente de SNAP-25 a un soporte de fase sólida; e) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; f) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; g) repetir las etapas b-f con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de ensayo, comprendiendo la muestra de control negativo una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida; y h) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa g, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f con respecto a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectada en la etapa g es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida.

13. El método de 1-3 y 7-9, en el que la célula es susceptible a actividad endopeptidasa redirigida por aproximadamente 500 nM o menos, por aproximadamente 400 nM o menos, por aproximadamente 300 nM o menos, por aproximadamente 200 nM o menos, por aproximadamente 100 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.

60

14. El método de 4-6 y 10-12, en el que la célula puede captar aproximadamente 500 nM o menos, por aproximadamente 400 nM o menos, por aproximadamente 300 nM o menos, por aproximadamente 200 nM o menos, por aproximadamente 100 nM o menos de endopeptidasa redirigida.
- 5 15. El método de 1-6, en el que la muestra comprende aproximadamente 100 ng o menos, aproximadamente 10 ng o menos, aproximadamente 1 ng o menos, 100 fg o inferior, o menos, 10 fg o menos, o 1 fg o menos de una endopeptidasa redirigida.
- 10 16. El método de 1-6, en el que la muestra comprende aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos, o aproximadamente 0,1 nM o menos, de una endopeptidasa redirigida.
- 15 17. El método de 1-12, en el que la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo se detecta mediante un análisis inmunoblot, un análisis de inmunoprecipitación, un ELISA o un ELISA en sándwich
18. El método de 1-12, en el que el método tiene una relación señal a ruido para la asíntota inferior de como mínimo 3:1, como mínimo 5:1, como mínimo 10:1, como mínimo 20:1, como mínimo 50:1, o como mínimo 100:1.
- 20 19. El método de 1-12, en el que el método tiene una relación señal a ruido para la asíntota superior de como mínimo 10:1, como mínimo 20:1, como mínimo 50:1, como mínimo 100:1, como mínimo 200:1, como mínimo 300:1, como mínimo 400:1, como mínimo 500:1 o como mínimo 600:1.
- 25 20. El método de 1-12, en el que el método puede detectar la actividad CE₅₀ de, por ejemplo, como mínimo 100 ng, como mínimo 50 ng, como mínimo 10 ng, como mínimo 5 ng, como mínimo 100 pg, como mínimo 50 pg, como mínimo 10 pg, como mínimo 5 pg, como mínimo 100 fg, como mínimo 50 fg, como mínimo 10 fg, o como mínimo 5 fg de endopeptidasa redirigida.
- 30 21. El método de 1-12, en el que el método puede detectar la actividad CE₅₀ de, por ejemplo, como mínimo 10 nM, como mínimo 5 nM, como mínimo 100 nM, como mínimo 50 nM, como mínimo 10 nM, como mínimo 5 nM, como mínimo 1 nM, como mínimo 0,5 nM o como mínimo 0,1 nM de endopeptidasa redirigida.
- 35 22. El método de 1-12, en el que el método tiene un LOD de, por ejemplo, 10 pg o menos, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una endopeptidasa redirigida.
- 40 23. El método de 1-12, en el que el método tiene un LOD de, por ejemplo, 100 nM o menos, 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM o menos, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM o menos o 10 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.
- 45 24. El método de 1-12, en el que el método tiene un LOQ de, por ejemplo, 10 pg o menos, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una endopeptidasa redirigida.
- 50 25. El método de 1-12, en el que el método tiene un LOQ de, por ejemplo, 100 nM o menos, 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM o menos, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM o menos o 10 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.
- 55 26. El método de 1-12, en el que el método puede distinguir una endopeptidasa redirigida totalmente activa de una endopeptidasa redirigida parcialmente activa que tiene el 70% o menos, el 60% o menos, el 50% o menos, el 40% o menos, el 30% o menos, el 20% o menos o el 10% o menos la actividad de la endopeptidasa redirigida totalmente activa A.
27. El método de 1 a 12, que incluyen un método de la invención según lo definido por las reivindicaciones, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 une un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25.
- 60 28. El método de 27, en donde el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una constante de velocidad de asociación para un epítipo que no comprende una glutamina carboxilo terminal del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A del producto de escisión de SNAP-25 de menos de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; y en el que el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una constante de disociación en equilibrio para el epítipo de menos de 0,450 nM.

- 5 29. El método de 27 que incluye un método de la invención según lo definido por las reivindicaciones, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEQ ID NO: 72, la SEQ ID NO: 74, la SEQ ID NO: 76, la SEQ ID NO: 80 y la SEQ ID NO: 82; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEQ ID NO: 84, la SEQ ID NO: 86, la SEQ ID NO: 88, la SEQ ID NO: 90 y la SEQ ID NO: 92.
- 10 30. El método de 27, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado como mínimo comprende la V_H CDR1 de la SEQ ID NO: 93, la V_H CDR1 de la SEQ ID NO: 94, la V_H CDR1 de la SEQ ID NO: 95, la V_H CDR1 de la SEQ ID NO: 118, la V_H CDR1 de la SEQ ID NO: 119 o la V_H CDR1 de la SEQ ID NO: 120.
32. El método de 27, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado como mínimo comprende la V_H CDR2 de la SEQ ID NO: 96, la V_H CDR2 de la SEQ ID NO: 97, la V_H CDR2 de la SEQ ID NO: 98, la V_H CDR2 de la SEQ ID NO: 99, la V_H CDR2 de la SEQ ID NO: 121, la V_H CDR₂ de la SEQ ID NO: 122, o la V_H CDR2 de la SEQ ID NO: 123.
- 15 33. El método de 27, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado como mínimo comprende la V_H CDR3 de la SEQ ID NO: 100, la V_H CDR3 de la SEQ ID NO: 101, la V_H CDR3 de la SEQ ID NO: 102, o la V_H CDR3 de la SEQ ID NO: 124.
- 20 34. El método de 27, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado como mínimo comprende la V_L CDR1 de la SEQ ID NO: 103, la V_L CDR1 de la SEQ ID NO: 104, la V_L CDR1 de la SEQ ID NO: 105, la V_L CDR1 de la SEQ ID NO: 106, la V_L CDR₁ de la SEQ ID NO: 107, la V_L CDR1 de la SEQ ID NO: 125, la V_L CDR1 de la SEQ ID NO: 126, la V_L CDR1 de la SEQ ID NO: 127, la V_L CDR1 de la SEQ ID NO: 128, o la V_L CDR1 de la SEQ ID NO: 129.
- 25 35. El método de 27, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado como mínimo comprende la V_L CDR2 de la SEQ ID NO: 108, la V_L CDR2 de la SEQ ID NO: 109, la V_L CDR2 de la SEQ ID NO: 110, la V_L CDR2 de la SEQ ID NO: 111 o la V_L CDR2 de la SEQ ID NO: 112.
- 30 36. El método de 27, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado como mínimo comprende la V_L CDR3 de la SEQ ID NO: 113, la V_L CDR3 de la SEQ ID NO: 114, la V_L CDR3 de la SEQ ID NO: 115, la V_L CDR3 de la SEQ ID NO: 116 o la V_L CDR3 de la SEQ ID NO: 117.
37. El método de 27, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 93, la SEQ ID NO: 121 y la SEQ ID NO: 100; y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 105, la SEQ ID NO: 110 y la SEQ ID NO: 115.
- 35 38. El método de 27, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado se une selectivamente al epítipo de SNAP-25 de la SEQ ID NO 32, la SEQ ID NO 33, la SEQ ID NO 34, la SEQ ID NO 35, la SEQ ID NO 36, la SEQ ID NO 37, la SEQ ID NO 147 o la SEQ ID NO 148
- 40 39. El método de 27, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado se une selectivamente al epítipo de SNAP-25 de la SEQ ID NO. 39, la SEQ ID NO 40, la SEQ ID NO 41, la SEQ ID NO 42, la SEQ ID NO 43 o la SEQ ID NO 44

Ejemplo I

- 45 Cribado de líneas celulares candidatas para la expresión del receptor endógeno de endopeptidasa redirigida

El siguiente ejemplo ilustra cómo identificar las líneas celulares establecidas que poseen la capacidad de captación de endopeptidasa redirigida necesaria para el desarrollo de un ensayo de potencia basado en células

- 50 **1. Crecimiento del cultivo madre de líneas celulares candidatas.**

Para hacer crecer a las líneas celulares, una densidad adecuada de las células de la línea celular que está siendo ensayadas se sembraron en un matraz de cultivo tisular de 162 cm² que contenía 30 ml de medio de cultivo adecuado (véase la tabla 1) y se cultivaron en una incubadora a 37°C al 5% o al 10% de dióxido de carbono hasta que las células alcanzaron la densidad deseada

55

Tabla 1. Medios utilizados en el cribado de la línea celular.	
Línea celular	Composición de los medios de cultivo del suero
Clones SiMa y SiMa	RPMI 1640, suero fetal bovino al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%, L-glutamina 2 mM
PC12	RPMI 1640, suero fetal bovino termoinactivado al 5%, suero equino al 10%, GlutaMAX™ 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina-estreptomicina al 1%
N18 ND8/34 NG108-15	DMEM al 90%, suero fetal bovino termoinactivado al 10%, glutamina 2 mM, glucosa 2 mM
SK-N-DZ SK-N-F1 SK-N-SH	DMEM al 90%, suero fetal bovino termoinactivado al 10%, glutamina 4 mM, glucosa 4 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 1,5 g/l de NaHCO ₃
BR(2)-C SK-N-BE(2) SH-SY5Y	EMEM (11090 - 081, Gibco), F12 de Ham (11765 - 054, Gibco), suero fetal bovino termoinactivado al 10%, de glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM,
ND3, CD7, ND15	Medio DMEM con glutamina 2 mM (Invitrogen, Cat # 11885), suero fetal bovino al 10% (Invitrogen, Cat #. 16140) y 1 x antibiótico/antimicótico
Neuro-2a	EMEM, suero fetal bovino termoinactivado al 10%, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 1,5 g/l de NaHCO ₃ , piruvato de sodio 1 mM

2. Cribado de células que expresan receptores diana en la superficie de la célula.

5 Las líneas celulares se cribaron para la presencia del receptor diana deseado mediante citometría de flujo y/o ensayos de unión a ligando. Aunque los siguientes ejemplos utilizan reactivos para identificar receptores opioideos o similares a opioideos en la membrana plasmática, los enfoques desvelados a continuación pueden utilizarse para identificar el receptor cognado para cualquier endopeptidasa redirigida.

10 a. Identificación de líneas celulares mediante citometría de flujo.

Para identificar células que comprenden líneas celulares establecidas que expresan receptores diana para una endopeptidasa redirigida en la superficie celular, se realizó análisis de citometría de flujo. Se cultivaron células para cada línea celular candidata tal como se describe en la sección 1, se trataron con tripsina, se lavaron en tampón de tinción que comprendía 1 x PBS, BSA al 0,5%, y se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en tampón de tinción y se transfirieron aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células a tubos nuevos, dos para cada receptor ensayado. Para cribar en busca de presencia de un receptor opioideo similar a opioideo, aproximadamente 2,0-5,0 μ l de α -ORL-1 RA14133 (Neuromics, Edina, MN), anticuerpo policlonal de conejo α -DOR RA10101 (Neuromics, Edina, MN), anticuerpo policlonal de conejo α -KOR RA10103 (Neuromics, Edina, MN) o anticuerpo policlonal de conejo α -MOR RA10104 (Neuromics, Edina, MN), se añadieron a un tubo y la mezcla se incubó a 4°C durante 1 hora. El segundo tubo se incubó a 4°C durante 1 hora sin anticuerpos y sirvió como control negativo. Después de la incubación del anticuerpo, se añadieron 1,0 ml de tampón de tinción a cada tubo y se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 minutos. El precipitado de células se lavó una vez más con 1,0 ml de tampón de tinción. El precipitado de células se resuspendió en 200 μ l de tampón de tinción y se añadieron 2,0 μ l de anticuerpo de cabra anti-conejo IgG FITC a cada tubo y se incubó a 4°C durante 1 hora en la oscuridad. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, se añadió 1,0 ml de tampón de tinción a cada tubo y se centrifugó a 1200 rpm durante 3 minutos. El precipitado de células se lavó una vez más con 1,0 ml de tampón de tinción y el sedimento se resuspendió en 500 μ l de tampón de tinción. La muestra se analizó mediante un citómetro de flujo y los datos se mostraron como una superposición de la tinción de anticuerpo anti-receptor sobre la tinción de IgG FITC de conejo.

Los resultados indican que de las líneas celulares ensayadas, ORL-1 se expresaba en la superficie celular de aproximadamente el 50% de las células que comprendían las líneas celulares establecidas SiMa, SiMa P > 33, clon H10,

CD7, y SK-N-DZ; se expresó en la superficie celular de entre aproximadamente el 25% a aproximadamente el 50% de las células que comprendían líneas celulares establecidas SH-SY5Y y ND15; y se expresó en la superficie celular de menos de aproximadamente el 25% de las células que comprendían las líneas celulares establecidas ND3, ND8, N18 y Neuro-2a (tabla 2). Los resultados también indican que KOR se expresaba en la superficie celular de aproximadamente el 50% de las células que comprendían líneas celulares establecidas SH-SY5Y y CD7; se expresaba en la superficie celular de entre aproximadamente el 25% y aproximadamente el 50% de las células que comprendían líneas celulares establecidas SiMa clon H10, SiMa P > 33, ND15 y Neuro-2a; y se expresaba en la superficie celular de menos de aproximadamente el 25% de las células que comprendían las líneas celulares establecidas ND3, ND8 y N18 (tabla 2). Los resultados también revelaron que MOR se expresaba en la superficie celular de aproximadamente el 50% de las células que comprendían líneas celulares establecidas CD7, ND15 y SiMa P > 33; se expresaba en la superficie celular de entre aproximadamente el 25% y aproximadamente el 50% de las células que comprendían líneas celulares establecidas SH-SY5Y, SiMa clon H10, ND8 y Neuro-2a y se expresaba en la superficie celular de menos de aproximadamente el 25% de las células que comprendían líneas celulares establecidas ND3 y N18 (tabla 2) El anticuerpo policlonal de conejo α -DOR RA10101 no funcionó correctamente y no se generaron datos utilizables.

b. Identificación de líneas celulares utilizando unión al ligando.

Para identificar las células que comprenden líneas celulares establecidas que expresan receptores diana para una endopeptidasa redirigida en la superficie celular, se realizaron análisis de unión al ligando. células de las líneas celulares candidatas a ensayar se sembraron en una placa de 96 pocillos de fondo negro-transparente durante aproximadamente 4 horas para promover la unión para cribar en busca de la presencia de un receptor opioideo o similar a opioideo, el medio fue aspirado de cada pocillo y sustituido por 50 μ l de solución de ligando que contenía 0 (control sin tratar), 0,001 nM, 0,01 nM, 0,1 nM, o 1 nM de FAM-nociceptina (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA), o 0 (control sin tratar), 0,001 nM, 0,01 nM, 0,1 nM, o 1 nM de FAM-dinorfina (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA). Las células se incubaron con la solución de ligando durante 1 hora en la incubadora a 37°C en de dióxido de carbono al 5%. Las células fueron lavadas para eliminar el ligando un unido lavando las células tres veces con 100 μ l de 1x PBS. La placa fue escaneada en el dispositivo Typhoon (Ex 488 y Em 520 nm) y a continuación se leyó en el lector de placas M5 (Ex 495 y Em 520 nm) para señales de RFU. Los resultados indican que las células que comprenden las líneas celulares establecidas SiMa clon H10, SH-SY5Y y SK-N-DZ se unieron a nociceptina, mientras que las células que comprenden SiMa clon H10 también se unían a dinorfina (tabla 2)

Tabla 2. Líneas celulares que expresan receptores diana en la superficie celular

Receptor diana	Líneas celulares identificadas				
	Citometría de flujo			Unión a Ligando	
	Más del 50% expresión	Del 25% al 50% expresión	Menos del 50% expresión	Nociceptina	Dinorfina A
ORL-1	AGN P33, SiMa, SiMa clon H10, CD7, SK-N-DZ	SH-SY5Y, ND15	ND3, ND8, N18, Neuro-2a	SiMa clon H10, SH-SY5Y, SK - N-DZ	-
DOR	ND	ND	ND	ND	ND
KOR	SH-SY5Y, CD7	SiMa clon H10, AGN P33, ND15, Neuro-2a	ND3, ND8, N18	-	SiMa clon H10
MOR	CD7, ND15, AGN P33	SH-SY5Y, SiMa clon H10, ND8, Neuro-2a	ND3, N18	ND	ND

Utilizando un enfoque similar, líneas celulares que comprenden células que tienen receptores cognados para otras endopeptidasas redirigidas pueden ser identificadas marcando con FAM los dominios diana de estas endopeptidasas y cribando líneas celulares tal como se ha descrito anteriormente.

3. Cribado de dosis única de líneas celulares candidato utilizando una molécula de endopeptidasa redirigida.

Para determinar si una línea celular fue capaz de captar la molécula de endopeptidasa redirigida apropiada, una densidad

de células adecuada de un cultivo madre de la línea celular que está siendo ensayada se colocó en los pocillos de las placas de cultivo tisular de 24 pocillos que contenían 1 ml de medio de cultivo sérico apropiado (tabla 1). Las células se cultivaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que las células alcanzaron la densidad deseada (aproximadamente de 18 a 24 horas). Para evaluar la captación de una endopeptidasa redirigida a opiodes, el medio de crecimiento fue aspirado de cada pocillo y se reemplazó por 1) medio de cultivo fresco que no contenía endopeptidasa redirigida a opioides (línea celular no tratada) o 2) medio de cultivo fresco que contenía 30 nM para la endopeptidasa redirigida a nociceptina (Noc/A) o 100 nM para la endopeptidasa redirigida al dinorfina (Dyn/A) (línea celular tratada). Después de una incubación durante una noche, las células se lavaron aspirando el medio de cultivo y aclarando cada pocillo con 200 µl de 1x PBS. Para recoger las células, el 1 x PBS se aspiró, las células se lisaron añadiendo 50 µl de tampón de carga 2 x SDS, el lisado se transfirió a un tubo de ensayo limpio y la muestra se calentó a 95°C durante 5 minutos.

Para detectar la presencia tanto de sustrato de SNAP-25 no escindido como productos de SNAP-25 no escindido, una alícuota de cada muestra recogida se analizó mediante transferencia de Western. En este análisis, una alícuota de 12 µl de la muestra recogida se separó por electroforesis en gel de poli(acrilamida) MOPS utilizando geles de poli bis- tris(acrilamida) prefabricados NuPAGE® Novex al 12% (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) en condiciones desnaturizantes, reductoras. Los péptidos separados se transfirieron desde el gel a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) por transferencia de Western utilizando un aparato de transferencia celular electroforética semiseca TRANS - BLOT SD® (Bio - Rad Laboratories, Hercules, CA). Las membranas de PVDF se bloquearon mediante incubación a temperatura ambiente durante 2 horas en una solución que contenga solución salina tamponada con tris (TBS) (ácido 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiolclorhídrico 25 mM (Tris - HCl) (pH 7,4), cloruro de sodio 137 mM, cloruro de potasio 2,7 mM), TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)), albúmina de suero bovino al 2% (BSA), leche desnatada en polvo al 5%. Las membranas bloqueadas se incubaron a 4°C durante una noche en TBS, TWEEN - 20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)), BSA al 2% y leche desnatada en polvo al 5% que contiene 1) una dilución 1:5.000 de un anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 como el anticuerpo primario (SMI-81; Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD); o 2) una dilución 1:5.000 del antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 S9684 como el anticuerpo primario (Sigma, St. Louis, MO). Tanto α-SNAP-25 monoclonal de ratón como los anticuerpos policlonales de conejo pueden detectar el sustrato de SNAP-25 no escindido como el producto de escisión de SNAP-25, permitiendo la evaluación de la expresión global de SNAP-25 en cada línea celular y el porcentaje de SNAP-25 escindido después –del tratamiento con endopeptidasa redirigida como parámetro para evaluar la cantidad de captación de endopeptidasa redirigida. Las transferencias sondeadas con anticuerpo se lavaron tres veces durante 15 minutos cada vez en TBS, TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Las membranas lavadas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en TBS, TWEEN - 20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)), BSA al 2% y leche desnatada en polvo al 5% que contenía 1) una dilución 1:10.000 de inmunoglobulina G anti-ratón policlonal de cabra, anticuerpo de cadenas pesadas y ligeras (IgG, H + L) conjugado con peroxidasa de rábano (Zymed, South San Francisco, CA) como un anticuerpo secundario; o 2) una dilución 1:10.000 de la inmunoglobulina G policlonal de conejo anti-cabra, anticuerpo de cadenas pesadas y ligeras (IgG, H + L) conjugado con peroxidasa de rábano (Zymed, South San Francisco, CA) como un anticuerpo secundario. Las transferencias sondeadas con anticuerpo secundario se lavaron tres veces durante 15 minutos cada vez en TBS, TWEEN-20® al 0 1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). La detección de señales de los productos marcados de SNAP-25 se visualizó utilizando el sistema de detección por transferencia de Western ECL Plus™ (GE HealthcareAmersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se formó una imagen de la membrana y el porcentaje de escindidos se cuantificó con un Typhoon 9410 Variable Mode Imager y un software Imager Analysis (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La elección del tamaño del píxel (100 a 200 píxeles) y ajustes del voltaje PMT (350 a 600, normalmente 400) dependían de la transferencia individual

En base a la detección del producto de escisión de SNAP-25, las siguientes líneas celulares exhibían captación de Noc/A 30 nM, ser 2-C, N18TG2, Neuro-2a, SiMa, SK-N-BE-2-C y SK - N - DZ (tabla 3), mientras que las siguientes líneas celulares exhibían captación de Dyn/A 100 nM, N18TG2, Neuro-2a, PC12 y SiMa. Algunas de estas líneas celulares sensibles se ensayaron con dosis más bajas de compuestos y/o con respuestas a dosis completa.

Tabla 3. Cribado de dosis única de líneas celulares candidatas utilizando Noc/A y Dyn/A redirigidas

Línea celular	Descripción	Fuente	Captación de Noc/A 30 nM	Captación de Dyn/A 100 nM
BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2268	Sí	NT
N18TG2	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 103	Sí	Sí

ND3	Neuroblastoma de ratón / neonatal primaria rata híbrido DRG	ECACC 92090901	NDA	NDA
ND7/23	Neuroblastoma de ratón / primario híbrido DRG rata	ECACC 92090903	No	No
ND8	Neuroblastoma de ratón / neonatal primaria rata híbrido DRG	ECACC 92090904	NDA	NDA
ND15	Neuroblastoma de ratón / neonatal primaria rata híbrido DRG	ECACC 92090907	No	No
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-131	Sí	Sí
NG108-15	Híbrido de glioma de rata neuroblastoma ratón	ECACC 88112302	No	NT
PC12	Feocromocitoma de rata	ATCC CRL-1721	NT	Sí
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266	No	NT
SiMa	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 164	Sí	Sí
SK-N-BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2271	Sí	NT
SK-N-DZ	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2149	Sí	NT
SK-N-F1	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2142	No	NT
SK-N-SH	Neuroblastoma humano	ECACC 86012802	No	NT
NT no ensayada NDA: Ninguna cantidad detectable de SNAP-25 se detectó en esta línea celular				

Utilizando un enfoque similar, pueden evaluarse líneas celulares que comprenden células que tienen receptores cognados para otras endopeptidasas redirigidas para la captación de endopeptidasa redirigida

5 Ejemplo II

Cribado de la expresión del receptor endógeno de endopeptidasa redirigida en líneas celulares clonales candidatas

1. Cribado de endopeptidasa redirigida de dosis única de células clonales candidatas de una línea celular SiMa parental.

La solicitud de patente correspondiente Zhu Hong y col., *Cell Lines Useful in Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, solicitud de patente de los E.E.U.U. No de serie: 61/160.199 desvela líneas celulares clonales derivadas de una línea celular SiMa parental que fueron útiles en un ensayo de potencia de BoNT/A, tal como se describe en el documento Ester Fernandez-Salas, y col., *Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, solicitud de patente de los E.E.U.U. No de serie: 12/403.531. Para determinar si estas líneas celulares clonales fueron capaces de captar la endopeptidasa redirigida apropiada, cada una se cribó utilizando un ensayo ELISA en sándwich de ECL.

Para preparar un lisado tratado con endopeptidasa redirigida, una densidad adecuada de las células de un cultivo madre de la línea celular que está siendo ensayada se colocó en los pocillos de las placas de 96 pocillos de cultivo tisular que contiene 100 µl de un medio de cultivo sérico apropiado (tabla 1) durante una noche. El medio de las células sembradas se aspiró de cada pozo y se sustituyó por medio fresco que contenía 30 nM de una endopeptidasa redirigida Noc/A u 80 nM de una endopeptidasa redirigida Dyn/A. Después de una incubación de 24 horas, las células se lavaron aspirando el medio de cultivo y aclarando cada pocillo con 200 µl de 1 x PBS. Para recoger las células, se aspiró 1 x PBS, las células se lisaron mediante la adición de 30 µl de tampón de lisis que comprendía Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM,

EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1% de cada pocillo y la placa se incubó en un agitador que giraba a 500 rpm durante 30 minutos a 4°C. La placa se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C para que sedimenten los restos celulares y el sobrenadante se trasladó a una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpos de captura para efectuar la etapa de detección.

5

Para preparar una solución de de anticuerpo de captura α -SNAP-25₁₉₇, el anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25₁₉₇ contenido en las ascitis de la línea celular de hibridoma 2E2A6 (ejemplo XI) se purificó utilizando un protocolo estándar de purificación de la proteína A.

10

Para preparar una solución de anticuerpo de detección α -SNAP-25, se conjugó anticuerpo policlonal de conejo α -SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) con reactivo de marcado éster de rutenio (II)-tris-bipiridina (4-metilsulfonato) NHS (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) según las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). La reacción de conjugación se realizó añadiendo a 30 μ l de agua destilada, solución madre de MSD SULFO - TAG™ reconstituido a 200 μ l de 2 mg/ml de anticuerpos policlonales α -SNAP-25 e incubando la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas en la oscuridad. Los anticuerpos marcados se purificaron utilizando un protocolo de columna de centrifugado estándar y la concentración de proteína se determinó mediante un ensayo colorimétrico estándar de la proteína. Se midió la absorbancia del conjugado de anticuerpo α -SNAP-25 /MSD SULFO - TAG™ a 455 nm con un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. La solución de anticuerpo de detección se almacenó a 4°C hasta que sea necesario. El almacenamiento a largo plazo de alícuotas no utilizadas era a -20°C.

15

20

Para preparar un soporte de fase sólida de α -SNAP-25 que comprende un anticuerpo de captura α -SNAP-25₁₉₇, se añaden aproximadamente 5 μ l de la solución de anticuerpo monoclonal α -SNAP-25₁₉₇ correspondiente (20 μ g/ml de 1x PBS) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos MSD High Bind y se permite que la solución se seque al aire en una cabina de seguridad biológica durante 2 - 3 horas para evaporar el líquido de la solución. Las placas bloqueadas se sellaron y se almacenaron a 4°C hasta que fueran necesarias.

25

30

Para detectar la presencia de un producto de SNAP-25 escindido mediante ELISA en sándwich con ECL, los pocillos unidos a anticuerpo de captura se bloquearon a continuación añadiendo 150 μ l de tampón de bloqueo que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y de suero de cabra al 10% (VWR, West Chester, PA) a temperatura ambiente durante 2 horas. El tampón de bloqueo se aspiró, se añadieron 25 μ l de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida a cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante una noche. Los pocillos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y aclarando cada pocillo tres veces con 200 μ l de 1 x PBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)) después del lavado, se añadieron 25 μ l de solución de anticuerpo de detección α -SNAP-25 al 5 μ g/ml que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en 1x PBS TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)) a cada pocillo, se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación después de la incubación del anticuerpo de detección α -SNAP-25, los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de 1x PBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después de lavar, se añadieron 150 μ l de 1 x tampón de lectura (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y las placas se leyeron utilizando un lector de imágenes SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Los datos sin procesar se recopilaron utilizando el aparato ECL Imager.

35

40

45

Los resultados indican que la línea celular parental SiMa, así como la línea celular clonal H10 mostraban una buena captación de la endopeptidasa redirigida Noc/A (tabla 4). Además, estos resultados revelan que muchas líneas celulares exhibieron captación de la endopeptidasa redirigida Dyn/A (tabla 4). Tres líneas celulares clonales (1E11, AF4 y DC4) mostraron buena captación de la endopeptidasa redirigida Dyn/A, once líneas celulares clonales (1E3, 2 D 2, 2D6 3D8, 5C10, 5F3, BB10, BF8, CG8, CG10 y DE7) exhibían captación moderada de endopeptidasa redirigida Dyn/A; y (3B8, 2B9, CE6, YB8, 4C8, 2F5, YF5, DD10, AC9, CD6) mostraban captación mínima de la endopeptidasa redirigida Dyn/A. Algunas de estas líneas celulares candidatas se ensayaron en un ensayo de respuesta a la dosis completa con la correspondiente endopeptidasa redirigida

Tabla 4. Cribado de Dosis única de líneas celulares candidatas utilizando endopeptidasa redirigida Noc/A y Dyn/A

Línea celular	Captación de Noc/A 30 nM	Captación de Dyn/A 80 nM
AGN P33	+++	NT
A10	-	NT
D11	-	NT
H1	-	-

ES 2 440 597 T3

H10	+++	-
1 D4	NT	-
2E4	NT	-
3D 5	NT	-
3G 10	NT	-
4 D3	NT	-
BB3	NT	-
CC11	NT	-
DF5	NT	-
YB7	NT	-
BE3	NT	-
4B5	NT	-
2B9	NT	+
2F5	NT	+
3B8	NT	+
4C 8	NT	+
AC9	NT	+
CD6	NT	+
CE6	NT	+
DD10	NT	+
YB8	NT	+
YF5	NT	+
1E3	NT	++
2D 2	NT	++
2D 6	NT	++
3 D8	NT	++
5 C10	NT	++
5F3	NT	++
BF8	NT	++
BB10	NT	++
CG8	NT	++
CG10	NT	++
DE7	NT	++
1E11	NT	+++
AF4	NT	+++
DC4	NT	+++
NT: No probado -: sin captación +: captación mínima; ++: captación moderada, +++: buena captación		

2. Cribado de respuesta a dosis completa de líneas celulares candidatas.

Las líneas celulares establecidas señaladas anteriormente, se evaluaron posteriormente utilizando una respuesta a la dosis completa de la endopeptidasa redirigida apropiada. Se sembraron células de las diferentes líneas celulares en placas de 96 pocillos y se expusieron a diferentes concentraciones de Noc/A (0,014 nM, 0,4 nM, 1,23 nM, 3,7 nM, 11,1 nM, 33,3 nM y 100 nM) o de Dyn/A (0,017 nM, 0,05 nM, 0,15 nM, 0,45 nM, 1,4 nM, 4,1 nM, 12 nM, 37 nM, 111 nM, 333 nM y 1000 nM) durante 24 horas. El medio que contenía endopeptidasa redirigida se retiró a continuación y se reemplazó por medio completo fresco. Las placas se incubaron 24 horas en CO₂ al 5% a 37°C para permitir que la escisión de SNAP-25. Las células se lisaron en el tampón de lisis (tabla 5) y las placas se centrifugaron para retirar los restos. Los lisados se utilizaron en un ensayo de transferencia de Western o en un ELISA en sándwich.

Para el análisis de transferencia de Western, las muestras fueron analizadas para detectar la presencia tanto del SNAP-25 intacto como del producto de escisión SNAP-25 tal como se describe en el ejemplo I.

Para el ELISA en sándwich, placas de ELISA recubiertas con anticuerpo monoclonal 2E2A6 fueron bloqueadas con 150 µl de tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de retirar el tampón de bloqueo, se añadieron 25 µl de lisado celular a cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante 2 horas. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se añadieron 25 µl de anticuerpo de detección pAb anti-SNAP25 marcado con SULFO-TAG NHS-Éster 5 µg/ml en reactivo de bloqueo al 2% en PBS-T a la parte inferior de los pocillos. Las placas se sellaron y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora, seguida de tres lavados con PBS-T. Una vez completados los lavados, se añadieron 150 µl de 1 x tampón de lectura por pocillo y la placa se leyó en el lector de imágenes SI6000 para determinar la sensibilidad de cada una de las líneas celulares ensayadas y el valor de CE₅₀ se calculó para cada línea celular. Los valores para la endopeptidasa redirigida Noc/A se resumen en la tabla 5. La respuesta a la dosis completa de endopeptidasa redirigida Dyn/A se realizó solamente en PC12 y clon AF4. En ambos casos el ensayo no alcanzó una asíntota superior y un no pudo calcularse un CE₅₀. La dosis más baja que produce una señal para el clon AF4 era de 12 nM para ambas líneas celulares.

Línea celular	Descripción	Fuente	Captación CE ₅₀ de Noc/A	Captación CE ₅₀ de Dyn/A
AGN P33	Neuroblastoma humano	-	5-10 nM	NT
BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2268	NT	NT
N18TG2	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 103	NT	NT
N18	Neuroblastoma de ratón	ECACC 88112301	> 100 nM	NT
ND3	Neuroblastoma de ratón / Híbrido DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090901	NDA	NT
CD7/23	Neuroblastoma de ratón / Híbrido DRG de rata primario	ECACC 92090903	> 100 nM	NT
ND8	Neuroblastoma de ratón / Híbrido DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090904	NDA	NT
ND15	Neuroblastoma de ratón / Híbrido DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090907	> 100 nM	NT
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-131	30 nM	NT
NG108-15	Híbrido de glioma de rata neuroblastoma ratón	ECACC 88112302	NT	NT

PC12	Feocromocitoma rata	ATCC CRL-1721	NT	> 1000 nM
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266	NT	NT
SiMa	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 164	30 nM	NT
Clon siMa AF4	Neuroblastoma humano	-	NT	> 300 nM
Clon siMa H1	Neuroblastoma humano	-	> 100 nM	NT
Clon siMa H10	Neuroblastoma humano	-	20 nM	NT
SK-N-SER 2-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2271	NT	NT
SK-N-DZ	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2149	0.5-2 nM	NT
SK-N-F1	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2142	> 100 nM	NT
SK-N-SH	Neuroblastoma humano	ECACC 86012802	> 100 nM	NT
NT no ensayado. NDA: Ninguna cantidad detectable de SNAP-25 se detectó en esta línea celular				

Utilizando un enfoque similar, pueden cribarse líneas celulares clonales compuestas por células que tienen receptores cognados para otras endopeptidasas redirigidas y evaluarse para captación de endopeptidasa redirigida

5 **Ejemplo III**

Evaluación de condiciones de crecimiento en captación de endopeptidasa redirigida en líneas celulares candidatas

10 El ejemplo siguiente ilustra cómo determinar las condiciones de cultivo, crecimiento y diferenciación, para las líneas celulares establecidas que maximizan la captación de endopeptidasa redirigida.

1. Efectos de la diferenciación celular y factores tróficos sobre captación de endopeptidasa redirigida de líneas celulares candidatas.

15 Para determinar si la diferenciación celular o la presencia de factores tróficos en los medios de cultivo mejoraba la captación de endopeptidasa redirigida, se ensayaron a líneas celulares que exhibían buena captación de Noc/A con diferentes composiciones de medios. Una densidad adecuada de células de un cultivo madre de la línea celular SiMa P >

30 que estaba siendo ensayada se colocó en los pocillos de las placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían 100 µl de un medio libre de suero que contenía RPMI1640, Penicilina-estreptomocina al 1%, L-glutamina 2 mM, suplementado con B27 y N2 o 100 µl de un medio libre de suero que contenía RPMI1640, penicilina-estreptomocina al 1%, L-glutamina 2 mM suplementado con B27, N2 y NGF (Factor de crecimiento nervioso, 100 ng/ml). Estas células se incubaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que las células se diferenciaban, según la evaluación de los criterios morfológicos estándar y de rutina, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente de 1 a 2 días) como control, una densidad adecuada de las células de un cultivo de la línea celular que está siendo ensayada se colocó en los pocillos de las placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían 100 µl de medio de cultivo adecuado (tabla 1) sin o con NGF (100 ng/ml). Estas células indiferenciadas de control fueron cultivadas en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que las células llegan a la densidad deseada (aproximadamente de 18 a 24 horas). Los medios de ambos y cultivos de control diferenciado e indiferenciado se aspiraron de cada pocillo y se reemplazaron por medios frescos que contenían 0 (muestra no tratada) o diferentes concentraciones de Noc/A (0,14, 0,4, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3 y 100 nM) después de un tratamiento de 24 horas, las células fueron lavadas y se incubaron durante 24 horas en medio libre de endopeptidasa redirigida con el fin de aumentar la cantidad de SNAP25₁₉₇ producido. Las Células producidas se lavaron y recogieron para el ensayo ELISA en sándwich ECL, tal como se describe en el ejemplo II.

También se ensayaron los efectos de factores tróficos en la línea celular SK-N-DZ. Células de SK-N-DZ se sembraron en una placa de 96 pocillos recubierta con poli-D-lisina a 25.000 células por pocillo en ocho diferentes medios SM (tabla 6) durante 72 horas. Las células fueron tratadas en los mismos ocho medios con Noc/A a dosis de 0,03 nM, 3 nM y 30 nM. Después de unas 24 horas de tratamiento, las células fueron lavadas y se incubaron durante 24 horas en medio libre de endopeptidasa redirigida con el fin de aumentar la cantidad de producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ producido. Las células se lavaron y se recogieron a continuación para el ensayo de la transferencia de Western tal como se describe en el ejemplo I.

La diferencia no tuvo ningún efecto sobre la captación de Noc/A en la línea celular SiMa > P30 aunque parecía mejorar la captación en la línea celular SK-N-DZ. El medio basal tenía un efecto significativo sobre la captación de Noc/A en la línea celular SK-N-DZ con RPMI1640 que comprendía factores tróficos N2 y B27 siendo la mejor combinación. La presencia de NGF en el medio no parece mejorar la captación en las dos líneas celulares ensayadas.

Tabla 6. Efectos de factores tróficos y de diferenciación celular sobre la captación de Noc/A de líneas celulares candidatas.

Indiferenciado	Diferenciado	Captación de CE50 NOC/A	
		AGN P33	SK-N-DZ
DMEM, 10% FBS	-	NT	> 30 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27	-	NT	3 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27, NGF	-	NT	3 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27, RA	-	NT	> 30 nM
RPMI1640, 10% FBS	-	NT	10 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27	-	7,2 nM	1 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27, NGF	-	9,1 nM	1 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27, RA	-	NT	10 nM
-	RPMI1640, N2, B27	10,2 nM	1 nM
-	RPMI1640, N2, B27, NGF	9,8 nM	0,6 nM

NGF: Factor de crecimiento nervioso, RA ácido retinoico NT: no ensayado

Utilizando un enfoque similar, se pueden evaluar las condiciones de crecimiento y diferenciación de líneas celulares clonales que comprenden células que tienen receptores cognados para otras endopeptidasas redirigidas

Ejemplo IV

Desarrollo de líneas celulares establecidas que expresan receptores exógenos de endopeptidasa redirigida

- 5 El ejemplo siguiente ilustra cómo preparar una línea celular establecida que expresa un receptor exógeno para endopeptidasa redirigida

1. Transfección del receptor diana en células que comprenden una línea celular candidata.

- 10 La endopeptidasa redirigida Noc/A comprende el dominio de dirección a nociceptina que es el ligando natural del Receptor similar a opioideo 1 (ORL-1). Para obtener una construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierto para un ORL-1, la construcción de expresión pReceiver-M02/ORL-1 se obtuvo de GeneCopoeia (GeneCopoeia, Germantown, MD).

- 15 Como alternativa, se puede sintetizar una molécula polinucleotídica basada en una secuencia de aminoácidos de ORL - 1 (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 25 o SEQ ID NO 26) empleando los procedimientos estándar (BlueHeron © Biotechnology, Bothell, WA). Oligonucleótidos de 20 a 50 bases de longitud se sintetizan mediante síntesis en fosforamida estándar. Estos oligonucleótidos se hibridarán en dupletes de cadena doble que se enlazan entre sí para ensamblar la molécula polinucleotídica de longitud completa. Esta molécula polinucleotídica se clonará utilizando métodos de biología molecular estándar en un vector pUCBHB1 en el sitio SmaI para generar pUCBHB1/ORL-1. La molécula polinucleotídica sintetizada es verificada por secuenciación utilizando Big Dye Terminator™ Chemistry 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Si se desea, una molécula polinucleotídica de expresión optimizada basada en una secuencia de aminoácidos de ORL - 1 (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 25 o SEQ ID NO 26) puede ser sintetizada para mejorar la expresión en una cepa de Escherichia coli. La molécula polinucleotídica que codifica ORL - 1 puede modificarse para 1) contener codones sinónimos típicamente presentes en moléculas polinucleotídicas nativas de una cepa de Escherichia coli, 2) contener un contenido de G + C que coincida de la manera más estrecha al contenido de G + C promedio de moléculas polinucleotídicas nativas que se encuentran en una cepa de Escherichia coli, 3) reducir las regiones polimínucleotídicas dentro de la molécula polinucleotídica; o 4) eliminar sitios regulatorios o estructurales internos encontrados dentro de la molécula polinucleotídica, véase, por ejemplo, Lance E. Steward y col., *Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type A*, publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0057575 (06 de marzo de 2008); y Lance E. Steward y col., *Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type E*, publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0138893 (12 de junio de 2008). Una vez completada la optimización de la secuencia, oligonucleótidos de 20 a 50 bases de longitud se sintetizan mediante síntesis con fosforamida estándar. Estos oligonucleótidos se hibridación en dupletes de cadena doble que se enlazan entre sí para ensamblar la molécula polinucleotídica de longitud completa. Esta molécula polinucleotídica es clonada utilizando métodos de biología molecular estándar en un vector de pUCBHB1 en el sitio de SmaI para generar pUCBHB1/ORL-1. La molécula polinucleotídica sintetizada es verificada por secuenciación del ADN. Si así se desean, puede realizarse la optimización de la expresión de un organismo diferente, tal como: por ejemplo, una cepa de levadura, una línea celular de insecto o una línea celular de mamífero, véase, por ejemplo, Steward, publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0057575, *supra*, (2008); y Steward, publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0138893, *supra*, (2008). Las moléculas polinucleotídicas ejemplares que codifican un ORL - 1 incluyen la SEQ ID NO: 61 y la SEQ ID NO: 62.

- Para construir una construcción de expresión que codifica un ORL-1, una construcción pUCBHB1/ORL-1 será digerida con endonucleasas de restricción que 1) escindieron la molécula polinucleotídica que codifica del marco de lectura abierto de ORL-1; y 2) permitieron que esta molécula polinucleotídica se uniera de forma operativa a un vector pcDNA3 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). Este inserto se subclonó mediante un procedimiento de T4 ADN ligasa en un vector pcDNA3 que será digerido con endonucleasas de restricción apropiadas para producir pcDNA3/ORL-1. La mezcla de ligamiento se transformará en células de E. coli BL21(DE3) electrocompetentes (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD) utilizando un método de electroporación y las células se sembrarán en placas de agar de Luria Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contenían 50 µg/ml de ampicilina y se sembrarán en una incubadora a 37°C para crecimiento durante una noche. Las bacterias que contienen las construcciones de expresión se identificarán como colonias resistentes a ampicilina. Las construcciones candidato se aislarán utilizando un procedimiento de min-preparación de plásmido por lisis alcalina y serán analizadas mediante mapeo de digestión con e endonucleasa de restricción para determinar la presencia y la orientación del inserto. Esta estrategia de clonación produjo una construcción de expresión pcDNA3 que comprende la molécula polinucleotídica que codifica un ORL-1.

- La endopeptidasa redirigida Dyn/A comprende el dominio de dirección a dinorfina que es el ligando natural del receptor opioideo κ (KOR). Para obtener una construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierto para un ORL-1, la construcción de expresión pReceiver-M02/KOR-1 fue obtenida de GeneCopoeia (GeneCopoeia, Germantown, MD). Como alternativa, pueden sintetizarse construcciones de expresión que codifican KOR y subclonarse utilizando un enfoque similar al descrito para producir la construcción de expresión pcDNA3.1/KOR. Secuencias de aminoácidos de

KOR ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 29 y la SEQ ID NO: 30; Moléculas polinucleotídicas ejemplares que codifican un KOR incluyen la SEQ ID NO: 65 y la SEQ ID NO: 66.

5 Pueden utilizarse estrategias de clonación similares para preparar construcciones de expresión que codifican otros receptores de endopeptidasa redirigida, tales como: por ejemplo, pcDNA3.1/DOR o pcDNA3.1/MOR, pcDNA3.1/receptor de galanina 1, pcDNA3.1/ receptor de galanina 2 o pcDNA3.1/receptor de galanina 3. Las secuencias de aminoácidos de DOR ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28; las secuencias de aminoácidos de MOR ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 31 las secuencias de aminoácidos del receptor de galanina 1 ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137 y la SEQ ID NO: 138; las secuencias de aminoácidos del receptor de galanina 2 ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 139; y las secuencias de aminoácidos del receptor de galanina 3 ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 140. moléculas polinucleotídicas ejemplares que codifican un DOR incluyen la SEQ ID NO: 63 y la SEQ ID NO: 64; moléculas polinucleotídicas ejemplares que codifican un MOR incluyen la SEQ ID NO: 67; moléculas polinucleotídicas ejemplares que codifican un receptor de galanina 1 incluyen la SEQ ID NO: 141, la SEQ ID NO: 142 y la SEQ ID NO: 143; moléculas polinucleotídicas ejemplares que codifican un receptor de galanina 2 incluyen la SEQ ID NO: 144; y moléculas polinucleotídicas ejemplar que codifican un receptor de galanina 3 incluyen la SEQ ID NO: 145.

20 Para introducir una construcción de expresión que codifica un receptor de endopeptidasa redirigida, líneas celulares fueron transfectadas con una construcción de expresión que codifica un receptor de endopeptidasa redirigida. Para transfectar una línea celular con un receptor opioideo o similar a opioideo, las células de una línea celular candidata fueron sembradas a una densidad de 1×10^7 células en un matraz recubierto de T₁₇₅ Colágeno IV y se cultivaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que las células llegan a la densidad deseada. Se prepara una solución de transfección de 4,2 ml añadiendo 4 ml de medio de suero reducido OPTI-MEM que contenía 200 µl de LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos a 4 ml de medio de suero reducido OPTI-MEM que contenía 20 µg de un pReceiver-M02/ORL-1 o 20 µg de pReceiver-M02/KOR-1. Esta transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. El medio fue reemplazado por 8 ml de medio fresco libre de suero y libre de antibióticos y la solución de transfección se añadió a las células. A continuación, las células se incubaron en un incubador a 37° C en dióxido de carbono al 5% durante aproximadamente 16-18 horas. El medio de transfección fue reemplazado por medio de cultivo fresco y las células se incubaron una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5%. Después de 24 horas, los medios de cultivo fueron reemplazados por medio de cultivo fresco que contenía el antibiótico G418 a 1 mg/ml en el medio de cultivo (medio de selección) y las células se incubaron durante 7 días. El medio de selección fue cambiado cada semana para un total de 4 semanas (alrededor del 90% células murieron y fueron retiradas durante los cambios semanales del medio).

35 La líneas celulares candidatas transfectadas con el receptor ORL-1 incluían las líneas celulares SiMa > P30, ND15, CD7, NG108-T15 y SK-N-DZ. Las líneas celulares candidatas transfectadas con el receptor KOR-1 incluían las líneas celulares SiMa, SiMa > P30, ND15, CD7, NG108-T15 y SK-N-DZ. Las células transfectadas NG108-T15 no sobrevivieron a la selección en G418.

40 **2. Cribado de dosis única y respuesta a la dosis de líneas celulares transfectadas estables utilizando moléculas de endopeptidasa redirigida.**

45 Las células de las líneas celulares candidatas transfectadas y seleccionadas en la sección anterior se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina o colágeno IV a 1×10^5 células/pocillo en medio RPMI1640 que contenía suplementos N2 y B27 y NGF (50-100 ng/ml) durante 20 ± 4 horas antes del tratamiento con el compuesto. Entonces, las células transfectadas de forma estable con el receptor ORL - 1 fueron tratadas con endopeptidasa redirigida Noc/A a 30 nM en el mismo medio durante 24 ± 2 horas, excepto para la línea celular SK-N-DZ que fue tratada a 10 nM. Las células se lisaron en 120 µl de tampón de lisis y 20 µl del lisado se mezclaron con 2 x tampón SDS para el ensayo de transferencia de Western que se realizó como se ha detallado en el ejemplo I. Todas las líneas celulares mostraban un aumento de la captación del compuesto de Noc/A redirigida cuando se transfectaban con el receptor ORL-1 (Tabla 7).

50

		No transfectadas	Transfectadas
AGN P33	Neuroblastoma humano	20%	40%
SK-N-DZ	Neuroblastoma humano	25% @ 10 nM	40% @ 10 nM
NDT	Neuroblastoma de ratón e híbrido de células DRG de rata	10%	42%
ND15	Neuroblastoma de ratón e híbrido de células DRG de rata	8%	20%
NG108-T15	Neuroblastoma ratón/híbrido de glioma de rata	Ninguna célula sobrevive	Ninguna célula sobrevive

5 Las células de las líneas celulares candidato transfectadas y seleccionadas en la sección anterior se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina o colágeno IV a 1×10^5 células/pocillo en medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% y suplementos N2 y B27 durante 20 ± 4 horas antes del tratamiento con el compuesto. Las células transfectadas de forma estable con el receptor KOR-1 fueron tratadas con la endopeptidasa redirigida Dyn/A a 100 nM en el mismo medio durante 24 ± 2 horas. Las células se lisaron en 120 μ l de tampón de lisis y 20 μ l del lisado se mezclaron con 2 x tampón SDS para el ensayo de transferencia de Western que fue realizado tal como se detalla en el ejemplo I. Todas las líneas celulares muestran aumento de la captación del compuesto de Dyn/A redirigida cuando se transfectaban con el receptor humano KOR-1

3. Selección de líneas celulares clonales transfectadas de forma estable que exhiben alta sensibilidad por dilución sucesiva

15 El ejemplo siguiente muestra cómo identificar las células clonales de una línea celular establecida transfectada de forma estable que son susceptibles a la acción de endopeptidasa redirigida o tienen capacidad de captación de endopeptidasa redirigida.

20 Para la clonación de célula única de las células seleccionadas descrita anteriormente, se empleó el método de clonación de línea celular de dilución limitada. Las células se tripsinizaron, se contaron, se diluyeron para conseguir 0,5-1 células / 100 μ l y se sembraron en medio de selección en cinco placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina a 100 μ l por pocillo. Las células se incubaron durante más de dos semanas hasta que se formaron colonias en el fondo del pocillo. Las colonias positivas procedentes de células individuales fueron marcadas. Se tomaron fotos de clones derivados de una sola célula con una cámara de microscopio. Las células de pocillos con clones individuales se cultivaron durante una semana adicional y se transfirieron a placas de 24 pocillos aproximadamente 4 semanas después de que empezara la clonación.

30 Para la selección de clones, el parámetro principal utilizado para cribar para clones positivos fue la mayor cantidad de escisión de SNAP-25 obtenida después de tratamiento con Noc/A o Dyn/A medida utilizando el análisis de transferencia de Western con el anticuerpo que reconoce SNAP-25 tanto intacto como escindido. Clones que sobreexpresan ORL-1 fueron ensayados con endopeptidasa redirigida Noc/A 10 nM y 30 nM durante una noche tan pronto como suficientes células estuvieron disponibles (tabla 8). Los clones que sobreexpresan KOR-1 fueron ensayados con endopeptidasa redirigida Dyn /A 100 nM durante una noche (tabla 9). Además, los clones que sobreexpresan KOR-1 fueron ensayados en el ensayo de unión a dinorfina tal como se ha descrito en el ejemplo I.

35

Línea celular	Número de clones	Captación de Noc/A 10 nM	Captación de Noc/A 30 nM	Segundo cribado a 1 nM (% escindido)
AGN P33	1	+	+	28%
AGN P33	2	++	+++	50%
AGN P33	3	-	+	NT
AGN P33	4	ND	ND	NT
AGN P33	5	-	+	31%

ES 2 440 597 T3

AGN P33	6	++	+++	60%
AGN P33	7	+	+	14%
AGN P33	8	+	+	NT
AGN P33	9	+	+	38%
AGN P33	10	+	++	29%
AGN P33	11	+	+	NT
AGN P33	12	+	+	27%
ND7	1 C11	NT	++	NT
ND7	2F3	NT	-	NT
ND7	1D 10	NT	-	NT
ND7	1F9	NT	-	NT
ND7	1 G10	NT	-	NT
ND7	2D 8	NT	-	NT
ND7	2E2	NT	-	NT
ND7	4B7	NT	+++	NT
ND7	3 C11	NT	-	NT
ND7	3C 3	NT	+	NT
ND7	3E8	NT	-	NT
ND7	3E11	NT	-	NT
NDT	2G 3	NT	-	NT
ND7	4 D5	NT	+	NT
ND7	4D 8	NT	+	NT
NDT	4 C8	NT	-	NT
NDT	4C 9	NT	+++	NT
ND7	4E8	NT	+	NT
ND7	2E6	NT	++	NT
ND7	4F4	NT	+++	NT
ND7	5D 6	NT	-	NT
ND7	5 G3	NT	-	NT
ND7	4 D5	NT	++	NT
ND15	1C 10	NT	+	NT
ND15	1F10	NT	++	NT
ND15	2 D8	NT	++	NT
ND15	2E11	NT	-	NT
ND15	2F4	NT	++	NT
ND15	2F10	NT	++	NT
ND15	2F11	NT	-	NT
ND15	3C 4	NT	+	NT

ES 2 440 597 T3

ND15	3 C7	NT	++	NT
ND15	3E8	NT	+++	NT
ND15	4 C8	NT	+	NT
ND15	4 D8	NT	+	NT
SK-N-DZ	#2	-	-	NT
SK-N-DZ	#4	-	-	NT
SK-N-DZ	#5	+++	++	NT
SK-N-DZ	#6	NT	++	NT
SK-N-DZ	#7	+	NT	NT
SK-N-DZ	#8	-	NT	NT
SK-N-DZ	#9	+	NT	NT
SK-N-DZ	#10	-	NT	NT
SK-N-DZ	#11	+	+++	NT
SK-N-DZ	#12	-	NT	NT
SK-N-DZ	#14	++	NT	NT
SK-N-DZ	#16	-	NT	NT
SK-N-DZ	#17	+	+++	NT
SK-N-DZ	#19	+	+++	NT
SK-N-DZ	#20	-	NT	NT
SK-N-DZ	#23	NT	++	NT
SK-N-DZ	#25	-	NT	NT
SK-N-DZ	#26	-	++	NT
SK-N-DZ	#27	+	NT	NT
SK-N-DZ	#28	++	+	NT
SK-N-DZ	#30	++	NT	NT
SK-N-DZ	#31	-	NT	NT
SK-N-DZ	#32	++	++	NT
SK-N-DZ	#33	+	NT	NT
SK-N-DZ	#34	+++	ND	NT
SK-N-DZ	#35	+	++	NT
SK-N-DZ	#36	-	NT	NT
SK-N-DZ	#37	+++	++	NT
SK-N-DZ	#42	-	NT	NT
SK-N-DZ	#43	+	++	NT
ND: No determinado; NT no ensayado. -: ninguna captación, +: captación mínima; ++: captación moderada; +++: buena captación				

Tabla 9. Cribado de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con KOR-1 utilizando endopeptidasa redirigida Dyn/A				
Línea celular	Número de clones	Captación de Dyn/A100 nM	Unión a Dyn 100 nM	Seleccionado para futuros ensayos
SiMa	2	-	-	No
SiMa	6	+	+	No
SiMa	8	+	+	No
SiMa	12	+++	++	Sí
SiMa	14	++	++	No
SiMa	20	+	++	No
SiMa	25	++	++	No
AGN P33	1	+++	+	Sí
AGN P33	3	++	+	No
AGN P33	5	++	+	Sí
AGN P33	6	++	+	No
AGN P33	7	+++	+	Sí
AGN P33	8	++	+	Sí
AGN P33	9	+++	+	Sí
AGN P33	10	+++	+	Sí
AGN P33	11	++	+	No
AGN P33	12	+++	+	Sí
AGN P33	14	+	+	No
AGN P33	16	++	+	No
AGN P33	17	+++	+	Sí
AGN P33	21	+	++	No
ND7	A1	+	+	No
ND7	A2	-	-	No
ND7	A3	-	-	No
ND7	A4	-	-	No
ND7	A5	-	-	No
ND7	A6	-	-	No
ND7	A7	-	-	No
ND7	A8	-	-	No
ND7	A9	-	-	No
ND7	A10	-	-	No
ND7	A11	-	-	No
ND7	A12	+++	+++	Sí

ES 2 440 597 T3

ND7	B1	-	-	No
ND7	B2	-	-	No
ND7	B3	-	-	No
ND7	B4	-	-	No
ND7	B5	+	+	Sí
ND7	B6	-	-	No
ND7	B7	-	-	No
ND7	B8	-	-	No
ND7	B9	-	-	No
ND7	B10	-	-	No
ND7	B11	-	-	No
ND7	B12	-	-	No
ND7	C1	-	-	No
ND7	C2	-	-	No
ND7	C3	-	-	No
ND7	C4	-	-	No
ND7	C5	-	-	No
ND7	C6	+	+	No
ND7	C7	-	-	No
ND7	C8	-	-	No
ND7	C9	-	-	No
ND7	C10	-	-	No
ND7	C11	-	-	No
ND7	C12	-	-	No
ND7	D1	-	-	No
ND7	D2	-	-	No
ND7	D3	-	-	No
ND7	D4	-	-	No
ND7	D5	-	-	No
ND7	D6	++	++	Sí
ND7	D7	++	++	Sí
ND7	D8	-	-	No
ND7	D9	-	-	No
ND7	D10	-	-	No
ND7	D11	-	-	No
ND7	D12	-	-	No

ES 2 440 597 T3

ND7	E1	-	-	No
ND7	E2	-	-	No
ND7	E3	-	-	No
ND7	E4	-	-	No
ND7	E5	-	-	No
ND7	E6	-	-	No
ND7	E7	-	-	No
ND7	E8	-	-	No
ND7	E9	-	-	No
ND7	E10	-	-	No
ND7	E11	-	-	No
ND7	E12	++	++	Sí
ND7	F1	-	-	No
ND7	F2	-	-	No
ND7	F3	-	-	No
ND7	F4	-	-	No
ND15	A1	-	-	No
ND15	A2	-	-	No
ND15	A3	+	-	No
ND15	A4	+	-	No
ND15	A5	-	-	No
ND15	A6	++	-	No
ND15	A7	++	-	No
ND15	A8	++	-	No
ND15	A9	+	-	No
ND15	A10	+	-	No
ND15	A11	-	-	No
ND15	A12	-	-	No
ND15	B1	-	-	No
ND15	B2	++	-	No
ND15	B3	-	-	No
ND15	B4	-	-	No
ND15	B5	+++	-	Sí
ND15	B6	+	-	No
ND15	B7	-	-	No
ND15	B8	-	-	No

ND15	B9	-	-	No
ND15	B10	-	-	No
ND15	B11	-	-	No
ND15	B12	-	-	No
ND15	C1	-	-	No
ND15	C2	+++	+	Sí
ND15	C3	-	-	No
ND15	C4	-	-	No
ND15	C5	+	NT	No
ND15	C6	+++	NT	Sí
SK-N-DZ	#11	NT	NT	ND
ND: No determinado; NT no ensayado. -: ninguna captación; +: captación mínima; ++: captación moderada; +++: buena captación				

que la línea celular parental. Además, el aumento de la sensibilidad de las nuevas líneas celulares clonales permitió la utilización de concentraciones más bajas de la dosis-respuesta confirmando que las nuevas líneas celulares clonales son más sensibles.

5

4. Cribado de respuesta a la dosis de líneas celulares clonales transfectadas de forma estable utilizando endopeptidasa redirigida.

10 Líneas celulares clonales transfectadas de forma estable de la sección 3 que muestran una buena captación de la endopeptidasa redirigida Noc/A se ensayaron en experimentos de respuesta a la dosis completa para determinar la sensibilidad y eficacia hacia la endopeptidasa redirigida Noc/A. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas de poli-D-lisina o colágeno IV a 1×10^5 células/pocillo en medio RPMI1640 que contenía suplementos N2 y B27, y NGF (50-100 ng/ml) durante 20 ± 4 horas antes del tratamiento con compuesto. Las células de la línea celular parental AGN P33 y las líneas celulares clonales ND7 fueron tratadas con 0,14 nM, 0,4 nM, 1,23 nM, 3,7 nM, 11,1 nM, 33,3 nM y 100 nM de Noc/A en el mismo medio durante 24 horas más 24 horas de incubación en medio libre de endopeptidasa redirigida para permitir la escisión de SNAP-25. Las células de la línea celular AGN P33 parental también se trataron con 0, 0,03 nM, 0,08 nM, 0,24 nM, 0,74 nM, 2,22 nM, 6,67 nM y 20 nM de Noc/A en el mismo medio durante 24 horas más 24 horas de incubación en medio libre de endopeptidasa redirigida para permitir la escisión de SNAP-25. Se retiró el medio y se lavaron las células y se lisaron para el ensayo ELISA en sándwich con ECL tal como se detalla en el Ejemplo II. Los datos de la AGN P33 parental y las líneas celulares clonales transfectadas de manera estable con el receptor ORL - 1 se resumen en la tabla 10. Clones # 2 y # 6 demostraron mayor sensibilidad y eficacia hacia la endopeptidasa redirigida Noc/A que la línea celular parental. Además, el aumento de la sensibilidad de las nuevas líneas celulares clonales permite la utilización de menores concentraciones para la respuesta a la dosis, lo que confirma que las nuevas líneas celulares clonales son más sensibles.

25

Tabla 10. Tabla resumen de la relación señal a ruido (S/N) y los valores de CE₅₀ de los tres clones más clones sensibles que sobreexpresan ORL-1 en la línea celular de fondo AGN P33.

	Parental	Clon 2	Clon 6	Clon 8
Relación S/N 0,03 nM/BK		41	26	1.8
Relación S/N 20 nM/BK		259	522	33.1
Relación S/N 0,14 nM/BK				

Relación S/N 100 nM/BK				
CE ₅₀ (nM)	6,8± 1,1	0,6± 0,1	0,7±0,07	0,3 ± 0,2

Los datos de la ND7 parental y las líneas celulares clonales transfectadas de forma estable con el receptor ORL-1 se resumen en la tabla 11. Todos los clones ensayados demostraron mayor sensibilidad y eficacia hacia la endopeptidasa redirigida Noc/A que la línea celular parental ND7. Los clones 4B7, 1E6 y 11 1 fueron los más sensibles con valores de CE₅₀ inferiores a 22.

5

Tabla 11. Tabla resumen de la relación señal a ruido (S/N) y los valores de CE₅₀ de los seis clones más sensibles que sobreexpresan ORL-1 en la línea celular de fondo ND7.							
	Parental	1C11	4B7	4 9	5FU	1E6	3E9
Relación S/N 0,14 nM/BK	1.7	9.3	11.1	5.3	3.6	5.8	5.1
Relación S/N 100 nM/BK	53	217	243	126	169	123	121
CE ₅₀ (nM)	> 50	8,6 ± 2	5,7 ± 0,5	33 ± 11	24 ± 5	6,7 ± 1	> 30 nM

La tabla 12 resume los resultados obtenidos con la generación y ensayo de líneas celulares clonales que sobreexpresan el receptor ORL-1 en diferentes fondos celulares.

10

Tabla 12: Resumen de líneas celulares clonales que sobreexpresan el receptor humano ORL-1 ensayadas con Noc/A			
Línea celular de fondo	Especie	Líneas celulares estables ensayadas con dosis completa de Noc/A	CE ₅₀ (nM)
AGN P33	Neuroblastoma humano	Tres	0,6-2,5
ND7	Neuroblastoma de rata y híbrido de DRG	Seis	3,7-8
SK-N-DZ	Neuroblastoma humano	Ninguna (siete clones estables seleccionados para estudios posteriores)	N/A

Ejemplo V

Desarrollo de líneas celulares clonales a partir de una línea celular SK-N-DZ Parental.

15

El ejemplo siguiente ilustra cómo identificar las células clonales de una línea celular establecida parental que son susceptibles a inhibición por endopeptidasa redirigida de exocitosis o tienen capacidad de captación de endopeptidasa redirigida.

20

1. **Aislamiento de líneas celulares clonales.**

Durante la caracterización de la línea celular SK-N-DZ, se descubrió que las células que comprenden esta línea celular establecida comprendían como mínimo cinco diferentes fenotipos celulares. Para determinar si alguno de estos tipos celulares fenotípicamente distintos era responsable de la susceptibilidad de esta línea celular a la inhibición de exocitosis por endopeptidasa redirigida, se realizaron dos cribados diferentes de dilución limitada para obtener un aislados de colonias individuales para cada tipo de célula fenotípicamente distinto.

25

Una adecuada densidad de las células de un cultivo madre de SK-N-DZ fueron cultivadas en DMEM, suero fetal bovino al 10% (termoinactivado), aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, contenida en un matraz recubierto de T175 colágeno IV. Después del segundo pase, las células se trataron con tripsina para producir una suspensión de células y se determinó la concentración celular. Aproximadamente $4,0 \times 10^6$ células de esta suspensión celular se transfirieron a un tubo de 50 ml y las células se disociaron en células individuales mediante expulsión vigorosa repetida a través de una aguja de calibre 18,5 utilizando una jeringa de 10 ml. Las células de esta suspensión de células individuales disociadas se diluyeron luego a una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/ml mediante la adición de 15 ml de medio de cultivo fresco y 2,5 µl de esta dilución se añadieron a 50 ml de medio de cultivo fresco para obtener una concentración de 10 células/ml. De esta reserva de dilución final, 100 µl de medio de cultivo se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos recubierta de colágeno IV y las células se cultivaron sin alterar en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% durante cuatro semanas. Cuatro placas de 96 pocillos se prepararon para análisis. Después de cuatro semanas, cada pocillo se examinó al microscopio para identificar colonias individuales en crecimiento, y para cada colonia identificada se añadieron 100 µl de medio de cultivo fresco a cada pocillo y las células se cultivaron inalteradas en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% durante dos semanas. Después de dos semanas adicionales de crecimiento, las colonias individuales crecientes se trataron con tripsina y se trasladaron a una nueva placa de 96 pocillos para un crecimiento continuo. Una vez que las colonias crecieron a aproximadamente 1.000 células, en base a la inspección visual, las células se trataron con tripsina y cada suspensión celular se transfirió a un pocillo de una placa de 24 pocillos recubierta con colágeno IV. Las células se cultivan en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% con medio de cultivo fresco que era reemplazado cada 2 - 3 días, si fuera necesario. Las células se cultivaron hasta que el cultivo alcanzaba aproximadamente el 60% de confluencia o superior, momento en el que las células se trataban con tripsina y suspensión celular se transfirió a un matraz de 25 cm² recubierto con Colágeno IV, en base a la confluencia de las células en la placa de 24 pocillos. Las células se cultivan en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% con medio de cultivo fresco que era reemplazado cada 2 - 3 días, si era necesario. Una vez que las células en el matraz alcanzaban una confluencia del 70-80%, se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido hasta que las líneas celulares clonales se analizaron para determinar su susceptibilidad a la inhibición de la exocitosis por Noc/A. De los 384 aislados de colonia inicialmente preparados de ambos cribados, se seleccionaron 24 líneas celulares clonales en base a viabilidad y criterios de crecimiento y se expandieron para procedimientos de cribado posteriores. De esas, se identificaron 12 líneas celulares de crecimiento rápido.

2. **Cribado primario para la susceptibilidad a la actividad endopeptidasa redirigida de las células de una línea celular clonal utilizando una endopeptidasa redirigida.**

Para determinar si las células de una línea celular clonal eran susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida Noc/A, se realizó un cribado primario utilizando un método basado en inmunología para determinar la actividad endopeptidasa.

Trece clones de SK-N-DZ (#3, #4, #5, #8, #9, #10, #13, #15, #16, #17, #18, #22 y #23) además de las células parentales de SK-N-DZ se sembraron en una placa de 96 pocillos (número de células por pocillo desconocido) en EMEM, FBS al 10%, 1 x B27 y 1 x N2 y se incubaron durante una noche. Las células se trataron con Noc/A 1 nM durante 24 horas. Las células se lisaron con 100 µl de tampón de lisis durante 20 minutos y se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos. Se añadieron cincuenta microlitros de 2 x tampón de muestra SDS a 50 µl de lisado celular y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Diez microlitros de muestra de proteína se cargaron por pista en geles NuPage al 12% y se realizó un ensayo de transferencia de Western tal como se describe en el ejemplo I. La evaluación del SNAP-25 total y el SNAP-25 escindido demostró que los clones #3, #8, #15 y #22 eran como mínimo tan buenos como las células parentales para la absorción de Noc/A. El tratamiento de respuesta a la dosis completa y el análisis con el ensayo ELISA en sándwich con ECL se realizó después de las células se incrementaron a escala.

3. **Cribado de respuesta secundario de líneas celulares clonales utilizando una molécula de endopeptidasa redirigida.**

Para determinar si las células de una línea celular clonal eran susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida Noc/A, se realizó un cribado secundario utilizando un método basado en inmunología para determinar la actividad endopeptidasa.

Para comparar adicionalmente estas líneas celulares SK-N-DZ clonadas, se llevó a cabo el ensayo ELISA en sándwich ECL. Cinco clones (#3, #9, #15, #16, #22) además de las células parentales SK-N-DZ se sembraron en una placa de 96 pocillos recubierta de de Poli-D-lisina por línea celular a 25.000 células por pocillo en RPMI 1640, con FBS al 10%, medios 1 x B27 y N2 x 1 (sin NGF) durante el fin de semana. Las células se trataron con Noc/A a dosis de 0 a 20 nM (0, 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67, 20 nM) durante 24 horas. El SNAP-25₁₉₇ escindido se cuantificó en el ensayo ELISA con ECL tal como se ha detallado en el ejemplo I.

La tabla 13 muestra los valores de CE⁵⁰ y de señal a ruido para los cinco clones y su línea celular parental. Tres clones llamados #3, #9 y #15 generaban menores valores de CE₅₀ (< 1 nM) y el clon #16 y #22 generaban valores de

CE₅₀ similares en comparación con la línea celular parental (~ 2 nM). Sin embargo, las señales totales de SNAP25 escindido eran superiores en los clones #3, #22, y las células parentales. Los clones #9, #16 y #15 tenían señales totales inferiores en comparación con el resto de las líneas celulares

Tabla 13. Tabla resumen de la relación señal a ruido (S/N) y valores de CE₅₀ de los cinco clones obtenidos de células SK-N-DZ por clonación a dilución limitada.

	Parental	3	9	19	16	22
Relación S/N 0,03 nM/BK	2	3	2	2	2	3
Relación S/N 20 nM/BK	19	27	12	8	14	20
CE ₅₀ (nM)	2,6 ± 1,5	0,8 ± 0,07	0,7 ± 0,04	0,6 ± 0,1	2,2 ± 0,8	1,9 ± 0,6

5

Las condiciones para el tratamiento con Noc/A en clones SK-N-DZ se optimizaron y se ejecutó un ensayo comparando los clones #3, #15 y #22 y la línea celular parental heterogénea SK-N-DZ. La tabla 14 muestra el resultado de la comparación y demostró que la optimización del ensayo ha mejorado enormemente la señal a ruido para el ensayo. Los clones #3 y #22 fueron seleccionados para desarrollo de ensayo adicional, dado que poseen eficacia y sensibilidad excelentes

10

Tabla 14. Tabla resumen de la relación señal a ruido (S/N) y valores de CE₅₀ de los tres clones obtenidos de células SK - N-DZ utilizando condiciones optimizadas.

	Parental	3	15	22
Relación S/N 0,03 nM/BK	15	8	5	10
Relación S/N 20 nM/BK	107	89	33	60
CE ₅₀ (nM)	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,09

Ejemplo V

Caracterización y comparación de líneas celulares clonales para captación de endopeptidasa redirigida

15

El ejemplo siguiente ilustra cómo caracterizar y comparar las líneas celulares clonales originadas de una línea celular establecida que comprende una población heterogénea o mediante transfección del receptor diana y posterior clonación de la línea celular.

20

Para evaluar la especificidad o selectividad de la captación de endopeptidasa redirigida, se realizaron ensayos de captación no específica utilizando una endopeptidasa redirigida que carecía del dominio de dirección. Para endopeptidasa redirigida a opioides, las células de la línea celular AGN P33, clon #6 (que comprende células transformadas de forma estable una construcción de expresión que codifica un receptor ORL-1) y las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3 y #22 (que comprende las células que expresan el receptor endógeno ORL-1) se sembraron a 150.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos recubierta de poli-D-lisina en medio RPMI 1640 libre de suero que contenía suplementos N2 y B27 y NGF (50 ng/ml) y se incubaron durante 20 ± 4 horas a 37°C en una incubadora en CO₂ al 5% antes del tratamiento con el compuesto. Las células se trataron con 8 dosis de Noc/A que van de 0-20 nM o 0-40 nM y/u ocho dosis de hormona LH_N/A oscilan entre 0 y 400 nM o 0 y 40 nM en el mismo medio durante 22 horas. El medio se retiró y las células se lavaron, se lisaron y se centrifugaron para eliminar los restos en preparación para un ensayo ELISA en sándwich. Una placa de ELISA recubierta con anticuerpo monoclonal 2E2A6 se bloqueó con 150 µl de tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de que el tampón fuera retirado, se añadieron 30 µl de lisado celular a cada pocillo y la placa se incubó a 4°C durante 2 horas. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se añadieron 30 µl de anticuerpos policlonales de detección α-SNAP25 marcados con SULFO-TAG NHS-Éster a 5 µg/ml en reactivo de bloqueo al 2% en PBS-T a la esquina inferior de los pocillos. La placa se selló y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de tres lavados con PBS-T. Después de que los lavados se completaron, se añadieron 150 µl de 1 x tampón de lectura por pocillo y la placa se leyó en el lector SI6000 Image. Los resultados que comparan la captación de Noc/A en relación con el control negativo LH_N/A se muestran en la tabla 15 y la tabla 16. Estos resultados indican que hubo buena separación entre la captación de Noc/A y LH_N/A en ambas líneas celulares demostrando captación específica de Noc/A.

35

Tabla 15. Captación inespecífica para SK-N-DZ, clon #3. Resumen de cuatro experimentos independientes		
nM	% de captación inespecífica	SEM (error estándar de la media)
0	2	0,5
1	6	0,5
2	8	0,5
5	10	1
15	19	0,9
44	33	1,5
133	65	2,4
400	93	2,3

Tabla 16. Captación inespecífica para células de hORL-1 #6. Resumen de tres experimentos independientes		
nM	% de captación inespecífica	SEM (error estándar de la media)
0	1	0,2
1	2	0,2
2	3	0,6
5	3	0,3
15	8	1,3
44	12	1,9
133	22	3,0
400	32	3,0

5 La tabla 17 resumen los resultados de la caracterización y comparación de las tres líneas celulares. Las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3 y #22 poseen una sensibilidad idéntica a la eDRG primaria y una excelente señal a ruido para desarrollar un análisis robusto para endopeptidasa redirigida Noc/A. La línea celular clonal de AGN P33 #6 también es un excelente candidato con baja captación inespecífica y sensibilidad adecuada.

Tabla 17.				
Parámetro	SK-N-DZ clon 3	SK-N-DZ clon 22	AGN P33 clon 6	eDRG
Especie de línea celular	Humano clonal	Humano clonal	Humano clonal	primaria de rata
Expresión del receptor celular	ORL1 humano	ORL1 humano	ORL1 humano	ORL1 de rata
	endógeno	endógeno	transfectadas	endógeno
intervalo dinámico	respuesta a la dosis 0,03 a 20 nM	respuesta a la dosis 0,03 a 20 nM	respuesta a la dosis de 0,04 a 40 nM	respuesta a la dosis de 0,17 a 20 nM
Sensibilidad (CE ₅₀)	CE ₅₀ = 0,75±0,1 (N = 10)	CE ₅₀ = 0,8 ±0,2 (N = 9)	CE ₅₀ = 2,4 ± 0,2 (N = 21)	CE ₅₀ = 0,8 ± 0,15 (N = 6)
ULOQ	20 nM	20 nM	20 nM	10-20 nM

S/N ULOQ / fondo	98 ± 15 (N = 10)	86 ± 17 (N = 9)	385 ± 32 (N = 19)	-300
S/N LLOQ / fondo	12 ± 2 (N = 11)	10 ± 2 (N = 9)	29 ± 7 (N = 18)	N/A
Especificidad frente a LH _N /A	> 2 log (N = 4)	> 2 log (N = 4)	> 2 log (N = 3)	N/A
Expresión de SNAP-25	Endógeno	Endógeno	Endógeno	Endógeno
Competencia con var. Nociceptina	Competencia completa (n = 4)	Competencia completa (n = 4)	Competencia parcial (n = 4)	N/A
Inhibición por Ab Antinociceptina	Competencia completa (n = 4)	Competencia completa (n = 4)	Competencia completa (n = 4)	N/A
Inhibición por Ab Anti-868	Competencia parcial (N = 3)	Competencia parcial (N = 3)	Competencia parcial (N = 3)	N/A

Para evaluar la sensibilidad de la captación de endopeptidasa redirigida, se realizaron ensayos de unión de saturación a ligando. La interacción de la mayoría de los ligandos con sus sitios de unión puede caracterizarse en términos de afinidad de unión (directrices de ensayo NIH). En general, alta afinidad de unión implica un mayor tiempo de residencia para el ligando en su sitio de unión del receptor que en el caso de baja afinidad de unión. La constante de disociación se utiliza comúnmente para describir el afinidad entre un ligando (L) (tal como un fármaco) y una proteína (P) es decir, lo firmemente que un ligando se une a una determinada proteína. Un experimento de unión de saturación en equilibrio mide la unión total e inespecífica (NSB) a diferentes concentraciones de radioligando. La constante de disociación en equilibrio o afinidad del radioligando, K_d , y el número máximo de sitios de unión del receptor, B_{max} , puede calcularse a partir de la unión específica (total - NSB) mediante el análisis de regresión no lineal. La K_d para la unión específica puede calcularse utilizando un análisis de regresión no lineal hiperbólico de unión a un sitio (es decir GraphPad Prism) como se muestra en la ecuación de abajo, donde B_{max} es el número máximo de sitios de unión (pmol/mg, o pmol/células o sitios/células) y K_d (nM, pM, etc.) es la concentración del radioligando requerida para alcanzar la mitad de la unión máxima:

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

Para endopeptidasa redirigida a opiodes, las células de la línea celular clonal AGN P33, clon #6 (que comprende células transformadas de forma estable con una construcción de expresión que codifica un receptor ORL-1), la línea celular parental SK-N-DZ y las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3, #15 y #22 (que comprenden las células que expresan el receptor endógeno ORL-1) se sembraron a 200.000 células por pocillo en placa de 48 pocillos recubierta con Poli-D-lisina en medio RPMI 1640 libre de suero que contenía suplementos 1 x N2 y 1 x B27 y se incubaron durante la noche a 37°C en una incubadora con CO2 al 5%. El medio se retiró y se añadieron células y 150 µl de tampón de unión Tris a los pocillos utilizados para evaluar la unión total y se añadieron 100 µl tampón de unión Tris a los pocillos utilizados para evaluar la unión no específica. Aproximadamente 50 µl de 4 x concentración final de nociceptina fría (2,5 mM a líneas celulares SK-N-DZ y 1 µM a la línea celular clonal AGN P33 #6) se añadieron a los pocillos de unión inespecífica y 50 ml de 4 x concentraciones finales de ³H-nociceptina (0 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,2 nM, 0,4 nM, 0,8 nM, 1,6 nM, 3,1 nM, 6,3 nM, 12,5 nM, 25 nM y 50 nM a las líneas celulares SK-N-DZ y 0, 0,01 nM, 0,02 nM, 0,039 nM, 0,078 nM, 0,156 nM, 0,313 nM, 0,625 nM, 1,25 nM, 2,5 nM, 5,0 nM y 10 nM a la línea celular clonal de AGN P33 #6) se añadieron a los pocillos de unión total y los pocillos de unión inespecífica a un volumen final de 200 µl. Después de la incubación a 37°C durante 30 minutos, los pocillos se lavaron dos veces en 0,5 ml de tampón de lavado frío. Las células se desnaturalizaron a continuación en 200 µl de NaOH 2 N y se transfirieron a frascos de centelleo de 20 ml que contenían 5 ml de líquido de centelleo. Se utilizaron datos sin procesar para trazar las gráficas de respuesta a la dosis y calcular la K_d para cada muestra. Los datos sin procesar obtenidos se transfirieron a SigmaPlot v10.0 y se utilizó un ajuste Saturación de un sitio para definir las curvas de respuesta a la dosis en la categoría de ecuación de Unión al ligando. Se regeneraron informes gráficos y contenían los siguientes parámetros: R^2 (coeficiente de correlación), B_{max} y $K_d \pm SEM$ (coeficiente \pm error estándar). Se obtuvieron gráficos de unión total, unión específica y unión inespecífica en el ensayo realizado en células de las líneas celulares clonales SK-N-DZ, #3, #15 y #22, y la línea celular clonal AGN P33 #6. Las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3 y #22

5 producen una unión dependiente de la concentración y saturable de ³H-nociceptina. En las mismas condiciones experimentales, la línea celular clonal SK-N-DZ #15 produjo una respuesta dependiente de la dosis de ³H-nociceptina, pero no se saturaba con la dosis más alta de 50 nM. En comparación con las líneas celulares SK-N-DZ que expresan ORL-1 endógeno, las células de la línea celular clonal AGN P33 #6 tuvieron significativamente mayor afinidad de unión a ³H-nociceptina (la dosis más alta era de 10 nM frente a 50 nM en SK-N-DZ) con baja unión sin especificidad.

10 Las curvas de unión de saturación de líneas celulares clonales SK-N-DZ #3, #22, #15 y la línea celular clonal AGN P33 #6 se utilizaron para estimar los valores de K_d y Bmax de tres experimentos de unión independientes por línea celular realizados en tres días diferentes. El orden de rango de estas cuatro líneas celulares es: línea celular clonal AGN P33 #6 (K_d= 1,86 nM y Bmax = 4,6 fmol/célula) > línea celular clonal SK-N-DZ #3 (K_d= 14 nM y Bmax = 0,6 fmol/célula) ≥ línea celular clonal SK-N-DZ #22 (K_d= 17 nM y Bmax = 0,6 fmol/célula) >> línea celular clonal SK-N-DZ #15 (K_d> 50 nM). Para obtener una respuesta a la dosis saturada para la línea celular clonal de SK-N-DZ #15, es necesario utilizar un mayor intervalo de dosis de ³H-nociceptina. La tabla 16 resume los datos relativos a la caracterización de los sitios de unión a nociceptina de la membrana plasmática específicos en tres líneas celulares clonales SK-N-DZ, #3, #15 y #22 y la línea celular clonal AGN P33 #6. Los datos mostraban lo siguiente 1) un sitio de alta afinidad con muy baja unión inespecífica (K_d 1,8 nM, y Bmax 2,9 fmol por célula) en la línea celular clonal AGN P33 #6, 2) la unión a nociceptina puede realizarse en las células nativas SK-N-DZ que expresan el receptor endógeno, 3) la línea celular clonal AGN P33 #6 tenía aproximadamente 10 veces mayor afinidad por nociceptina que las líneas celulares SK-N-DZ, 4) como se ve en el ensayo de potencia basado en células, las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3 y #22 (K_d 14-17 nM, Bmax 0,6 fmol por célula) tenían más sitios receptores por célula que la línea celular clonal SK-N-DZ #15 (no saturable en el mismo intervalo de dosis)

Tabla 18. Resumen de ensayo de unión de saturación a ³H-nociceptina para cuatro principales líneas celulares (n = 3 experimentos independientes)

Líneas celulares	K _d (nM±SD)	Bmax (fmol/celular)
SK-N-DZ #3	14 ± 1,6	0,59
SK-N-DZ #15	> 50	ND
SK-N-DZ #22	16,7 ± 1,1	0,58
Línea celular clonal de AGN P33 #6	1.86 ± 0,1	2,89

25 Para evaluar la sensibilidad de captación de endopeptidasa redirigida, la cantidad de receptor de endopeptidasa redirigida expresada a nivel de ARNm se evaluó mediante RT-PCR. La cantidad de receptor expresado en las células es un aspecto importante de la caracterización de la línea celular utilizada para el ensayo y se relaciona con la sensibilidad a endopeptidasas redirigidas. La cantidad de receptor de endopeptidasa redirigida expresado también puede ser una herramienta para la detección de otras posibles líneas celulares y eliminar líneas celulares que no expresan el receptor diana. Un método de medición de la expresión del receptor es cuantificar la cantidad de ARNm del receptor de endopeptidasa redirigida utilizando PCR en tiempo real (RT-PCR).

30 Para endopeptidasa redirigida a opioides, se aisló ARN de las células de una línea celular SiMa parental no transfectada, las células de la línea celular clonal de AGN P33 #6, las células de la línea de la célula parental SK-N-DZ y células de las líneas celulares SK-N-DZ #3 y #22 cultivadas en medios libres de suero o en medios con el suero. El ARNm se convirtió en ADNc y el ORL-1 se amplificó y se midió en tiempo real para determinar la cantidad relativa presente en cada línea celular utilizando los siguientes cebadores de oligonucleótidos para ORL-1 5'-CACTCGGCTGGTGGTGG-3' directo (SEQ ID NO: 148) y 5'-AATGGCCACGGCAGTCTCGC-3' inverso (SEQ ID NO: 149) el ADN se cuantifica mediante la utilización de SYBR® verde que es fluorescente en relación con la cantidad de ADN de cadena doble (producto de PCR) presente en la reacción. La representación gráfica de la cantidad de fluorescencia frente al número de ciclos da una curva logística para cada reacción. Cuanto más rápido una reacción alcanza la fase lineal de la curva más ADNc del receptor ORL-1 hay en la reacción. Una reacción de control RT donde no se añade ninguna enzima puede utilizarse para determinar si existe contaminación ya que si no hay ninguna enzima de RT presente en esta reacción, no se producirán ADNc. Un producto de PCR no puede producirse utilizando una plantilla de ARN, así que si aparece una curva de PCR en la reacción -RT, la única posibilidad es contaminación del ADN genómico. En las reacciones -RT, no aparece gráficos de PCR, confirmando que hubo contaminación mínima del ADN genómico. (datos no mostrados). La tabla 18 enumera las líneas celulares con su valor de CT. el CT es el número de ciclos de PCR necesarios para que esa reacción de PCR correspondiente produjera una señal por encima de un umbral establecido. la cantidad de ARNm del receptor ORL - 1 en una línea celular puede ser comparada con otra mirando sus valores CT correspondientes. Según los valores de CT, las células de la línea celular clonal AGN P33 #6 tenían también mucho más ARNm de ORL-1 que las células de la línea celular parental SiMa en

5 medios libres de suero (CT promedio 28,6 frente a 3,17) y en medios con suero (CT promedio 26,1 frente a 16,5), También parece que hay una diferencia mínima en el ARNm obtenido de células en el pase 6 frente al pase 16 en la línea celular clonal AGN P33 #6. También, hay diferencias mínimas en los valores de CT y representaciones gráficas la línea celular parental SK-N-DZ frente a la línea celular clonal #3 y #22. Esta conclusión es cierta en las células cultivadas en medios con suero y medios libres de suero y refleja la similitud de estas líneas celulares observadas en el ensayo de potencia basado en células para Noc.

Tabla 19. Valores promedio de CT para la expresión de ORL-1 en líneas celulares

Medio	Línea celular	Promedio de CT
Medio libre de suero	SiMa p26 Parental	28,6
	SiMa hORL-1 clon #6 p6	17,3
	SiMa hORL-1 clon #6 p16	17,3
medio completo	SiMa p26 Parental	26,1
	SiMa hORL-1 clon #6 p6	16,4
	SiMa hORL-1 clon #6 p16	16,6
Medio libre de suero	SK-N-DZ	26,3
	SK-N-DZ clon #3	25,9
	SK-N-DZ clon #22	26,6
Medio completo	SK-N-DZ	26,2
	SK-N-DZ clon #3	25,8
	SK-N-DZ clon #22	26,4

10

Ejemplo VII

Desarrollo de anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 que se unen selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo libre en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A

15

El ejemplo siguiente ilustra cómo preparar anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

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

20

Para desarrollar anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, el péptido de 13 residuos CDSNKTRIDEANQ_{COOH} (SEQ ID NO: 38) fue diseñado como un antígeno del producto de escisión de SNAP-25. Este péptido comprende una región enlazadora flexible y un residuo de cisteína N-terminal para conjugación a KLH y los aminoácidos 186-197 del SNAP-25 humano (SEQ ID NO: 5) con una glutamina C-terminal carboxilada (SEQ ID NO: 38). La generación de anticuerpos monoclonales para secuencias peptídicas únicas, bien seleccionadas proporciona control sobre la especificidad del epítipo, permitiendo la identificación de una determinada subpoblación de proteína entre una reserva de isoformas estrechamente relacionados. Búsquedas con Blast revelaron que este péptido tiene elevada homología solamente con SNAP-25 y casi ninguna posible reactividad cruzada con otras proteínas en las células neuronales. La secuencia fue analizada también cuidadosamente utilizando algoritmos informáticos para determinar el índice de hidropatía, la probabilidad de superficie de la proteína, las regiones de flexibilidad y estructura secundaria

25

30

favorable, seguido por la orientación correcta y presentación de la secuencia del péptido elegido. El péptido fue sintetizado y conjugado a hemocianina de lapa californiana (KLH) para aumentar la inmunogenia. Seis ratones Balb/c fueron inmunizados con este péptido, y después de tres inmunizaciones en ocho semanas, a los ratones se les extrajo sangre para ensayos. Se permitió que la sangre se coagule incubando a 4°C durante 60 minutos. La sangre coagulada se centrifugó a 10.000 x g a 4°C durante 10 minutos para que sedimentaran los restos celulares. La muestra de suero resultante se dispensó en alícuotas de 50 ml y se almacenó a -20°C hasta que fue necesaria.

Una estrategia similar basada en otros antígenos de SNAP-25 desvelados en la presente memoria descriptiva se utiliza para desarrollar anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Por ejemplo, el antígeno de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 45 puede conjugarse con KLH en vez del antígeno de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 38. Como otro ejemplo, los aminoácidos 186-197 SNAP-25 humano del antígeno de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 38 puede reemplazarse por la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43 o la SEQ ID NO: 44.

2. Cribado para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales α -SNAP-25.

Para determinar la presencia de un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, se realizaron un ELISA comparativo y ensayo de escisión basado en células utilizando el suero extraído del ratón. Para ELISA comparativo, se construyeron dos proteínas de fusión: BirA-HisTag @-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ de la SEQ ID NO: 48 y BirA-HisTag@-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ de la SEQ ID NO: 49. BirA-HisTag @-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ comprendía un péptido natural-biotinilado de 16 aminoácidos BirA de la SEQ ID NO: 50 enlazado en el extremo amino a un péptido de SNAP-25 compuesto por los aminoácidos 134 - 197 de la SEQ ID NO: 5. BirA-HisTag @-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ comprendía un péptido natural-biotinilado de 16 aminoácidos BirA de la SEQ ID NO: 50 enlazado en el extremo amino a un péptido de SNAP-25 compuesto por los aminoácidos 134 - 206 de la SEQ ID NO: 5. Estos dos sustratos se suspendieron en 1 x PBS a una concentración de 10 μ g/ml de BirA-HisTag @-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ y BirA-HisTag @-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆. BirA-HisTag @-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ y BirA-HisTag @-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ se recubrieron sobre placas separadas añadiendo aproximadamente 100 μ l de la solución de sustrato apropiada e incubando las placas a temperatura ambiente durante una hora. Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante una hora en BSA al 0,5% en 1 x TBS que contenía una dilución de 1:10 a 1:100 de un suero que contiene anticuerpo derivado de uno de los seis ratones inmunizados (ratón 1, ratón 2, ratón 3, ratón 4, ratón 5 y ratón 6). Las placas sondeadas con anticuerpo primario se lavaron cuatro veces durante 5 minutos cada vez en 200 μ l de TBS, TWEEN-20 @ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante 1 hora en 1 x TBS que contenía una dilución 1:10.000 de anticuerpo IgG de ratón policlonal de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) como un anticuerpo secundario. Las placas sondeadas con anticuerpo secundario se lavaron cuatro veces en 200 μ l de TBS, TWEEN - 20 @ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). La detección cromógena de los productos de SNAP-25 marcados se visualizó por detección cromógena utilizando el kit de sustrato TMB ImmunoPure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). El desarrollo de un color amarillo en las placas recubiertas con BirA-HisTag @-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇, pero no en las placas recubiertas con BirA-HisTag @-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆, indicó que el anticuerpo α -SNAP-25 reconocía preferentemente el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇. El resultado indica que de los seis ratones utilizados para la inmunización, tres ratones (ratón 2, ratón de 3 y ratón 4) tienen títulos más altos y más especificidad hacia un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

Estos resultados fueron confirmados mediante un ensayo de actividad de cadena ligera ELISA. Se prepararon placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina unidas a reactivo (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) mediante la adición de aproximadamente 100 μ l de la siguiente solución de sustrato: las filas A - C se recubrieron con 100 μ l de BirA-HisTag @-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ a doce concentraciones diferentes; las filas D - H se recubrieron con 100 μ l de BirA-HisTag @-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ a 10 μ g/ml. Las placas se lavaron aspirando la solución de sustrato y aclarando cada pocillo tres veces con 200 μ l de TBS, TWEEN-20 @ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Las diluciones de BoNT/A se redujeron previamente a 37°C durante 20 minutos en BoNT/A. Tampón de incubación (HEPES 50 mM, pH 7,4, suero fetal bovino al 1%, ZnCl₂ 10 μ M, ditiotrietol 10 mM) y 100 ml de la BoNT/A reducida previamente se añadieron a las placas recubiertas de sustrato y se incubaron a 37°C durante 90 minutos. Las placas tratadas con BoNT/A se lavaron aspirando el tampón de incubación BoNT/A y aclarando cada placa tres veces con 200 μ l de TBS, TWEEN-20 @ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante una hora en BSA al 0,5% en 1 x TBS que contenía una dilución 1:10 a 1:100 del suero que contenía anticuerpo que está siendo ensayado. Las placas sondeadas con anticuerpo primario se lavaron cuatro veces durante 5 minutos cada vez en 200 μ l de TBS, TWEEN-20 @ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante 1 hora en 1 x TBS que contenía una dilución 1:10.000 de anticuerpo policlonal IgG de cabra anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) como un anticuerpo secundario. Las placas sondeadas con

anticuerpo secundario se lavaron cuatro veces en 200 μ l de TBS, TWEEN - 20 $\text{\textcircled{R}}$ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20)). La detección cromógena de los productos etiquetados de SNAP-25 se visualizó mediante detección cromógena utilizando el kit de sustrato TMB ImmunoPure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). El desarrollo de un color amarillo, que correlaciona con la presencia del producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ se detectó en las muestras tratadas con BoNT/A, pero no en los controles no tratados, utilizando suero que contiene anticuerpos derivado de los seis ratones inmunizados (ratón 1, ratón 2, ratón 3, ratón 4, ratón 5 y ratón 6). Por lo tanto, el análisis comparativo de ELISA indicó que de los ratones utilizados para la inmunización, tres ratones (ratón 2, ratón de 3 y ratón 4) tenían títulos más altos y más especificidad hacia un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

Para ensayo de escisión basado en células, una adecuada densidad de células PC12 se sembraron en placas de cultivo tisular de 60 mm² que contenían 3 ml de un medio de suero adecuado (tabla 1). Las células se cultivaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que las células alcanzaron la densidad adecuada. Se preparó una solución de transfección de 500 μ l añadiendo 250 μ l de medio de suero reducido OPTI-MEM que contenía 15 μ l de LipofectAmine 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos a 250 μ l medio de suero reducido OPTI-MEM que contenía 10 μ g de una construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (SEQ ID NO: 51). La construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC comprende de un vector de expresión pQBI-25 (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA) cuyos elementos promotores están enlazados funcionalmente a un polinucleótido que codifica la cadena ligera de GFP-BoNT/A de la SEQ ID NO: 52. Esta mezcla de transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. El medio fue reemplazado por medio sin suplemento fresco y los 500 μ l de solución de transfección se añadieron a las células. A continuación, las células se incubaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% durante aproximadamente de 6 a 18 horas. Las células se lavaron y se recogieron tal como se describe en el ejemplo II. Para detectar la presencia del producto escindido SNAP-25₁₉₇, una alícuota de cada muestra cosechada se analizó mediante transferencia de Western, tal como se describe en el ejemplo II, excepto que el anticuerpo primario utilizado fue una dilución 1:1.000 de suero que contiene anticuerpos y el anticuerpo secundario utilizado era un 1:20.000 de α IgG de ratón con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Una sola banda correspondiente a al producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ fue detectada en las muestras tratadas con BoNT/A, pero no en los controles no tratados, utilizando suero que contiene anticuerpos derivados de tres ratones (ratón 2, ratón 3 y ratón 4). Por lo tanto, el ensayo de escisión basado en células indicó que de los ratones utilizados para la inmunización, tres ratones (ratón 2, ratón 3 y ratón 4) tenían títulos más altos y más especificidad hacia un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

Producción de hibridomas.

Para hacer que los hibridomas produzcan anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, el bazo del ratón 2 se recogió tres días después de una inmunización de refuerzo final y las células esplénicas se fusionaron con células de mieloma P3 - X 63 Ag8.653 utilizando protocolos de hibridoma estándar. Estas células se sembraron en cinco placas de 96 pocillos y se seleccionaron híbridos utilizando medio HAT. En un plazo de 8 a 14 días después de la fusión, el primer cribado de los aproximadamente 480 clones parentales se llevó a cabo mediante ELISA comparativo con los péptidos BirA-HisTag $\text{\textcircled{R}}$ -SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ y BirA-HisTag $\text{\textcircled{R}}$ -SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ recubriendo a dos placas diferentes. El ELISA comparativo proporciona un método rápido de cribado para identificar hibridomas que producen anticuerpos específicos para el SNAP-25₁₉₇ escindido. Los 18 mejores clones se sometieron a cribado adicional utilizando el ensayo de escisión basado en células descrito anteriormente e inmunotinción de células transfectadas LC/A. (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis de sobrenadantes que contienen anticuerpos monoclonales α -SNAP-25

Clon	ELISA comparativa				Ensayo basado en células	
	DO SNAP-25 ₁₉₇	DO SNAP-25 ₂₀₆	Relación _{197/206}	Relación _{206/1}	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆
1D 3	1,805	0,225	8,02	0,13	+++	-
1F12	0,365	0,093	3,92	0,25	-	-
1G 10	0,590	0,137	4,31	0,23	++	-
1H 1	0,335	0,121	2,77	0,36	-	-
1H 8	0,310	0,302	1,03	0,97	+	-
2C 9	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	++	-
3 C3	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	+++	-
3 G2	0,053	0,158	0,34	2,98	-	-
4D1	0,106	0,218	0,49	2,06	-	-
4G 6	0,061	0,159	0,38	2,61	-	-
5A5	0,251	0,106	2,37	0,42	+	-
5F11	0,243	0,061	3,98	0,25	-	-

Los clones 1D3, 1G10, 2E2, 3C1, 3C3 y 3E8 se clonaron adicionalmente mediante dilución limitante porque los medios acondicionados producidos por estos clones comprendían anticuerpos α -SNAP-25 con una especificidad de unión preferencial que tenía una relación^{197/206} de como mínimo 4:1 para el producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷ en relación con el sustrato no escindido SNAP-25²⁰⁶ sustrato y detecta el producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷ utilizando el ensayo de escisión basado en células y la inmunotinción de células PC12 transfectadas con GFP-LC/A. Los clones similares 2C9, 2F11, 3G2, 4D1 y 4G6 se clonaron adicionalmente mediante dilución limitante porque los medios acondicionados producidos por estos clones comprendían anticuerpos α -SNAP-25 con una especificidad de unión preferencial que tenía una relación^{206/197} de como mínimo 1,5:1 para el sustrato no escindido SNAP-25²⁰⁶ en relación con el producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷ y detecta el sustrato no escindido SNAP-25²⁰⁶ utilizando el ensayo de escisión basado en células. Estos clones derivados de una única célula se cribaron nuevamente utilizando ELISA comparativa, escisión basada en células e inmunotinción para confirmar su afinidad y especificidad, y los anticuerpos se isotiparon empleando los procedimientos estándar. Se produjeron ascitis a partir de clones 1D3B8 (IgM.k), 1G10A12 (IgG3.k), 2C9B10 (IgG3.k), 2E2A6 (IgG3.k), 2F11B6 (IgM.k), 3C1A5 (IgG2a.k) y 3C3E2 (IgG2a.k). El clon 3E8 dejó de producir anticuerpos durante el proceso de clonación y no pudo evaluarse más.

3. Evaluación de especificidad de unión de anticuerpos monoclonales α -SNAP-25.

Para evaluar la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, ascitis de los clones 1D3B8, 1G10A12, 2C9B10, 2E2A6, 2F11B6, 3C1A5 y 3C3E2 se utilizaron para detectar el producto de escisión de SNAP-25 utilizando el ensayo de actividad de la célula, inmunocitoquímica e inmunoprecipitación.

Para el ensayo de actividad basado en células, la especificidad de unión se determinó mediante el análisis de la capacidad de ascitis que contenía anticuerpos α -SNAP-25 para detectar el sustrato no escindido SNAP-25²⁰⁶ sustrato y el producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷ mediante análisis de transferencia de Western. Una adecuada densidad de células PC12 se sembraron en placas de cultivo tisular de 60 mm² que contenían 3 ml de medio de suero apropiado, se cultivaron en una incubador a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que se alcanzó una densidad celular apropiada y se transfectaron con una solución de transfección que carecía de la construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células no transfectadas) o una solución de transfección que contenía la construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células transfectadas) tal como se describió anteriormente. Las células se lavaron y se recogieron tal como se ha descrito en el ejemplo I. Para detectar la presencia de tanto el sustrato no escindido SNAP-25²⁰⁶ como del producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷, una alícuota de cada muestra recogida se analizó mediante transferencia de Western tal como se describe en el ejemplo I, salvo que el anticuerpo primario utilizado era una dilución 1:100 de la ascitis que contenía el anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 y el anticuerpo secundario utilizado fue una 1:20.000 de IgG α -ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Además, se analizaron tres anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 de ratón disponibles en el mercado. SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), un anticuerpo α -SNAP-25 que el fabricante indica que detecta tanto el sustrato no escindido SNAP-25²⁰⁶ como el producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷, se utilizó en una dilución 15.000 según las recomendaciones del fabricante. MC-6050 (Research & Diagnostic Antibodies, Las

Vegas, NV), un anticuerpo α -SNAP-25 que el fabricante indica que detecta tanto el sustrato no escindido SNAP-25₂₀₆ como el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇, se utiliza en una dilución 1:100 según las recomendaciones del fabricante. MC - 6053 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), un anticuerpo α -SNAP-25 que el fabricante indica que detecta sólo el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇, se utiliza en una dilución 1:100 según las recomendaciones del fabricante.

La tabla 21 indica las ascitis que contiene anticuerpos α -SNAP-25 que detectaba solamente el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇. El ensayo de escisión basado en células indicaba que las ascitis producidas a partir de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 sintetizan un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que tiene especificidad de unión alta para el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ lo que permite el reconocimiento selectivo de este producto de escisión en relación con el sustrato no escindido SNAP-25₂₀₆. El anticuerpo comercial SMI-81 detectaba el sustrato no escindido SNAP-25₂₀₆, pero sólo reconocía pobremente el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ (tabla 21). Sorprendentemente, el anticuerpo comercial MC-6050 detectaba sólo el sustrato no escindido SNAP-25₂₀₆ y no conseguía reconocer el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ (tabla 21). Aún más sorprendente, el anticuerpo comercial MC-6050 detectaba sólo el sustrato no escindido SNAP-25₂₀₆ y no conseguía reconocer el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇, a pesar de que el fabricante anuncia que este anticuerpo detecta selectivamente el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ (tabla 21). Por lo tanto, este análisis indica que aunque 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 exhiben adecuada selectividad para el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇, 1G10A12 y 2F11B6 no lo hacen. Además, los anticuerpos comerciales SMI-81, MC-6050 y MC-6053 son todos inadecuados para los métodos basados en inmunología desvelados en la presente solicitud porque no todos lograron detectar con selectividad el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇.

Para el análisis inmunocitoquímico, la especificidad de unión se determinó mediante el análisis de la capacidad de ascitis que contiene anticuerpos α -SNAP-25 para detectar el sustrato no escindido SNAP-25₂₀₆ sustrato y el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ mediante inmunotinción. Véase por ejemplo, Ester Fernandez - Salas y col., *Plasma Membrane Localization Signals in the Light Chain of Botulinum Neurotoxin*, Proc. Natl. Acad. y col., Estados Unidos (9) 101: 3208-3213 (2004). Una adecuada densidad de células PC12 se sembraron, cultivaron y transfectaron con una solución de transfección que carecía de la construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células no transfectadas) o una solución de transfección que contenía la construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células transfectadas) tal como se describió anteriormente. Las células se lavaron en 1 x PBS y se fijaron en 5 ml de PAF a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células fijadas se lavaron en solución salina tamponada con fosfato, se incubaron en 5 ml de Triton X - 100 al 0,5% (polietilenglicol octilfenol éter) en 1 x PBS, se lavaron en 1 x PBS y se permeabilizaron en 5 ml de metanol a -20°C durante 6 minutos. Las células permeabilizadas se bloquearon en 5 ml de glicina 100 mM a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavaron en 1 x PBS y se bloquearon en 5 ml de BSA al 0,5% en 1x PBS a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células bloqueadas se lavaron en 1 x PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas en BSA al 0,5% en 1 x PBS con una dilución 1:10 de una ascitis de una línea celular de hibridoma clonal ensayada. Las células sondeadas con anticuerpo primario se lavaron tres veces durante 5 minutos cada vez en 1 x PBS. Las células lavadas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en 1 x PBS con una dilución 1:200 de inmunoglobulina G anti-ratón de policlonal, anticuerpo de cadenas pesadas y ligeras (IgG, H + L) conjugado a ALEXA @ FLUOR 568 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) como un anticuerpo secundario. Las células sondeadas con anticuerpo secundario se lavaron tres veces durante 5 minutos cada vez en 1 x PBS. Las células lavadas se prepararon para el examen microscópico mediante montaje en medio de montaje VECTASHIELD® (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se taparon con un cubreobjetos. Se obtuvieron imágenes de detección de señal con un microscopio confocal Leica utilizando la configuración adecuada del láser. La tabla 21 indica que la ascitis que contenía anticuerpos α -SNAP-25 detecta específicamente el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇. El análisis inmunocitoquímico indicaba que las ascitis producidas a partir de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 sintetizan un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que tiene especificidad de unión alta para el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ que permite el reconocimiento preferencial de este producto de escisión en relación con el sustrato no escindido SNAP-25₂₀₆.

Para el análisis de la inmunoprecipitación, la especificidad de unión se determinó mediante el análisis de la capacidad de la proteína A (columnas HiTrap™ Protein A HP, GE Healthcare, Amersham, Piscataway, NJ), anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 purificadas para precipitar el sustrato no escindido SNAP-25₂₀₆ sustrato y el producto de escisión SNAP-25₁₉₇. Véase por ejemplo, Capítulo 8 de Storing and Purifying Antibodies, págs. 309 - 311, Harlow & Lane, *supra*, 1998a. Una adecuada densidad de células PC12 se sembraron, cultivaron y transfectaron con una solución de transfección que contenía una construcción de expresión pQBI-25/GFP (células de control; SEQ ID NO: 53) o una solución de transfección que contenía la construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células experimentales) tal como se describió anteriormente. La construcción de la expresión pQBI-25/GFP comprende un vector de expresión cuyos elementos promotores funcionalmente están enlazados a un polinucleótido que codifica GFP de la SEQ ID NO: 54. Después de una incubación durante una noche, las células se lavaron aspirando el medio de cultivo y aclarando cada pocillo con 200 μ l de 1 x PBS. Para cosechar las células, el PBS se aspiró, las células se lisaron mediante la adición de un tampón de lisis e inmunoprecipitación que comprende HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM EGDT 1 nM, glicerol al 10%, Triton X

- 100 al 1% (polietilenglicol octilfenol éter) y 1 x cóctel inhibidor de proteasa COMPLETE™ (Roche Applied Biosciences, Indianapolis, IN) e incubando a 4°C durante una hora. Las células sometidas a lisis se centrifugaron a 3.000 x g a 4°C durante 10 minutos para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se diluyó a una concentración de proteína de aproximadamente 1 mg/ml. Aproximadamente 5 µg de anticuerpo monoclonal purificado se añadieron a 0,5 ml del sobrenadante diluido y se incubaron a 4°C durante dos horas. Después de la incubación del anticuerpo primario, aproximadamente 50 µl de Proteína G inmovilizada (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) se añadieron al sobrenadante diluido y se incubaron a 4°C durante una hora. El sobrenadante incubado se lavó tres veces durante 30 minutos cada vez añadiendo 0,5 ml de tampón de lisis e inmunoprecipitación, centrifugando a 300 x g a 4°C durante un minuto para que sedimente la proteína G inmovilizada y decantar el sobrenadante. Después del lavado, el sedimento se resuspendió en 30 µl de 1 x Tampón de carga SDS y la muestra se calentó a 95°C durante 5 minutos. Para detectar la presencia tanto del sustrato no escindido SNAP-25₂₀₆ como del producto de escisión SNAP-25₁₉₇, una alícuota de cada muestra recogida se analizó mediante transferencia de Western tal como se ha descrito en el ejemplo I, excepto que el anticuerpo primario utilizado fue una dilución 1:1.000 del suero de anticuerpo policlonal α-SNAP-25 (véase el ejemplo V) y el anticuerpo secundario utilizado fue una 1:20.000 de α-IgG de conejo con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). La tabla 21 indica las ascitis que contienen α-SNAP-25 que específicamente arrastraron hacia abajo al producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ mediante análisis de la inmunoprecipitación. El análisis de la inmunoprecipitación indicaba que las ascitis producidas a partir de los clones 2E2A6 y 3C1A5 sintetizan un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 que tiene especificidad de unión alta para el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ que permite el reconocimiento preferencial de este producto de escisión en relación con el sustrato no escindido SNAP-25₂₀₆.

Tabla 21. Análisis de ascitis clonales que contienen anticuerpo monoclonal α-SNAP-25

Clon	ensayo basado en células		Inmunocitoquímica		Inmunoprecipitación	
	SNAP-25197	SNAP-25206	SNAP-25197	SNAP-25206	SNAP-25197	SNAP-25206
1D3B8	++	-	++	-	No ensayado	No ensayado
1G10A12	++	++	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
2C9B10	++	-	++	-	No ensayado	No ensayado
2E2A6	++	-	++	-	++	-
2F11B6	+	+	+	+	No ensayado	No ensayado
3C1A5	++	-	++	-	++	-
3C3E2	+	-	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
MC-6050	-	+	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
MC-6053	-	+	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
SMI-81	-/+	++	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado

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

Para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 que muestra especificidad de unión alta para cualquiera del producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ o el sustrato no escindido SNAP-25₂₀₆, se realizaron ensayos de afinidad de unión en un instrumento BIAcore 3000 utilizando chips sensores de carboximetil dextrano (CM5) (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Las series se llevaron a cabo a 25°C con tampón HBS-EP compuesto por HEPES 10 mM (pH 7,4), cloruro de sodio 15 mM, EDTA 3 mM, surfactante P20 al 0,005% (v/v) con un caudal de 10 µl/min. los péptidos de SNAP-25 que comprendía los aminoácidos 134 - 197 de la SEQ ID NO: 5 (SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇) o los aminoácidos 134 - 206 de la SEQ ID NO: 5 (SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆) se unieron covalentemente a la superficie de los chips sensores de CM5 utilizando acoplamiento de amina estándar. En resumen, los chips de CM5 se activaron por una inyección de 7 minutos de una mezcla de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida 0,2 M y N-hidroxisuccinimida 0.05 M; los péptidos de SNAP-25 se inyectaron a continuación en acetato de sodio 10 mM (pH 4,0) durante 20 minutos a un caudal de 10 µl/min; y ésteres de succinimida sin reaccionar se bloquearon mediante una inyección 7 minutos de clorhidrato de etanolamina 1 M, pH 8,5. La cantidad inmovilizada de SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ o SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ en el chip se reflejaba en un aumento de 100 - 150 en unidades de respuesta (aproximadamente 0,10 - 0,15 ng/mm²). Muestras de anticuerpo que comprendían ascitis o anticuerpos monoclonales purificados producidos a partir de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2, así como, anticuerpos α-SNAP-25 disponibles en el mercado se hicieron pasar sobre la superficie de los chips CM5 permitiendo un tiempo de asociación de 10 minutos y un tiempo de disociación de 20 minutos. Las superficies se regeneraron entre las

series en mediante 1 inyección de un minuto de glicina-HCl 10 mM (pH 2,5) con un caudal de 15 µl/min. Las curvas de Sensorgram se ajustaron a un modelo de unión cinética de 1: 1 con el software BIAevaluation 3.0.

5 Los resultados indican que tanto 2E2A6 como 3C1A5 eran altamente específicos para el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ respecto al sustrato no escindido SNAP-25 (tabla 22). En comparación con las afinidades de unión de MC-6050 y MC-6053, 1D3B6 tenía una constante de disociación en equilibrio aproximadamente 10 veces mayor para el producto de escisión de SNAP-25 en relación con estos anticuerpos comerciales (tabla 22). Curiosamente, 2E2A6 tenía solamente una constante de disociación en equilibrio ligeramente menor para el producto de escisión de SNAP-25 en relación con estos anticuerpos comerciales (0,405 nM frente a 0,497 y 0,508)(tabla 22). Ninguno de estos anticuerpos α-SNAP-25 comerciales reconoció selectivamente el producto de escisión de SNAP-25 escote (tabla 20), una constante de disociación en equilibrio inferior a 0,5 nM parece, en parte, fundamental para lograr dicha selectividad. Asimismo, en comparación con las afinidades de unión de MC-6050 y MC-6053, 2E2A6 tenía una aproximadamente como mínimo una vez más lenta constante de velocidad de disociación/disociación ($6,74 \times 10^{-5}$ frente a $8,82 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $1,18 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) (tabla 22). Esto sugiere además que una constante de velocidad de disociación/disociación inferior a $8,82 \times 10^{-4}$ parece, en parte, fundamental para lograr la unión selectiva para el producto de escisión de SNAP-25. Este resultado es consistente con 1 D3B8, que tenía una constante de velocidad de disociación/disociación de $5,78 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (tabla 22).

Tabla 22. Análisis de afinidad de unión de anticuerpos monoclonales α-SNAP-25				
Parámetro SPR	1D3B8		2E2A6	
	SNAP-25₁₉₇	SNAP-25₂₀₆^a	SNAP-25₁₉₇	SNAP-25₂₀₆^b
Ka ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$1,06 \times 10^6$	-	$1,70 \times 10^6$ ($1,66 \times 10^5$)	-(-)
KD (s^{-1})	$5,78 \times 10^{-5}$	-	$1,53 \times 10^{-4}$ ($6,74 \times 10^{-5}$)	-(-)
KD (nM)	0,050	-	0,090 (0,405)	-(-)
Parámetro SPR	3C1A5		2C9B10	
	SNAP-25₁₉₇	SNAP-25₂₀₆^c	SNAP-25₁₉₇	SNAP-25₂₀₆^d
Ka ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	2,17 105	-	$1,15 \times 10^4$	-
KD (s^{-1})	$2,88 \times 10^{-4}$	-	$3,11 \times 10^{-4}$	-
KD (nM)	1,33	-	27.1	-
Parámetro SPR	MC-6050		MC-6053	
	SNAP-25₁₉₇	SNAP-25₂₀₆	SNAP-25₁₉₇	SNAP-25₂₀₆
Ka ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$1,78 \times 10^6$	$3,06 \times 10^2$	$2,32 \times 10^6$	$1,06 \times 10^2$
KD (s^{-1})	$8,82 \times 10^{-4}$	$6,07 \times 10^{-3}$	$1,18 \times 10^{-3}$	$2,56 \times 10^{-5}$
KD (nM)	0,497	19.800	0508	240
<p>a No se observó ninguna unión enlace cuando hasta 125 nM de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 1D3B8 se hicieron pasar sobre la superficie del chip sensor CM5 después de un tiempo de asociación de 10 minutos.</p> <p>b No se observó ninguna unión cuando hasta 10 mM de anticuerpo monoclonal SNAP-25 2E2A6 se hicieron pasar sobre la superficie del chip sensor CM5 después de un tiempo de asociación de 10 minutos.</p> <p>c No se observó ninguna unión cuando hasta 100 nM de anticuerpo monoclonal SNAP-25 3C1A5 se hicieron pasar sobre la superficie del chip sensor CM5 después de un tiempo de asociación de 10 minutos.</p> <p>d No se observó ninguna unión cuando hasta 100 nM de anticuerpo monoclonal SNAP-25 2C9B10 se hicieron pasar sobre la superficie del chip sensor CM5 después de un tiempo de asociación de 10 minutos.</p>				

20 Para comparar los seis diferentes anticuerpos, la velocidad de asociación (ka) y velocidad de disociación (kd) para cada uno se normalizaron utilizando un programa del software de evaluación 4.1 BIA. Para la comparación de las velocidades

de asociación, los datos se recortaron en primer lugar individualmente mediante la eliminación de la parte regeneración y los picos de inyección y a continuación se normalizaron a una escala de 0 a 100. Para la comparación de la velocidad de disociación, los datos se normalizaron hasta el punto de parada/máximo de la inyección. Este análisis mostró que 2C9B10 tenía una velocidad de asociación mucho más lenta que los otros anticuerpos (figura 7A), y que MC-6053 tiene una velocidad de disociación mucho más rápida (disociación) que los otros anticuerpos (figura 7B). La rápida velocidad de disociación de MC-6053 indica que este anticuerpo no funcionará bien en los métodos desvelados en la presente memoria descriptiva porque este anticuerpo tendrá dificultades para mantenerse unido al antígeno del sustrato durante las etapas de lavado.

5. Secuenciación del epítipo de los anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 aislados.

Para determinar el epítipo de un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 aislado que puede unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, la molécula polinucleotídica que codifica las cadenas pesada variable (V_H) y ligera variable (V_L) del anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 producido por los hibridomas 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 se secuenciaron. El ARNm se extrajo y se purificó a partir de cada hibridoma mediante protocolos estándar y se transcribió a la inversa a ADNc utilizando una cebador oligo dT anti-sentido o un cebador anti-sentido específico de genes (IgG 1 CH murina y kappa CL). Cebadores de dominio constante humanos y murinos específicos se utilizaron para amplificar el ADNc mediante PCR después de la producción de ADNc para determinar el isotipo del anticuerpo. Se utilizaron cebadores V_H y V_L degenerados para amplificar los dominios variables de ADNc. Para la 5'RACE, una cola de dCTP homopolimérica se añadió en el extremo 3' del ADNc. Las cadenas pesadas y ligeras se amplificaron a continuación con un cebador sentido oligo dG y un cebador antisentido (CH/KC) específico de genes. Los productos de PCR incluyen la secuencia del péptido señal, dominios variables y dominios constantes hasta el cebador anti-sentido. Los productos de PCR se purificaron en gel para eliminar pequeños fragmentos y se clonaron en un vector como o TA para secuenciación. Cinco clones independientes para cada cadena se secuenciaron y se determinaron alineamientos de las cadenas V_H y V_L y secuencias de consenso. Los métodos utilizados para determinar las secuencias de aminoácidos de V_H y V_L se describen por ejemplo en, Roger A. Sabbadini, y col., *Novel Bioactive lipid Derivatives and Methods of Making and Using Same*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2007/0281320; y Peter Amersdorfer, y col., *Molecular Characterization of Murine Humoral Immune Response to Botulinum Neurotoxin Type A Binding Domain as Assessed by Using Phage Antibody Libraries*, 65(9) infect. Immun. 3743-3752. Además, están disponibles servicios comerciales para secuenciar las cadenas variable pesada (V_H) y variable ligera (V_L) de un anticuerpo e identificar las regiones CDR, véase, por ejemplo Fusion Antibodies Ltd., Irlanda del norte. En un caso, para la región 3C1A5 V_L también se determinó la secuencia de aminoácidos separando los anticuerpos purificados por afinidad mediante electroforesis de alta resolución 2DE y a continuación sometiendo a la proteína a análisis de huella de fragmentación de péptidos utilizando nanoLC-MSMS de alta resolución después de la digestión proteolítica.

La secuencia del polinucleótido que comprende las cadenas V_H y V_L del anticuerpo monoclonal α -SNAP-25, incluyendo un anticuerpo según la invención según lo definido por las reivindicaciones, producido por los hibridomas desvelados en la presente memoria descriptiva es la siguiente: 1D3B8 V_H (SEQ ID NO: 71), 2C9B10 V_H (SEQ ID NO: 73), 2E2A6 V_H (SEQ ID NO: 75), 3C1A5 V_H (SEQ ID NO: 77), 3C3E2 V_H variante 1 (SEQ ID NO: 79), 3C3E2 V_H variante 2 (SEQ ID NO: 81), 3C3E2 V_H variante 3 (SEQ ID NO: 132), 1 D3B8 V_L (SEQ ID NO: 83), 2C9B10 V_L (SEQ ID NO: 85), 2E2A6 V_L (SEQ ID NO: 87), 3C1A5 V_L (SEQ ID NO: 89) y V 3C3E2_L (SEQ ID NO: 91). La secuencia de aminoácidos que comprende las cadenas V_H y V_L del anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 producida por los hibridomas desvelados en la presente memoria descriptiva es la siguiente: 1D3B8 V_H (SEQ ID NO: 72), 2C9B10 V_H (SEQ ID NO: 74), 2E2A6 V_H (SEQ ID NO: 76), 3C1A5 V_H (SEQ ID NO: 78), 3C3E2 V_H variante 1 (SEQ ID NO: 80), 3C3E2 V_H variante 2 (SEQ ID NO: 82); 3C3E2 V_H variante 2 (SEQ ID NO: 133), 1 D3B8 V_L (SEQ ID NO: 84), 2C9B10 V_L (SEQ ID NO: 86), 2E2A6 V_L (SEQ ID NO: 88), 3C1A5 V_L (SEQ ID NO: 90) y 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 92). Las secuencias de aminoácidos que comprenden los dominios CDR V_H y V_L del anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 producidas por los hibridomas 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 se dan en la tabla 23.

Tabla 23. secuencias de CDR de los dominios V _H y V _L de los anticuerpos monoclonales α -SNAP-25			
CDR	Secuencia	Identificado en	SEQ ID NO:
V _H CDR 1	TFTDHSIH	2E2A6 2C9B10 3C1A5	93
V _H CDR 1	TFTNYVIH	3C3E2	94
V _H CDR 1	IFTDHALH	1D3B8	95

V _H CDR 2	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
V _H CDR 2	YLFPNGNGNFEYNEKFKG	2C9B10 3C1A5	97
V _H CDR 2	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C3E2	98
V _H CDR 2	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
V _H CDR 3	KRMGY	2E2A6 3C1A5	100
V _H CDR 3	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101
V _H CDR 3	ARMDY	3C3E2var1	102
V _H CDR3	ARMGY	3C3E2var2	134
V _H CDR 3	ARHLANTYFFFYDY	3C3E2var3	135
V _L CDR 1	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
V _L CDR 1	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
V _L CDR 1	KSSQSLLYTNGKTYLT	2E2A6	105
V _L CDR 1	KSSQSLLNTNGKTYLT	3C1A5	106
V _L CDR 1	RASQNIGNYLH	3C3E2	107
V _L CDR 2	KVSNRFS	1D3B8	108
V _L CDR 2	NAKSLAE	2C9B10	109
V _L CDR 2	LVSELDLS	2E2A6	110
V _L CDR 2	LVSKLDS	3C1A5	111
V _L CDR 2	YASQSIG	3C3E2	112
V _L CDR 3	FQGSHVPPT	1D3B8	113
V _L CDR 3	QHHYGTPYT	2C9B10	114
V _L CDR 3	LQSAHFPT	2E2A6	115
V _L CDR 3	LQSSHFPPT	3C1A5	116
V _L CDR 3	QQSDTWPLT	3C3E2	117

Los ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos que comprenden variantes del dominio V_H CDR del anticuerpo monoclonal α SNAP-25 producidas por los hibridomas desvelados en la presente memoria descriptiva incluyen V_H CDR1 variante SEQ ID NO: 118 para 1D3B8; V_H CDR1 variante SEQ ID NO: 119 para 2C9B10, 2E2A6 y 3C1A5 V_H; V_H CDR1 variante SEQ ID NO: 120 para 3C1A5 V_H y 3C3E2 variante 3; V_H CDR2 variante SEQ ID NO: 121 para 1D3B8 y 2E2A6; V_H CDR2 variante SEQ ID NO: 122 para 2C9B10 y 3C1A5 V_H; V_H CDR2 variante SEQ ID NO: 123 para 3C1A5 V_H y 3C3E2 variante 3; V_H CDR3 variante MDY para 1 D3B8 y 2C9B10; V_H CDR3 variante MGY para 2E2A6 y 3C1A5 V_H; y V_H CDR3 variante SEQ ID NO: 124 para 3C1A5 V_H y 3C3E2 variante 3. Los ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos que comprenden variantes del dominio V_L CDR del anticuerpo monoclonal α SNAP-25 producidas por los hibridomas desvelados en la presente memoria descriptiva incluyen V_L CDR1 variante SEQ ID NO: 125 para 1 D3B8; V_L CDR1 variante SEQ ID NO: 126 para 2C9B10; V_L CDR1 variante SEQ ID NO: 127 para 2E2A6; V_L CDR1 variante SEQ ID NO: 128 para 3C1A5; V_L CDR1 variante SEQ ID NO: 129 para 3C3E2; V_L CDR2 variante KVS para 1D3B8; V_L CDR2 variante NAK para 2C9B10; V_L CDR2 variante LVS para 2E2A6; V_L CDR2 variante YAT para 3C1A5; y V_L CDR2 variante YAS para 3C3E2.

Ejemplo comparativo VIII

1. *Desarrollo de anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que se unen selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo libre en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A*

El ejemplo siguiente ilustra cómo preparar anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

Para desarrollar los anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ de la enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, el péptido de 10 residuos CGGGRIDEANQ (SEQ ID NO: 46) se diseñó como un antígeno del producto de escisión de SNAP-25. Este péptido que comprendía un residuo de cisteína N-terminal para conjugación a KLH, un espaciador flexible G-espaciador (GGG) enlazado a los aminoácidos 191-197 de SNAP-25 humano (SEQ ID NO: 5) y tiene una glutamina C-terminal carboxilada. Las búsquedas mediante Blast revelaron que este péptido tiene elevada homología solamente con SNAP-25 y casi ninguna posible reactividad cruzada con otras proteínas en las células neuronales. La secuencia se analizó cuidadosamente utilizando algoritmos informáticos para determinar el índice de hidropatía, la probabilidad de superficie de la proteína, las regiones de flexibilidad y estructura secundaria favorable, seguido por la orientación correcta y presentación de la secuencia del péptido elegido. El péptido se sintetizó y se conjugó con Hemocianina de lapa californiana (KLH) para aumentar la inmunogenia. Antes de que los animales fueran vacunados, conejos sin exposición previa se cribaron primero contra lisados celulares de líneas celulares candidatas en una transferencia de Western con el fin de identificar a los animales que no tenían inmunorreactividad a las proteínas presentes en los lisados celulares. Dos conejos preseleccionados se inmunizaron con este péptido, y después de tres inmunizaciones en aproximadamente ocho semanas, se tomaron muestras de sangre de los conejos para ensayos. Se permitió a la sangre coagular incubando a 4°C durante 60 minutos. La sangre coagulada se centrifugó a 10.000 x g a 4°C durante 10 minutos para que sedimenten los restos celulares. La muestra de suero resultante se dispensó en alícuotas de 50 μ l y se almacenó a -20°C hasta que fuera necesaria.

Una estrategia similar basada en otros antígenos de SNAP-25 desvelados en la presente memoria descriptiva se utiliza para desarrollar anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Por ejemplo, el antígeno de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 47 puede conjugarse con KLH en lugar del antígeno de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 46. Como otro ejemplo, los aminoácidos 191-197 SNAP-25 humano del antígeno de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 38 pueden reemplazarse por la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43 o la SEQ ID NO: 44.

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

Para determinar la presencia de anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, se realizaron ensayos de ELISA comparativa y de escisión basados en células utilizando el suero de conejo extraído tal como se ha descrito en el ejemplo III. El suero de los conejos contenía anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Los anticuerpos policlonales de conejo α -SNAP-25 se designaron con NTP 22 y de NTP 23.

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

Para purificar los anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, anticuerpos NTP 22 y NTP 23 de suero de conejo se purificaron utilizando columnas de afinidad que contenían el antígeno de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 46.

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

Para evaluar la especificidad de unión de un anticuerpo policlonal α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, anticuerpos policlonales α -SNAP-25 NTP 22 y NTP 23 purificados se utilizaron para detectar el producto de escisión utilizando el análisis de actividad basado en células, inmunocitoquímica en inmunoprecipitación tal como se describe en el ejemplo III. El ensayo de escisión basado en células, el análisis de inmunocitoquímica y el análisis de inmunoprecipitación todos indicaban que los anticuerpos policlonales α -SNAP-25 NTP 22 y NTP 23 no reaccionan de forma cruzada con SNAP-25 no escindido. Por lo tanto ambos NTP 22 y NTP 23 tienen especificidad de unión alta para el

producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ lo que permite el reconocimiento preferencial de este producto de escisión en relación con el sustrato no escindido SNAP-25₂₀₆. Los afinidad por los antígenos puede determinarse utilizando SPR en BiAcore tal como se describe en el ejemplo III.

5 Ejemplo IX

Preparación de componentes y condiciones ELISA en sándwich

10 El ejemplo siguiente ilustra cómo identificar y preparar los componentes y las condiciones necesarias para llevar a cabo un ELISA el sándwich útil para la realización de los métodos basados en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida mediante la detección de un producto de escisión de SNAP-25 utilizando un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 específico para un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

15 **1. Preparación de lisados celulares de las células tratadas con endopeptidasa redirigida.**

Para obtener un lisado celular tratado con endopeptidasa redirigida para su análisis, una densidad adecuada de las células de un cultivo madre de Neuro-2a fue sembrada en un matraz T175 que contenía 50 ml de un medio libre de suero que contenía medio esencial mínimo, GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM. Estas células se incubaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que las células se diferenciaron, según lo determinado mediante criterios morfológicos estándar y de rutina, tales como detención del crecimiento y extensión de neurita (aproximadamente de 2 a 3 días). Como un control, una densidad adecuada de las células de un cultivo madre de Neuro-2a se sembró en un matraz T175 que contenía 50 ml de medio de cultivo adecuado (tabla 1). Estas células indiferenciadas de control se cultivaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que se alcanzó un 50% de confluencia (aproximadamente 18 horas). El medio de ambos cultivos diferenciado y de control indiferenciado se aspiró de cada pocillo y se sustituyó por medio fresco que contenía 0 (muestra no tratada) o 10 nM de endopeptidasa redirigida. Después de una incubación durante una noche, las células se lavaron y las células se recogieron mediante lisis en tampón de lisis recién prepararon Triton X-100 (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1%) a 4°C durante 30 minutos con agitación constante. Las células lisadas se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C para eliminar los restos utilizando una centrifuga de sobremesa. Se midieron las concentraciones de proteína de lisados celulares mediante análisis de Bradford.

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

35 Para identificar un par apropiado de anticuerpo de captura- anticuerpo de detección se realizó un análisis ELISA en sándwich con ECL en 26 diferentes combinaciones de pares de anticuerpos de captura y de detección, que comprendían once diferentes anticuerpos de captura α -SNAP-25 y siete diferentes anticuerpos de detección α -SNAP-25 (tabla 12). Los anticuerpos α -SNAP-25 utilizados fueron los anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 de ratón 2E2A6 y 3C1A5 desvelados en la presente memoria descriptiva, los anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 de ratón SMI-81, MC-6050 y MC-6053 desvelados en la presente memoria descriptiva, el anticuerpo policlonal de conejo α -SNAP-25 NTP 23 desvelado en la presente memoria descriptiva, el anticuerpo policlonal de conejo α -SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO), anticuerpos policlonales de conejo α -SNAP-25 H-50 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa CruzCA), anticuerpos policlonales de cabra α -SNAP-25 C-18 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), anticuerpos policlonales de cabra α -SNAP-25 N-19 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) y anticuerpos policlonales α -SNAP-25 de ratón SP12 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

Para preparar la solución de anticuerpo de captura, los anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 contenidos en las ascitis de líneas celulares de hibridoma 2E2A6 y 3C1A5, así como los anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 MC-6050 y MC-6053 se purificaron utilizando un protocolo estándar de purificación de proteína A. Todos los demás anticuerpos α -SNAP-25 se adquirieron como anticuerpos purificados.

Para preparar la solución de detección de anticuerpos, el anticuerpo apropiado α -SNAP-25 se conjugó a reactivo de marcado rutenio (II)-tris-bipiridin-(4-metilsulfonato) NHS éster (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) según las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). La reacción de conjugación se realizó añadiendo 30 μ l de solución madre MSD SULFO - TAG™ reconstituida en agua destilada a 200 μ l de 2 mg/ml de anticuerpos policlonales α -SNAP-25 e incubando la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas en la oscuridad. Los anticuerpos marcados se purificaron utilizando un protocolo de columna centrífuga estándar y la concentración de proteína se determinó utilizando un análisis de la proteína colorimétrico estándar. Se midió la absorbancia del conjugado de anticuerpo α -SNAP-25 /MSD SULFO - TAG™ a 455 nm con un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. La solución de detección de anticuerpos se almacenó a 4°C hasta que fuera necesaria.

Para preparar el soporte en fase sólida que comprende el anticuerpo específico para un producto de escisión de SNAP-25, aproximadamente 5 µl de la solución apropiada de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 (20 µg/ml de 1 x PBS) se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos MSD de unión elevada y a la solución se le permite secarse al aire en una cabina de seguridad biológica durante 2-3 horas con para que el líquido se evapore de la solución. Los pocillos con anticuerpo de captura unido se bloquearon a continuación añadiendo 150 µl de tampón de bloqueo que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y de suero de cabra al 10% (VWR, West Chester, PA) a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas bloqueadas se sellaron y almacenaron a 4°C hasta que fuera necesaria.

Para detectar la presencia de un producto de escisión de SNAP-25 escindido mediante análisis ELISA en sándwich con ECL, el tampón de bloqueo de las placas almacenadas se aspiró de los pocillos, 25 µl de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida, tal como se describió anteriormente, se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante una noche. Los pocillos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y aclarando cada pocillo tres veces con 200 µl de 1 x PBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después del lavado, se añadieron 25 µl de solución de anticuerpo de detección de 5 µg/ml que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en 1 x PBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)) a cada pocillo, la placa se selló y la placa sellada se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Después de la incubación del anticuerpo de detección, los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl de 1 x PBS .TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después de lavar, se añadieron 150 µl de 1 x tampón de lectura (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y las placas se leyeron utilizando un lector de imágenes SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Se calculó una relación dividiendo la señal obtenida a la dosis de 10 nM para cada par de anticuerpos por la señal obtenida en la dosis de 0 nM para cada par de anticuerpo (tabla 24). Estos resultados indicaron que entre las veintiséis diferentes combinaciones de pares de anticuerpos probados, sólo tres pares de anticuerpo tenían relaciones señal a ruido por encima de 10:1 para la dosis más alta ensayada: el par no. 1 (mAb 2E2A6 de ratón y pAb S9684 de conejo), par N° 4 (mAb 3C1A5 de ratón y pAb S9684 de conejo) y par N° 18 (pAb S9684 de conejo y mAb 2E2A6 de ratón). Al par de anticuerpos 1 fue elegido para el ulterior desarrollo de ensayo.

Tabla 24. Detección de combinaciones de anticuerpos α-SNAP-25

Par de anticuerpos no.	Anticuerpo de Captura	Anticuerpo de Detección	Detección del producto de escisión SNAP-25	Detección del sustrato no escindido SNAP-25	Relación señal/ruido (10 nM/0 nM)
1	mAb 2E2A6 de ratón	pAb S9684 de conejo	Sí	No	26,6:1
2	mAb 2E2A6 de ratón	pAb N-19 de cabra	Sí	No	7,3:1
3	mAb 2E2A6 de ratón	PAb H-50 de conejo	Sí	No	0,9:1
4	mAb 3C1A5 de ratón	PAb S9684 de conejo	Sí	No	12,1:1
5	mAb 3C1A5 de ratón	pAb N-19 de cabra	Sí	No	1,9:1
6	mAb 3C1A5 de ratón	PAb H-50 de conejo	Sí	No	0,9:1
7	pAb C-18 de cabra	pAb S9684 de conejo	No	No	0,8:1

ES 2 440 597 T3

8	pAb C-18 de cabra	pAb N-19 de cabra	No	No	0,9:1
9	pAb C-18 de cabra	pAb H-50 de conejo	No	No	0,9:1
10	pAb H-50 de conejo	mAb 2E2A6 de ratón	Sí	No	0,9:1
11	pAb H-50 de conejo	pAb C-18 de cabra	No	No	1,0:1
12	pAb N-19 de cabra	mAb 2E2A6 de ratón	Sí	No	0,9:1
13	pAb N-19 de cabra	pAb C-18 de cabra	No	No	1,1:1
14	pAb NTP 23 de conejo	pAb N-19 de cabra	Sí	No	1,2:1
15	pAb NTP 23 de conejo	pAb C-18 de cabra	No	No	1,1:1
16	pAb NTP 23 de conejo	pAb SP12 de ratón	Sí	No	1,3:1
17	pAb NTP 23 de conejo	pAb H-50 de conejo	Sí	No	1,1:1
18	pAb S9684 de conejo	mAb 2E2A6 de ratón	Sí	No	21,3:1
19	pAb S9684 de conejo	pAb C-18 de cabra	No	No	0,7:1
20	pAb S9684 de conejo	mAb SMI-81 de ratón	Sí	Sí	1,2:1
21	mAb SMI-81 de ratón	pAb S9684 de conejo	Sí	Sí	1,1:1
22	mAb SMI-81 de ratón	pAb N-19 de cabra	Sí	Sí	1,0:1

23	mAb SMI-81 de ratón	pAb C-18 de cabra	No	No	0,8:1
24	pAb SP12 de ratón	pAb C-18 de cabra	No	No	1,0:1
25	mAb MC-6050 de ratón	pAb S9684 de conejo	Sí	Sí	5,0:1
26	mAb MC-6053 de ratón	pAb S9684 de conejo	Sí	Sí	7,1:1

Ejemplo X

Método de detección de endopeptidasa redirigida basado en inmunología que tiene una actividad enzimática de cadena ligera de BoNT/A utilizando ELISA en sándwich con ECL

El siguiente ejemplo ilustra los métodos basados en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida mediante la detección de un producto de escisión de SNAP-25 utilizando un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 específico para un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A mediante ELISA en sándwich con ECL.

Para preparar un lisado a partir de células tratadas con endopeptidasa redirigida que tienen tener actividad enzimática de cadena ligera de BoNT/A, una densidad adecuada de las células de una línea celular establecida se sembró en los pocillos de las placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían 100 μ l de los medios adecuados. Estas células se incubaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% durante 24 horas. Los medios de las células se aspiraron de cada pocillo y se sustituyeron por medios frescos que contenían 0 (muestra no tratada) o una de las dosis se determinadas a partir de un experimento de respuesta a la dosis para esa endopeptidasa redirigida. Después de la incubación de 24 horas, las células se lavaron y se recogieron.

Para preparar la solución de anticuerpo de captura α -SNAP-25, se purificó el anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 contenido en las ascitis de la celular línea de hibridoma 2E2A6 utilizando un protocolo estándar de purificación de la proteína A. Para preparar la solución de anticuerpo de detección α -SNAP-25, anticuerpo policlonal de conejo α -SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) se conjugó al reactivo de marcado rutenio (II)-tris-bipiridin-(4-metilsulfonato) NHS éster (Meso Scale Discovery Gaithersburg, MD) según las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). La reacción de conjugación, purificación de anticuerpo marcado α -SNAP-25, determinación de la concentración y almacenamiento fueron tal como se describen en el ejemplo VI.

Para preparar el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo que es específico para un producto de escisión SNAP-25, aproximadamente 5 μ l de solución de de anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 2E2A6 (20 μ g/ml en 1 x PBS) se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos MSD de unión alta y a la solución se le permite secarse al aire en una cabina de seguridad biológica durante 2-3 horas con el fin de que el líquido se evaporará de la solución. Los pocillos unidos al anticuerpo de captura se bloquearon y se utilizaron directamente para detectar actividad endopeptidasa redirigida. Para detectar que la presencia de un producto de SNAP-25 escindido mediante análisis ELISA en sándwich con ECL, el tampón de bloqueo de las placas almacenadas se aspiró de los pozos, se añadieron 25 μ l de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida a cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante una noche. Los pocillos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y aclarando cada pocillo tres veces con 200 μ l de 1x PBS, TWEEN-20 ® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después del lavado, se añadieron 25 μ l de solución de 5 μ g/ml de anticuerpo de detección que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en 1 x PBS, TWEEN-20 ® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)) a cada pocillo, la placa se selló y la placa sellada se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Después de la incubación del anticuerpo de detección, los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de 1 x PBS, TWEEN-20 ® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después de lavar 150 ml de 1 x tampón de lectura (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) se añadieron a cada pocillo y las placas se leyeron utilizando un lector de imágenes SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Los datos recogidos se analizaron y la CE₅₀ se calculó tal como se indica en el ejemplo VI. Para endopeptidasas redirigidas a

opioides, estos resultados indican que de promedio 1,0 nM de Noc/A a la CE_{50} se detectaba (un intervalo de aproximadamente 0,3 nM a aproximadamente 2,0 nM) con una relación señal a ruido para la asíntota inferior de aproximadamente 15:1 aproximadamente 20:1 y una relación cociente señal a ruido de la asíntota superior de aproximadamente 180:1 a aproximadamente 300:1.

5

Ejemplo XI

Método de detección basado en inmunología de actividad endopeptidasa redirigida utilizando ELISA en sándwich con CL

10 El siguiente ejemplo ilustra los métodos basados en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida mediante la detección de un producto de escisión de SNAP-25 utilizando un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 específico para un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A por ELISA en sándwich con CL.

15 Lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida y la solución del anticuerpo de captura α -SNAP-25 se prepararán tal como se describió en el ejemplo VII.

20 Para preparar la solución de anticuerpo de detección α -SNAP-25, el anticuerpo policlonal α -SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) se conjugará con peroxidasa de rábano (HRP) según las instrucciones del fabricante (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). La reacción de conjugación se realizará añadiendo a 500 μ l de 1 mg/ml de anticuerpos policlonales α -SNAP-25 a un frasco que contenía peroxidasa activada liofilizada, mezclando los componentes, y a continuación añadiendo 10 μ l de cianoborohidruro de sodio. Esta mezcla de reacción se incubará a temperatura ambiente durante 1 hora en una campana de humos. Después de inactivar la reacción, los anticuerpos marcados serán purificados mediante un protocolo de columna centrífuga estándar y la concentración de proteína se determinará mediante un ensayo de proteína colorimétrico estándar. La absorbancia del conjugado de anticuerpo policlonal de SNAP-25/HRP se medirá en 25 455 nm con un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. La solución de anticuerpo de detección α -SNAP-25 se almacenará a 4°C hasta que fuera necesaria.

30 Para preparar el soporte de fase sólida que comprendía el anticuerpo de captura α -SNAP-25 que es específico para el producto de escisión SNAP-25, aproximadamente 100 μ l de solución de anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 2E2A6 (1 μ g/ml de 1 x PBS) se añadirán a cada pocillo de una placa de 96 pocillos Greiner blanca y las placas se incubarán a 4°C durante una noche, y a continuación se descartará cualquier solución de anticuerpos en exceso. Luego se bloquearán los pocillos unidos a anticuerpo de captura mediante la adición de 150 μ l de tampón de bloqueo que comprende reactivo de bloqueo de Amersham al 2% (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y de suero de cabra al 10% (VWR, West Chester, PA) a 35 temperatura ambiente durante 1 hora. Se descartará el tampón de bloqueo y las placas se transfirieron en seco sobre toallas de papel mediante inversión y golpeando ligeramente. Los pocillos unidos a anticuerpo de captura serán bloqueados a continuación y se utilizarán directamente para detectar actividad endopeptidasa redirigida.

40 Para detectar la presencia de un producto de escisión de SNAP-25 mediante un análisis ELISA en sándwich con CL, 50 μ l de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida se añadirán a cada pocillo, la placa se sellará, y la placa sellada se incubará en un agitador giratorio a 500 rpm a 4°C durante de 2 a 4 horas a una noche. Los pocillos de la placa se lavarán tres veces aspirando el lisado celular y aclarando cada pocillo tres veces con 200 μ l de 1x PBS, TWEEN-20 @ al 0,05% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después del lavado, se añadirán 100 μ l de solución 1 μ g/ml de anticuerpo policlonal α -SNAP-25/anticuerpo de detección HRP que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% 45 en 1x PBS, TWEEN-20 @ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)) a cada pocillo, la placa se sellará, y la placa sellada se incubará en un agitador giratorio a 650 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación del anticuerpo de la detección, los pocillos se lavarán tres veces con 200 μ l de 1x PBS, TWEEN-20 @ al 0,05% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después de lavar, se añadirán 100 μ l de mezcla SuperSignal ELISA Pico 50 1:1 (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) a cada pocillo y las placas se leerán utilizando un luminómetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 395 nm. Se analizarán los datos recogidos y la CE_{50} se calculará tal como se describe en el ejemplo VI.

Ejemplo XII

55 **Método de detección basado en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida utilizando ELISA en sándwich con ECL múltiple**

60 El siguiente ejemplo ilustra los métodos basados en inmunología múltiples de detección de actividad endopeptidasa redirigida mediante la detección de un producto de escisión de SNAP-25 mediante un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 específico para un producto de escisión de SNAP-25 y un segundo par de anticuerpo para una proteína diferente.

Un ensayo de potencia de endopeptidasa redirigida puede realizarse utilizando un ELISA en sándwich con ECL múltiple. Dicho ensayo se describe en la solicitud de patente correspondiente de Ester Fernandez-Salas, y col., *Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, Solicitud de patente de los E.E.U.U. N° de serie: 12/403.531 y puede ser utilizado con las líneas celulares y endopeptidasas redirigidas y las correspondientes líneas celulares desveladas en la presente memoria descriptiva.

Ejemplo XIII

Método de detección basado en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida utilizando ELISA en sándwich EC múltiple

El siguiente ejemplo ilustra métodos basados en inmunología múltiples de detección de actividad endopeptidasa redirigida mediante la detección de un producto de escisión de SNAP-25 mediante un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 específico para un producto de escisión de SNAP-25 y un segundo par de anticuerpo para una proteína diferente.

Un ensayo de potencia de endopeptidasa redirigida puede realizarse utilizando un ELISA en sándwich EC múltiple. Dicho ensayo se describe en la solicitud de patente correspondiente de Ester Fernandez-Salas, y col., *Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, Solicitud de patente de los E.E.U.U. N° de serie: 12/403.531 y puede ser utilizado con las líneas celulares y endopeptidasas redirigidas y las correspondientes líneas celulares desveladas en la presente memoria descriptiva.

Ejemplo XIV

Método basado en inmunología para detectar cantidades nanomolares de endopeptidasas redirigidas

El ejemplo siguiente ilustra cómo realizar métodos de detección de cantidades nanomolares de actividad endopeptidasa redirigida basados en inmunología.

1. Método basado en inmunología de detección de endopeptidasas redirigidas mediante ELISA en sándwich con ECL.

Para preparar un lisado de células tratadas con una endopeptidasa redirigida, aproximadamente de 50.000 a 150.000 células de una línea celular establecida adecuada para el análisis se sembraron en los pocillos de las placas de cultivo tisular de 96 pocillos con poli-D-lisina que contenían 100 μ l de los medios adecuados (véanse los ejemplos I y II). Estas células se incubaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% durante 24 horas. El medio de las células se aspiró de cada pocillo y se sustituyó por medio fresco que contenían 0 (muestra no tratada) y la respuesta a la dosis apropiada tal como se describe para cada endopeptidasa redirigida en esta solicitud. Después de una incubación de 24 horas, las células se lavaron y se recogieron o incubaron durante otros dos días sin endopeptidasa redirigida antes de recogerlas. Para recoger las células, el medio se aspiró, se lavó con 1 x PBS y se lisaron añadiendo 30 μ l de tampón de lisis que comprendía HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1% a cada pocillo y la placa se incubó en un agitador giratorio a 500 rpm durante 30 minutos a 4°C. La placa se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C para que sedimenten los restos celulares y el sobrenadante se trasladó a una placa de 96 pocillos recubierta de anticuerpos de captura para realizar la etapa de detección.

La solución de anticuerpo de captura α -SNAP-25, la solución de anticuerpo de detección α -SNAP-25 y el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura que es específico para un producto de escisión de SNAP-25 se prepararon tal como se describe en el ejemplo VII.

Para detectar que la presencia de un producto de SNAP-25 escindido por análisis ELISA en sándwich con ECL, el tampón de bloqueo de las placas almacenadas se aspiró, 25-30 μ l de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante 2 horas o 24 horas. Los pocillos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y aclarando cada pocillo tres veces con 200 μ l de 1x PBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20)). Después del lavado, se añadieron 25 μ L de solución a 5 μ g/ml de anticuerpo de detección α -SNAP-25 que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en 1x PBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20)) a cada pocillo. La placa se selló y la placa sellada se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Después de la incubación del anticuerpo de detección α -SNAP-25, los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de 1x PBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20)). Después del lavado, las placas se procesaron, se analizaron los datos recogidos y la CE₅₀ se calcularon tal como se indica en el ejemplo VI. Estos resultados indicaban que, de promedio, 1,0 nM de Noc/A a la CE₅₀ se detectaron cuando se utilizan la línea celular clonal SK-N-DZ #3 (un intervalo de aproximadamente 0,3 nM a aproximadamente 2,0 nM) con una relación señal a ruido para la asíntota superior de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 300:1. Además, de promedio 3,7 nM

de Noc/A a la CE_{50} se detectaron cuando se utilizan células de la línea celular clonal AGN P33 #6 (un intervalo de aproximadamente 2,0 nM a aproximadamente 5,5 nM) con una relación señal a ruido para la asíntota superior de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 500. Para las células SK12 que son específicas para la endopeptidasa redirigida que contiene un ligando dinorfina A, de promedio 8,4 nM de Dyn/A a la CE_{50} se detectaron cuando se utilizan las células SK12 (un intervalo de aproximadamente 4,5 nM a aproximadamente 10,0 nM) con una relación señal a ruido para la asíntota superior de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 20:1. Además, de promedio 8,8 nM de TVEMP-galanina a la CE_{50} se detectaron cuando se utilizan células de la línea celular clonal Neuro-2a #7 (un intervalo de aproximadamente 5,0 nM a aproximadamente 15,5 nM) con una relación señal a ruido para la asíntota superior de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 200:1. Este método también puede realizarse de manera múltiple, tal como se describe en el ejemplo IX.

2. Método basado en inmunología de detección de endopeptidasas redirigidas utilizando ELISA en sándwich con CL.

Lisado de células tratadas con una endopeptidasa redirigida y la solución del anticuerpo de captura α -SNAP-25 se preparará tal como se describe en el ejemplo VII. La solución de anticuerpo de detección α -SNAP-25 y el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura que es específico para un producto escindido de SNAP-25 se preparará tal como se describe en el ejemplo comparativo VIII.

Para detectar la presencia de un producto de SNAP-25 escindido mediante análisis ELISA en sándwich con CL, se añadirán 100 μ l de un lisado de células tratadas con una endopeptidasa redirigida a cada pocillo, la placa se sellará y la placa sellada se incubará en un agitador giratorio a 500 rpm a 4°C durante 2 horas o 24 horas. Los pocillos de la placa se lavarán tres veces aspirando el lisado celular y aclarando cada pocillo tres veces con 200 μ l de 1x PBS, TWEEN-20 @ al 0,05% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después del lavado, se añadirán 100 μ l de solución al 1 μ g/ml de anticuerpo policlonal α -SNAP-25 / anticuerpo de detección HRP que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en 1x PBS, TWEEN-20 @ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)) a cada pocillo, la placa se sellará, y la placa sellada se incubará en un agitador giratorio a 650 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación del anticuerpo de detección, los pocillos se lavarán tres veces con 200 μ l de 1x PBS, TWEEN-20 @ al 0,05% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después de lavar, se añadirán 100 μ l de mezcla SuperSignal ELISA Pico 1:1 (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) a cada pocillo y las placas se leerán utilizando un luminómetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 395 nm. Se analizarán los datos recogidos y la CE_{50} se calculará tal como se describe en el ejemplo VI. Este método también puede realizarse de manera múltiple, tal como se describe en el ejemplo IX.

Ejemplo XV

Método basado en inmunología para detectar anticuerpos neutralizantes α -endopeptidasa redirigida

El ejemplo siguiente ilustra cómo llevar a cabo un método basado en inmunología que puede detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes α -Noc/A.

Noc/A, actualmente está siendo evaluada para el tratamiento de afecciones dolorosas, algunas de ellas crónicas. Con el tratamiento de larga duración repetido de Noc/A, un paciente puede desarrollar anticuerpos neutralizantes α -Noc/A para la endopeptidasa redirigida que conducen a inmunorresistencia. Los anticuerpos neutralizantes α -Noc/A inhibirán la actividad endopeptidasa redirigida deteniendo la captación de endopeptidasa redirigida en células neuronales y otras diana uniéndose al ligando de dirección o el dominio de translocación (H_N) de la endopeptidasa redirigida. No se establece ningún ensayo para determinar la presencia de los anticuerpos neutralizantes α -Noc/A en sangre del paciente. Sería más rentable y consumiría menos tiempo si pudiera desarrollarse un ensayo basado en células para detectar anticuerpos neutralizantes en los pacientes tratados con endopeptidasas redirigidas.

Para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -Noc/A, pueden utilizarse los métodos basados en inmunología de determinación de actividad endopeptidasa redirigida desvelados en la presente memoria descriptiva. Una forma es determinar la cantidad de producto de escisión de SNAP-25 presente después del tratamiento con diversas concentraciones de Noc/A utilizando un método de detección de transferencia de Western, la otra forma era utilizar un método de detección de ELISA en sándwich con ECL.

Para preparar una muestra que comprende anticuerpos neutralizantes α -Noc/A, se aisló suero de la sangre de un mono inmunizado con Noc/A y los anticuerpos se purificaron por afinidad. También se inmunizaron conejos con el péptido variante nociceptina, el ligando objetivo presente en la molécula de Noc/A, su suero recogido y los anticuerpos purificados por afinidad (policlonales anticuerpos anti-nociceptina).

Para preparar un lisado a partir de células tratadas con una muestra que comprendía células de Noc/A, células de línea

celular clonal SK-N-DZ #3 de la célula y células de la línea celular clonal AGN P33 #6 se sembraron en placas de 96 pocillos de poli-D-lisina durante 16-18 horas. PAb anti-nociceptina a 0-3 $\mu\text{g/ml}$ se diluyó en RPMI SFM (con suplementos de NGF, B27 y N2) que contenía 1 nM de Noc/A y la mezcla se incubó previamente a temperatura ambiente durante 1 hora. a continuación las soluciones se añadieron a las células y se incubaron durante 24 h antes de realizar el ensayo de ELISA con ECL. Este anticuerpo variante anti-nociceptina bloqueaba totalmente la captación de Noc/A 1 nM a 1 $\mu\text{g/ml}$ (>90% de inhibición) en ambas líneas celulares. El anticuerpo policlonal anti-Noc/A de mono también ensayó estas líneas celulares. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos con poli-D-lisina a 100.000 células por pocillo durante 24 horas en medio de cultivo RPMI suplementado con N2, B27 y NGF. Los anticuerpos policlonales anti-Noc/A a 0-20 $\mu\text{g/ml}$ se diluyeron en medio que contenía 1 nM de Noc/A y la mezcla se incubó previamente a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación la mezcla se añadió a las células y se incubó durante 24 h antes de realizar el ensayo de ELISA con ECL. Se observó hasta el 60% a las concentraciones más altas de 6-20 $\mu\text{g/ml}$ de pAb anti-Noc/A en la línea celular SK-N-DZ y aproximadamente del 30% en la línea celular clonal AGN P33 línea celular #6. Esto puede deberse a que los anticuerpos policlonales anti-Noc/A no son específicos para el sitio de unión y contienen otros anticuerpos que se unen a otras partes de la molécula produciendo solamente un bloqueo parcial a las concentraciones ensayadas. Pueden ser necesarias concentraciones más altas, para conseguir el bloqueo completo.

Para detectar la presencia de un producto escindido de SNAP-25 mediante análisis de transferencia de Western, el medio se aspirará de cada pozo, las células se suspenderán en 50 μl de tampón de carga de SDS-PAGE y a continuación se calentarán a 95°C durante 5 minutos. Una alícuota de cada muestra recogida se analizará por transferencia de Western tal como se ha descrito en el ejemplo I, excepto que las muestras recogidas se separarán por SDS-PAGE utilizando geles Criterion al 12% 26 por pocillo (Bio - Rad Laboratories, Hercules, CA) y el suero de anticuerpo policlonal de conejo α -SNAP25₁₉₇ se utilizará como el anticuerpo primario (véase el ejemplo V). Los resultados revelarán la menor concentración de endopeptidasa redirigida que producirá una banda detectable de producto de escisión de SNAP-25 en la transferencia de Western.

Para detectar la presencia de un producto de SNAP-25 escindido mediante ELISA en sándwich con ECL, el medio se retiró de cada pocillo y las células se sometieron a lisis tal como se describe en el ejemplo VI. La solución de anticuerpo de captura α -SNAP-25, la solución de anticuerpo de detección α -SNAP-25 y el soporte de fase sólida α -SNAP-25 se prepararon tal como se describe en el ejemplo comparativo VIII. Los sobrenadantes se transfirieron al soporte de fase sólida α -SNAP-25 y un se realizó un ensayo ELISA en sándwich con ECL tal como se detalla en el ejemplo VI. Los datos recogidos se analizaron y la CE_{50} se calculó según lo descrito en el ejemplo VI, excepto que la CE_{50} es la dilución de suero necesaria para inhibir la actividad de la endopeptidasa redirigida a $\frac{1}{2}$ su máximo y la relación de la señal máxima (Señal_{Max}) con respecto a la señal mínima (Señal_{Min}) se obtuvo dividiendo la señal de producto de escisión de SNAP-25 obtenida con la dilución más alta de anticuerpo por la señal obtenida con la menor dilución de anticuerpo.

Los resultados indican que pudo detectarse la presencia de anticuerpos neutralizantes α -Noc/A en el suero de mono y la presencia de anticuerpos variantes α -nociceptina. La actividad de la molécula Noc/A incubada en anticuerpos purificados por afinidad del animal inmunizado disminuía a medida que disminuía la dilución de anticuerpos. El mismo ensayo se realizará con la Dyn/A y los compuestos TVEMP-galanina utilizando las líneas celulares específicas para cada compuesto a ensayar.

Ejemplo XV

Desarrollo de un ensayo basado en células una endopeptidasa redirigida a galanina

El ejemplo siguiente ilustra cómo identificar las líneas celulares establecidas que poseen la capacidad de captación de endopeptidasa redirigida necesaria para el desarrollo de un ensayo de potencia basado en células.

1. Crecimiento del cultivo madre de líneas celulares candidatas.

Para cultivar las líneas celulares, una densidad adecuada de las células de la línea celular que está siendo ensayada se sembraron en un matraz de cultivo tisular de 162 cm^2 contenía 30 ml de medio de cultivo adecuado (véase la tabla 25) y se cultivaron una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% o al 10% hasta las células alcanzaron la densidad deseada.

2. Cribado de líneas celulares comerciales para la sensibilidad a los compuestos galanina TVEMP-galanina

Tabla 25. Tabla resumen de todas las líneas celulares y sus respectivos medios.

Tipo de la célula; Descripción; fuente	Medio completo (CM) todos de Invitrogen (a menos que se especifique lo contrario)	Medio libre de suero (SFM) todos de Invitrogen, (a menos que se especifique lo contrario)
SiMa (línea celular de neuroblastoma humano, DSMZ # 164 ACC, Braunschweig, Alemania) SiMa H1 (línea celular clonada de células SiMa)	RPMI 1640 (90%) Suero fetal bovino (SFB, 10%) AANE (0,1 mM), HEPES (10 mM), Piruvato de sodio (1 mM) penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml),	RPMI 1640 (90%) AANE (0,1 mM), HEPES (10 mM), Piruvato de sodio (1 mM) (100 U/ml) de penicilina estreptomycin (100 µg/ml) suplemento N2 (1 x) Suplemento B27 (1 x)
Neuro-2a (neuroblastoma de ratón: (ATCC #CC1131, Manassas, VA,)	MEM de Earle (90%) Suero fetal bovino 10%) AANE (0,1 mM), HEPES (10 mM), Piruvato de sodio (1 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml)	EMEM (90%) AANE (0,1 mM), HEPES (10 mM), Piruvato de sodio (1 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml)
PC-12 feocromocitoma de rata (ATCC # CRL-1721)	RPMI 1640 (90%) FBS Dializado (5%) Suero de caballo (10%) HEPES (10 mM) Piruvato de sodio (1 mM) D-glucosa (0,5%, Sigma) penicilina (100 U/ml); Suplemento N2 (1 x) estreptomycin (100 µg/ml)	Medios de diferenciación: RPMI 1640 (90%) HEPES (10 mM) Piruvato de sodio (1 mM) D-glucosa (0,5%, Sigma) penicilina (100 U/ml); Estreptomycin (100 µg/ml) Suplemento N2 (1 x) Albúmina de suero bovino (0,2% p/v) NGF (50 ng/ml, Promega)
Carcinoma embrionario de ratón P19 (ATCC #CRL-1825)	Alfa MEM (90%) Suero bovino (7,5%) FBS (2,5%) Penicilina (100 U/ml); Estreptomycin (100 µg/ml)	Alfa MEM (90%) FBS (2,5%) Penicilina (100 U/ml); Estreptomycin (100 µg/ml)
AANE: aminoácidos no esenciales, MEM: medio esencial mínimo. DMEM: MEM de Dulbecco. EMEM MEM de Earle. Tenga en cuenta que las células de PC-12 se diferenciaron en medio de diferenciación y no en SFM.		

5

Las líneas celulares comerciales se cribaron por su sensibilidad a compuestos de TVEMP-galanina según lo medio mediante la escisión de SNAP25 después del tratamiento con los correspondientes compuestos. Se utilizaron diversos compuestos de TVEMP-galanina para la investigación y los ensayos. Las células PC-12, Neuro-2a, SiMa y P19 se sembraron en medio libres de suero durante tres días o en CM durante un día. Estas células diferenciadas y sin exposición previa se trataron durante 18 horas con el lote A TVEMP-galanina, a concentraciones de 0 y 75 nM. El lote A de TVEMP-galanina mostraba una actividad en células tanto PC-12 como Neuro-2^a tal como se ve mediante la presencia incrementada de SNAP25 escindido y células Neuro-2a en estado diferenciado son más sensibles a los compuestos TVEMP con ligando galanina, que las células sin exposición previa. El orden de rango de la actividad de muestra que las células PC-12 tienen mayor actividad, seguida por Neuro-2a y finalmente las células de SiMa. Era necesario determinar si la captación era específica para estos compuestos redirigidos a galanina y por lo tanto, era importante ensayar las células con otros compuestos que no contienen el ligando de galanina. Noc/A es un compuesto redirigido que contiene un ligando variante de nociceptina y LH_N/A (control negativo) un compuesto que carece de dominio de unión. La captación de LH_N/A

10

15

es inespecífica y debe tener una actividad significativamente menor que el compuesto de TVEMP-galanina si la línea celular posee captación específica para el compuesto redirigido. El compuesto de Noc/A ha demostrado previamente tener captación específica en las células SiMa y se utilizará como punto de partida para ensayar las líneas celulares. Una línea celular favorable debe tener baja captación de la LH_N/A y el compuesto de Noc/A y elevada captación del compuesto de TVEMP-galanina. La tabla 26 muestra los resultados de este experimento.

Tabla 26. Cribado de células PC-12, Neuro-2a y SiMa en diferentes condiciones utilizando TVEMP-galanina.

		TVEMP-galanina. Lote A	TVEMP-galanina. Lote B	LH _N /a	Noc/A
Concentración (mg/ml)		0,168	0,175	1,63	1,00
Valores de CE ₅₀ (nM)	PC-12, sin exposición previa	73,4 ±10,7	105,6 ±16,0	> 200	72,9 ±26,9
	SiMa, sin exposición previa	138,6 ±43,9	133,8± 24,2	> 300	48,3 ±18,1
	Neuro-2a, sin exposición previa	122,4 ±15,7	116 ± 17,5	> 200	> 150
	SiMa, Dif O/N	> 400	> 150	> 400	16,1 ± 11,9
	Neuro-2a Dif 4D		34,5 ±7,5	39,7 ± 5,6	105,9 ± 44,3
	SiMa, Dif 4D	101,8 ±20,5	65,3 ± 7,8	> 150.	88,7 ±23,3 6

Ensayo de lotes A y B de TVEMP-galanina y controles LH_N/A y Noc/A en diversas líneas celulares y condiciones de cultivo/diferenciación. Cuadro resumen que muestra detalles de cada compuesto ensayado más valores de CE₅₀.

Los resultados muestran que el lote A de TVEMP-galanina y el lote B de TVEMP-galanina tenían gráficas o valores de CE₅₀ que eran similares a, o solamente 1-2 veces más activos que los controles negativos en las líneas celulares ensayadas. Este dato implica que las células nativas no son suficientemente sensibles y que estas células tendrán que ser transfectadas con los plásmidos que codifican proteínas receptoras de galanina o receptores GalR1 o GalR2.

3. Transfección estable de células PC-12, Neuro-2a y SiMa con GalR.

Un día antes de la transfección, las células se sembraron a densidades de 0,5 x 10⁶ células/pocillo en una placa de 6 pocillos recubierta con IV (Cat #354554: BD Biosciences) (SiMa, PC-12) o una placa Costar de 6 pocillos (Cat # 3516: Corning) (Neuro-2a). Se realizaron transfecciones diluyendo 12 µl de Lipofectamine™ 2000 (Cat # 52758, Invitrogen) en 250 µl de medio de suero reducido Opti - MEM® I (Cat # 3195, Invitrogen) seguido de incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Cuatro microgramos de ADN del plásmido GalR se mezclaron con 0,4 µg del vector pAdVantage™ (1 mg/ml, Cat #E1711, Promega) en 250 µl de medio de suero reducido Opti - MEM® durante 5 minutos. Después de 5 minutos de incubación, el Lipofectamine™ 2000 diluido y el ADN de plásmidos diluido se mezclaron y se incubaron durante 20 min adicionales a temperatura ambiente, para la formación de complejos. Mientras tanto, las células se lavaron con OPTI-MEM® y se añadieron 0,5 ml de OPTI-MEM® a cada pocillo. Después de la incubación de 20 minutos, se añadieron cuidadosamente 0,5 ml que contienen los complejos de Lipofectamine™ 2000 diluido y ADN de plásmidos diluido a los pocillos que contenían las células en 0,5 ml de OPTI-MEM®. La placa se incubó a 37°C durante 5 horas, tras lo cual se añadió 1 ml de medio completo. Al día siguiente, el medio se sustituyó por medio de cultivo durante 48 horas. El día 4, después de que las células se recuperaron de la transfección, el medio de cultivo se sustituyó por medio de cultivo fresco que contenía Geneticin® (Cat #10131: Invitrogen) a 0,5 mg/ml (dilución 1:100) y se incubó durante 3 días adicionales. El día 7 después de la transfección, las células fueron transferidas a un matraz de colágeno IV de 75 cm (Cat # 35423: BD Biosciences) que contenía medio de cultivo y geneticin (0,5 mg/ml, dilución 1:100). En esta transferencia, aproximadamente el 90% de las células murieron y fueron retiradas durante el cambio de los medios. El medio de cultivo que contenía geneticin (0,5 mg/ml, dilución 1:100) se cambiaba cada dos días hasta el día 21.

Para la selección de células estables capaces de captar compuestos de TVEMP y galanina, los parámetros eran cribar en busca de clones que producen el mayor porcentaje de escisión de SNAP25 con tratamiento con TVEMP-galanina en el

ELISA en sándwich con ECL utilizando placas recubiertas con 2E2A6 monoclonal para la captura y anticuerpo policlonal SNAP25 sulfomarcado (Sigma Cat # S9684) para la detección. Los valores de CE_{50} en la tabla 27 muestran que el Lote D de TVEMP-galanina exhibe una captación como mínimo diez veces mayor que el control negativo en las células SiMa y Neuro-2a transfectadas con GalR1 y GalR2 y captación sólo 2-4 veces mayor en las células PC-12 transfectadas. Dado que las células PC-12 transfectadas parecen tener menor sensibilidad y especificidad que las células SiMa y Neuro-2a, no se clonarán. Además, dado que el ligando 1-16mero de galanina en los compuestos TVEMP-galanina se une al receptor GALR1 con más afinidad que al GALR2, se clonarán solamente las células transfectadas con GALR1. La figura muestra también que los lotes C y D de TVEMP-galanina exhiben 9-10 veces mayor captación que tanto LH_N/A y como el compuesto redirigido a nociceptina TVEMP-nociceptina en el GalR1 de Neuro-2a.

Tabla 27. Ensayo de poblaciones transfectadas de forma estable pero no clonales de SiMa, Neuro-2a y PC12 transfectadas con receptores GalR1 o GalR2

	TVEMP-galanina C	TVEMP-galanina D	LH_N/a	TVEMP-nociceptina	
Concentración (mg/ml)	1,260	0,303	1,46	1,00	
Valores de CE_{50} (nM)	SiMa GalR1	36,2 ± 8,6	> 300		
	SiMa GalR2	26,6 ± 6,7	> 300		
	PC-12 GalR1	64,1 ± 19,5	202,7		
	PC-12 GalR2	> 150	> 300		
	Neuro-2a GalR1	32,2 ± 3,3	40,8 ± 6,0	> 300	>; 300
	Neuro-2a GalR2	35,2 ± 3,1	46,0 ± 6,1	> 300	> 300

Las poblaciones no-clonales seleccionadas no son una buena población de células a utilizar con regularidad porque contienen una mezcla de células que expresan diferentes niveles del receptor y estas poblaciones pueden cambiar con el tiempo. Para obtener líneas celulares estables derivadas de células individuales, se inició un enfoque clonación dilucional. El día 21, las células transfectadas se tripsinizaron, se disociaron con aguja y se contaron. Las restantes líneas celulares transfectadas se congelaron para utilización futura. Las células se diluyeron sucesivamente a 10 células/ml en medio de cultivo que contenía geneticin (0,5 mg/ml, dilución 1:100). 2 x placas de 96 pocillos recubiertas de colágeno IV (SiMa, PC-12) o 2 placas Costar de 96 pocillos (Neuro-2a) se sembraron a 100 μ l por pocillo para lograr una densidad de 1 célula por pocillo. Las placas se devolvieron a la incubadora y se dejaron intactas dos semanas para la formación de la colonia. Después de dos semanas (día 35), los pocillos se revisaron cuidadosamente para detectar la presencia de colonias individuales formadas en el fondo del pocillo (todo el pocillo se comprobó cuidadosamente para múltiples colonias). Cuando un pocillo se identificó con un grupo de células individual, todo el pocillo fue analizado cuidadosamente para asegurarse de que un y sólo un grupo de células estaba presente. Se tomó una foto de ese grupo individual. Si hubiera alguna duda sobre los grupos adicionales, el pocillo no se seleccionaba. El día 36, los clones que se seleccionaron se separaron con TrypLE y se añadieron 0,5 ml de medio completo que contenía geneticin (0,5 mg/ml, dilución 1:100) fue agregado para detener la reacción de tripsina. Todo este volumen se transfirió a placas de 6 pocillos y se diluyó adicionalmente con 3,0 ml adicionales de medio completo que contenía geneticin (0,5 mg/ml, dilución 1:100). A los clones se les permitió crecer hasta el 90% de confluencia, luego se tripsinizaron otra vez y se transfirieron a matraces con colágeno IV o Costar de 75 cm con 10,0 ml de medio completo que contenían geneticin (0,5 mg/ml, dilución 1:100). Una vez que las células eran confluentes al 90% de nuevo, las células se utilizaron para llenar tres crioviales para almacenamiento congelado o se utilizaron para la detección en el ensayo de ELISA de compuestos redirigidos a galanina.

El compuesto de referencia TVEMP-galanina, lote C se utilizó para ensayar estos clones utilizando dos operadores que realizaron pruebas independientes. Los clones de SiMa GalR1 crecieron lentamente y no estaban disponibles para los ensayos en ese momento. Afortunadamente, los clones de Neuro-2a crecieron más rápido y pronto suficientes cantidades de 8 de los 12 clones estaban disponibles para los ensayos. Estas células clonales Neuro-2a GalR1 se ensayaron con una gama de dosis completa de compuestos TVEMP-galanina (0-300 nM) y los resultados de nueve de estos clones se

5 muestran a continuación. Los restantes cuatro clones crecieron muy lentamente y no fueron ensayados. Las células parentales seleccionadas pero no clonales se sembraron junto con los clones para utilizar como punto de referencia. Tabla 28 muestra la actividad de cada uno de los ocho clones junto a las células Neuro-2a GalR1 no-clonales seleccionadas, cuando se ensayan con compuesto TVEMP-galanina. De los ocho clones ensayados, sólo los clones #4, 7 y 12 presentaron buena captación del compuesto TVEMP-galanina con valores de CE₅₀ aceptable. Los clones Neuro-2a GalR1 # 1, 3 y 10 no captaban los compuestos TVEMP-galanina, mientras que los clones # 5, 11 y 13 junto con la población no-clonal generaban valores de CE₅₀ muy altos y no se realizaron más ensayos con estas células.

Tabla 28. Resultados del cribado de clones derivados de una única célula Neuro-2a GalR1 el lote C de TVEMP-galanina.

Placa	Tipo de la célula	CE ₅₀ ± error estándar (nM)	
		Operador 1	Operador 2
1	N2A no clonal	82,1±9,6	92,0± 10,8
1	N2A GALR1 clon #1	> ; 300	> 300
1	N2A GALR1 clon #3	> ; 300	> 300
1	N2A GALR1 clon #4	39,7±3,4	39,4±6,6
2	N2A no-clonales	211,2± 167,7	116,0±26,8
2	N2A GALR1 clon #5	202,6±82,9	113,0± 18,1
2	N2A GALR1 clon #7	23,1±3,3	15,5± 1,8
2	N2A GALR1 clon #10	> 300	> 300
3	N2A GALR1 clon #7	20,3 ± 1,6	38,0±6,3
3	N2A GALR1 clon #11	270,0±243	247,0±101
3	N2A GALR1 clon #12	43,2±5,2	57,5± 14,3
3	N2A GALR1 clon #13	144,1 ±143	184,7±15,6

10 **4. Caracterización de la expresión de GalR1 en las líneas celulares clonales**

15 El cribado de los clones mostraba que sólo los clones # 4, 7 y 12 son más sensibles que las células no-clonales. ARN mensajero (ARNm) se extrajo de estos 3 clones, así como las células Neuro-2a no clonales parentales no transfectadas y transfectadas de forma estable para la caracterización por RT-PCR utilizando las condiciones de RT-PCR que se describen en el ejemplo V y los cebadores descritos en la tabla 29.

Tabla 29. Cebadores específicos de GALR1 y GALR2

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
GALR1 dir.	CCCCATCATGTCATCCACCT 3' 5 "	150
GALR1 Inv.	5' ATGGGGTTCACCGAGGAGTT 3'	151
GALR2 dir.	5' CATCGTGCGGTGCTTTT 3'	152
GALR2 Inv.	5' AGCGGGAAGCGACCAAAC 3'	153

20 Los resultados de la tabla 30 muestran que las células no clonales transfectadas y los clones tienen mucho mayores cantidades de ARNm de GALR1 que las células parentales. En el cribado de células con TVEMP-galanina, el clon #7 mostró ser el más sensible a TVEMP-galanina. El clon #7 también ha mostrado tener la mayor cantidad de ARNm de GALR1 según la tabla 30. Los valores de CT para Neuro-2a GalR1 clon 7 (Neuro-2a #7) eran los más bajos, seguido por el clon 4 y luego el clon 12. Las no clonales ensayadas en este momento proporcionaron un CT cercano al clon 12, sin embargo, estas células contienen una población cambiante de forma constante de las células que contienen concentraciones variables del receptor GalR1 y, por lo tanto no eran consideradas una buena población para el trabajo

25

futuro. De los tres clones con bajos CE_{50} , el clon de Neuro-2a GalR1 clon #12 (Neuro-2a # 12) creció el más rápido, seguido por Neuro-2a clon #7 y por último Neuro-2a clon #4. Además de su tasa de crecimiento lento, Neuro-2a clon # 4 no se ensayó más porque la sensibilidad de Neuro-2a clon #7 era mucho mejor que para el clon #4.

Línea celular	Parental	No-clonal	Clon 4	Clon 7	Clon 12
CT promedio	32,0	21,7	20,8	19,3	21,6
Veces de cambio del ARNm	1,0	1269,5	2418,7	6793,8	1332,6

5

5.Comparación de la sensibilidad y especificidad de los clones #7 y #12 de Neuro-2a con compuestos TVEMP-galanina

Los dos clones se ensayaron uno junto a otro en un intento de identificar el más sensible y selectivo de los dos, de modo que pudieran recogerse datos de confianza del clon de mejor rendimiento. La tabla 31 muestra los resultados de estos dos clones cuando se trataron con TVEMP-galanina, lote C y LH_N/A para la sensibilidad y selectividad respectivamente. Ambos clones exhiben altas relaciones de señal a ruido. El clon #7 de Neuro-2a tiene una CE_{50} de 5,5 nM mientras que la CE_{50} para el clon #12 de Neuro-2a es 68,4 nM. El clon #12 de Neuro-2a tiene que ser ensayado con un intervalo de dosis de 0-300 nM, mientras que el clon #7 de Neuro-2a puede ensayarse con un intervalo de dosis de 0-30 nM para provocar una meseta a la concentración más alta utilizada. Ambos clones muestran buena separación entre LH_N/A y TVEMP-galanina, lote C, el clon #12 de Neuro-2a muestra algo de captación inespecífica a las altas concentraciones, mientras que clon #7 de Neuro-2a no lo hace. Tal como se ve en los resultados tabulados, el intervalo para ensayos con las células Neuro-2a #7 es diez veces menor que para las células Neuro-2a #12 dando como resultado en 10 veces menos compuesto utilizado para Neuro-2a # 7 que para Neuro-2a #12. El Neuro-2a #7 es 8 veces más selectivo que Neuro-2a clon #12 cuando se utilizó LH_N/A como comparación. La relación señal a ruido es superior a 100 para ambos clones, sin embargo, una relación de 10 sería suficiente para desarrollar un análisis de potencia basado en células. La CE_{50} para el clon Neuro-2a #7 es de 5,5 nM aproximadamente doce veces más baja que la de Neuro-2a #12, cuya CE_{50} es 68,4 nM. El intervalo de dosis bajo para los ensayos, la selectividad de 24 veces respecto a LH_N/A , la elevada relación señal a ruido, la excelente sensibilidad que da como resultado una baja CE_{50} y la baja cantidad de proteína necesaria para cada ensayo, todos implican que el clon #7 de Neuro-2a sería el clon para continuar con el ensayo de potencia basado en células para su utilización en la determinación de las relaciones de potencia para compuestos de TVEMP-galanina.

25

	Neuro-2a #7	Neuro-2a #12
Intervalo	0-30 nM	0-300 nM
Selectividad	24 veces	3 veces
Relación señal/ruido	190	547
Porcentaje de la señal de LH_N/A máxima respecto a la señal de TVEMP – Gal máxima	4,3%	37,6%
CE_{50}	5,5 nM	68,4 nM
Proteína necesaria	~ 1 mg	~ 10 mg

Neuro-2a # 7 y #12 se trataron con TVEMP-galanina, lote C y LH_N/A durante 16 horas en CM.
La actividad se detectó utilizando ECL-ELISA.

30 Ejemplo XVI

Generación de líneas celulares clonales que sobreexpresan el receptor KOR-1 para la captación de endopeptidasa redirigida a dinorfina A

El ejemplo siguiente ilustra cómo caracterizar y comparar varias líneas celulares clonales originadas de una línea celular establecida transfectadas con el receptor diana y posterior clonación de la línea celular. Este ejemplo específico se refiere a la identificación y caracterización de líneas celulares clonales transfectadas con hKOR-1 que se describieron en primer lugar en el ejemplo III, tabla 9.

5

Cuatro de los clones de AGN P33-KOR (clones número 9 Tabla 8, 9, 10 y 12 en el ejemplo III) se seleccionaron y ensayaron con Dyn/A con una respuesta a la dosis completa de 0-150 nM. Al mismo tiempo, dos clones de SiMa-KOR (clones número 12 y 16 de la tabla 9 en el ejemplo III) seleccionados y ensayados con Dyn/A con una respuesta a la dosis completa de 0-150 nM. En este experimento, AGN P33-KOR clones 8, 9 y 12 produjeron una captación muy baja y por lo tanto fueron descartados; el AGN P33 - KOR clon 10 muestra buena captación y se obtuvo una CE₅₀ de 30,3 nM. Los dos clones de SiMa-KOR ensayados exhiben buena captación y se obtuvo una CE₅₀ de 26,6 nM para el clon 16 y se obtuvo una CE₅₀ de 11,8 nM para el clon 12. Estos tres clones se ensayaron a continuación para la sensibilidad y selectividad comparando la captación del compuesto Dyn/A diana con el control negativo LHN/A que carece de un ligando diana y el control de Noc/A. La comparación de los tres clones y las células SiMa parentales utilizando una respuesta a la dosis completa de 0-150 nM se resume en la tabla 32.

10

15

Tabla 32.			
Línea celular	CE ₅₀ DYN/A (nM)	CE ₅₀ LHN/A (nM)	CE ₅₀ NOC/A (nM)
SiMa Parental	100	100	5,4
Clon AGN P33-KOR 10	9,7	> 150	9,4
SiMa-KOR clon 16	10,6	> 100	1,6
SiMa-KOR clon 12	4,65	> 150	19,7

Se produjo un marcado aumento en la captación de Dyn/A en los clones KOR-1 transfectados tratados con Dyn/A mientras que las células SiMa parentales mostraron una captación mínima del compuesto (la captación era similar a la del control negativo LHN/A). Hay algo de Noc/A en todas las líneas celulares incluyendo células SiMa parentales. Esto no es sorprendente, dado que la captación de Noc/A en las células SiMa se observó durante el desarrollo del ensayo para este compuesto redirigido. Además, la captación de Noc/A es la mejor en la línea celular AGN P33 que se derivaba específicamente para esta endopeptidasa redirigida. La diferencia entre la captación de Noc/A y la captación del compuesto Dyn/A es mayor en las células clonales de SiMa-KOR clon 12 (SK12). En todos los gráficos, la actividad del control negativo, LHN/A, es mínima, mostrando que, en ausencia del dominio de unión, no hay ninguna captación específica en estas líneas celulares y la más baja eran en las células SK12 mostrando que la captación del compuesto Dyn/A es altamente específica. a partir de estos resultados, el clon de SK12 se seleccionó para caracterización y optimización futuras.

20

25

Se realizaron estudios de optimización con las células SK12 para desarrollar un análisis robusto, específico y sensible. Se ensayaron varios parámetros incluyendo los medios de siembra en placa y densidades de siembra en placa, los medios de tratamiento y el tiempo de tratamiento. En la tabla 33 se ofrece un resumen de los datos obtenidos durante la optimización.

30

Medio utilizado		Tiempo de tratamiento	Células/pocillo				
siembra	tratamiento		25000	50000	75000	100000	150000
completa	completo	6 h + o/n	51,3	76	13,4	9,2	n/a
completa	completo	16 h	21,3	19,0	4,96	4,64	n/a
completa	completo	16 h	n/a	n/a	n/a	2,1	15,3
libre de suero	libre de suero	16 h	n/a	n/a	n/a	9,0	12,1
completa	libre de suero	16 h	n/a	10,3	5,4	8,97	8,38
completa	completa	16 h	n/a	7,7	4,86	13,72	11,26
libre de suero	libre de suero	16 h	n/a	11,2	8,5	8,4	9,2

La tabla B demuestra que las células sembradas a 100.000 células por pocillo en CM y tratadas con los compuestos en CM mostraban mayor variabilidad en los valores de CE_{50} de un experimento al siguiente (4,6; 1,2 y 13,72 nM) mientras que las células sembradas a 100.000 células por pocillo en SFM y tratadas con compuestos diluidos en SFM proporcionan las mejores curvas y valores de CE_{50} consistentes (9,0 y 8,4 nM). En el futuro, las células se sembrarían a 100.000 células por pocillo en SFM y se tratarían con compuestos en SFM también.

SK12 sembrada en placas de PDL a 100.000 células por pocillo en SFM durante 24 horas, seguida por el tratamiento en SFM durante 16 horas produjo el menor valor de CE_{50} de 8,4 +/- 1,1 nM y una relación señal a ruido de 12. Ambos de estos valores serían aceptables para la utilización futura de esta célula en CBPA.

Caracterización de células SK12 con el ensayo de unión de saturación

El ensayo de unión de saturación utilizado aquí se describe con detalle en el ejemplo V. Se realizaron estudios de unión de saturación utilizando el antagonista de KOR-1 3H -diprenorfina para evaluar la unión. En varios experimentos se midieron la unión total, específica y no específica. Una curva de unión de saturación de 3H -diprenorfina con el receptor se generó a partir de dos experimentos independientes. Parece que aproximadamente el 25% de la unión es inespecífica y el 75% es unión específica de la molécula al receptor. La afinidad de la molécula por el receptor es adecuada a 6,5 nM. La B_{max} indica que hay 23 fmol de receptores KOR-1 por célula en las células SK12.

Las realizaciones específicas desveladas en el presente documento pueden verse limitadas adicionalmente en las reivindicaciones utilizando las expresiones "constituida/o por" o "constituida/o esencialmente por". Cuando se utiliza en las reivindicaciones, ya sea tal como se presentaron o añadida como enmienda, la expresión de transición "constituida/o por" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en las reivindicaciones. La expresión de transición "constituida/o esencialmente por" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificadas y aquellos que no afectan materialmente a la o las características básicas y novedosas. Las realizaciones de la invención reivindicadas de este modo se describen y se habilitan inherente o expresamente y en el presente documento.

Además, se han hecho numerosas referencias a las patentes y publicaciones impresas en toda esta memoria descriptiva.

Para concluir, debe entenderse que las realizaciones de la invención desveladas en el presente documento son ilustrativas de los principios de la presente invención. Otras modificaciones que pueden emplearse están dentro del alcance de la invención, pero están limitadas por el alcance de las reivindicaciones. Así, a modo de ejemplo, pero no de limitación, configuraciones alternativas de la invención presente pueden utilizarse de acuerdo con las enseñanzas en el presente documento, pero están limitadas por el alcance de las reivindicaciones. Por consiguiente, la presente invención no está limitada a eso precisamente tal como se muestra y se describe, pero está limitada al alcance de las reivindicaciones

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar actividad endopeptidasa redirigida, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 a. tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida, en el que la célula de una línea celular establecida es susceptible a la actividad endopeptidasa redirigida por una endopeptidasa redirigida;
- 10 b. aislar de la célula tratada un componente SNAP-25 (proteína asociada a sinaptosoma 25) que comprende un producto de escisión de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A (toxina botulínica de serotipo A);
- 15 c. poner en contacto al componente SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 enlazado a un soporte de fase sólida, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; y
- d. detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25;
- 20 en el que la detección por el complejo anticuerpo-antígeno es indicativa de actividad endopeptidasa redirigida; en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25;
- 25 en el que el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79 o SEQ ID NO: 81, o una secuencia de ácido nucleico que es, como mínimo, el 90% idéntica a la SEQ ID NO: 71, la SEQ ID NO: 75, la SEQ ID NO: 77, la SEQ ID NO: 79 o la SEQ ID NO: 81;
- 30 y en el que el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 o SEQ ID NO: 91, o una secuencia de ácido nucleico que es, como mínimo, el 90% idéntica a la SEQ ID NO: 83, la SEQ ID NO: 87, la SEQ ID NO: 89 o la SEQ ID NO: 91.
- 35 2. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEQ ID NO: 72, la SEQ ID NO: 76, la SEQ ID NO: 78, la SEQ ID NO: 80 y la SEQ ID NO: 82; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEQ ID NO: 84, la SEQ ID NO: 88, la SEQ ID NO: 90 y la SEQ ID NO: 92.
- 40 3. El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el producto de escisión de SNAP-25 es SNAP-25₁₉₇.
4. El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno se detecta utilizando un ELISA en sándwich.
- 45 5. Un anticuerpo α -SNAP-25 que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25;
- 50 en el que el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79 o SEQ ID NO: 81, o una secuencia de ácido nucleico que es, como mínimo, el 90% idéntica a la SEQ ID NO: 71, la SEQ ID NO: 75, la SEQ ID NO: 77, la SEQ ID NO: 79 o la SEQ ID NO: 81;
- 55 y en el que el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 o SEQ ID NO: 91, o una secuencia de ácido nucleico que es, como mínimo, el 90% idéntica a la SEQ ID NO: 83, la SEQ ID NO: 87, la SEQ ID NO: 89 o la SEQ ID NO: 91.
- 60 6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 72, la SEQ ID NO: 76, la SEQ ID NO: 78, la SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 82; y una región variable de cadena ligera que comprende la

secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEQ ID NO: 84, la SEQ ID NO: 88, la SEQ ID NO: 90 y la SEQ ID NO: 92.

5

7. El anticuerpo de las reivindicaciones 5 ó 6, en el que el producto de escisión de SNAP-25 es SNAP-25₁₉₇.

10

8. El anticuerpo o método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 es un anticuerpo producido por el hibridoma ID3B8, teniendo dicho anticuerpo una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 84.

15

9. El anticuerpo o método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 es un anticuerpo producido por el hibridoma 2E2A6, teniendo dicho anticuerpo una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88.

20

10. El anticuerpo o método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 es un anticuerpo producido por el hibridoma 3C1A5, teniendo dicho anticuerpo una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90.

11. El anticuerpo o método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 es un anticuerpo producido por el hibridoma 3C3E2, teniendo dicho anticuerpo una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 o la SEQ ID NO: 82 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 92.

FIG. 1A.

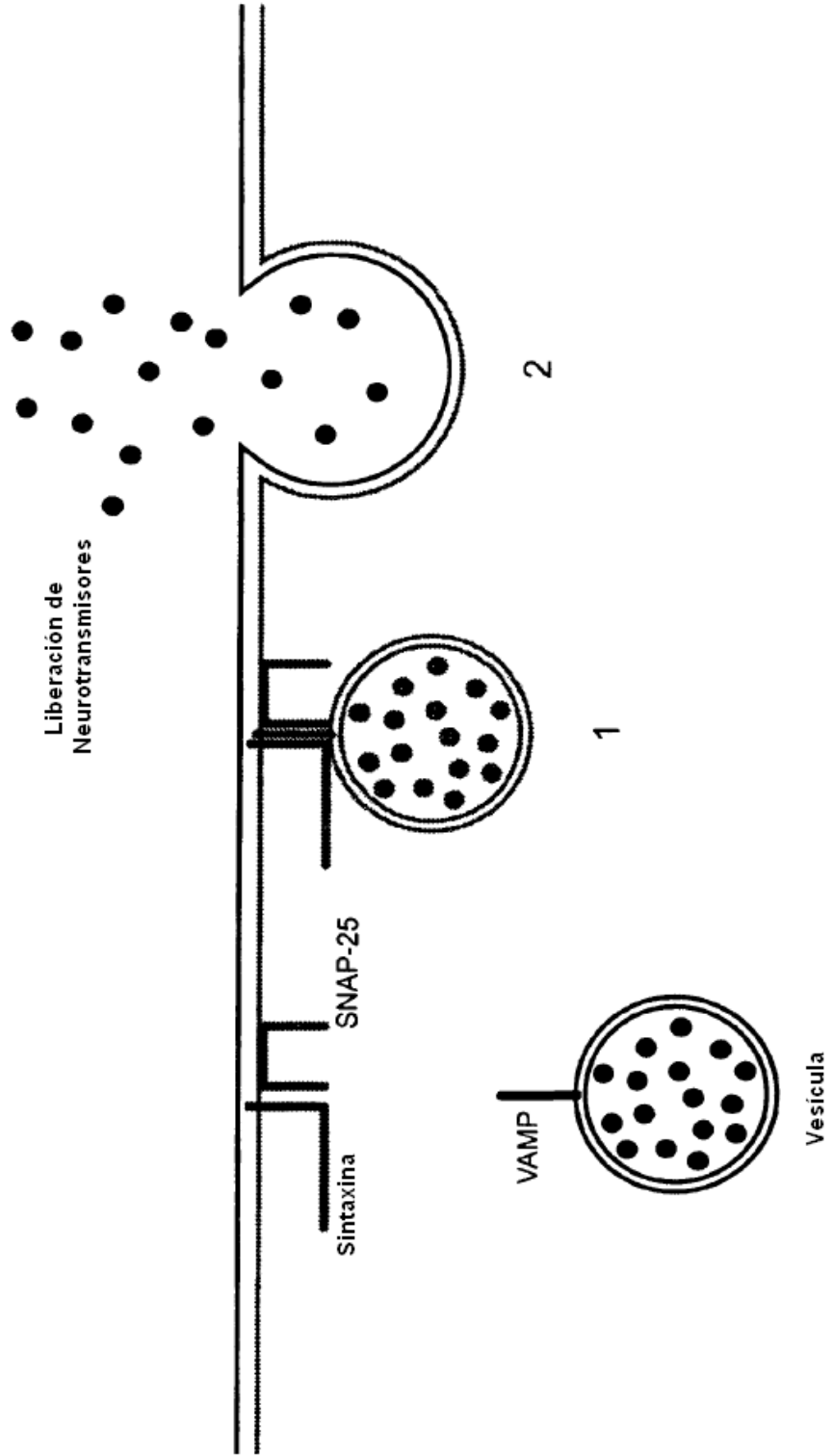


FIG. 1B.

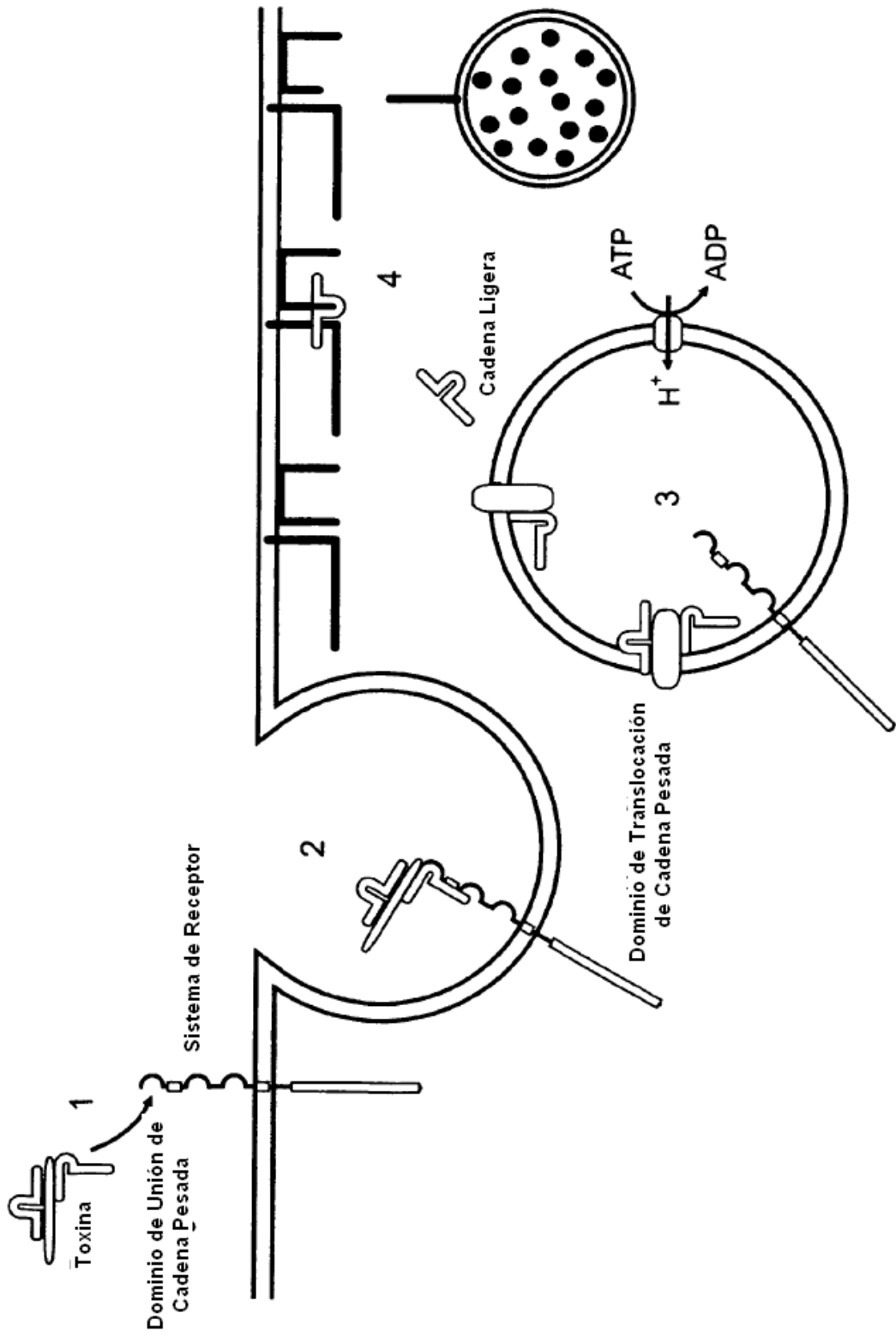


FIG. 2.

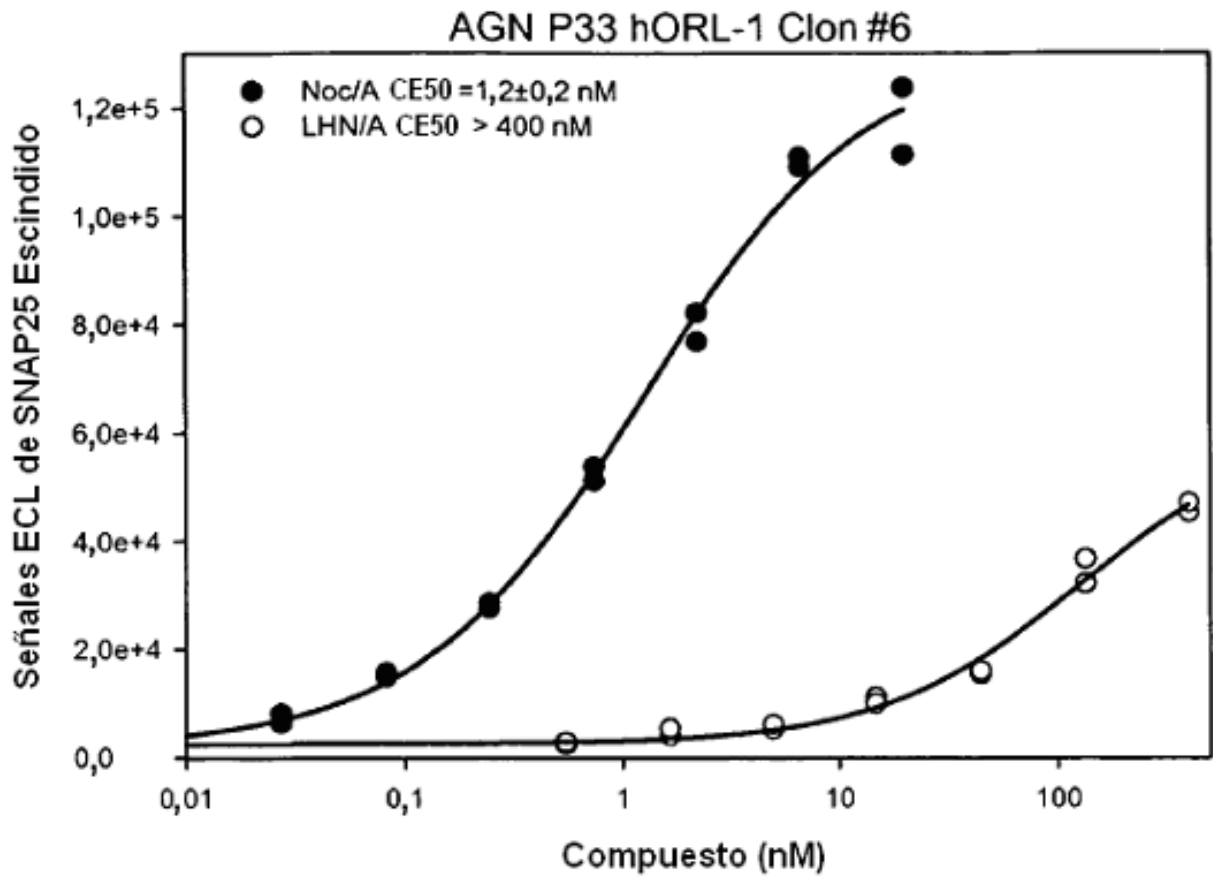


FIG. 3.

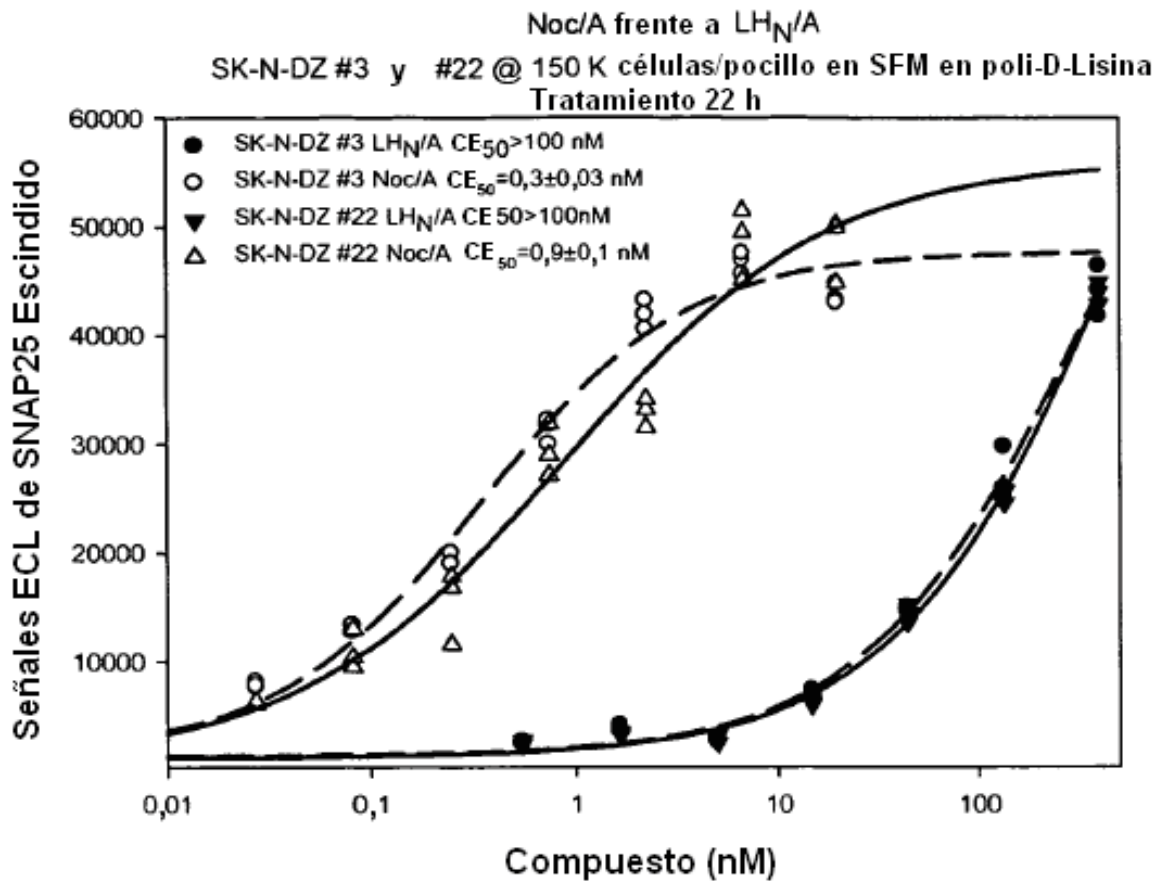


FIG. 4.

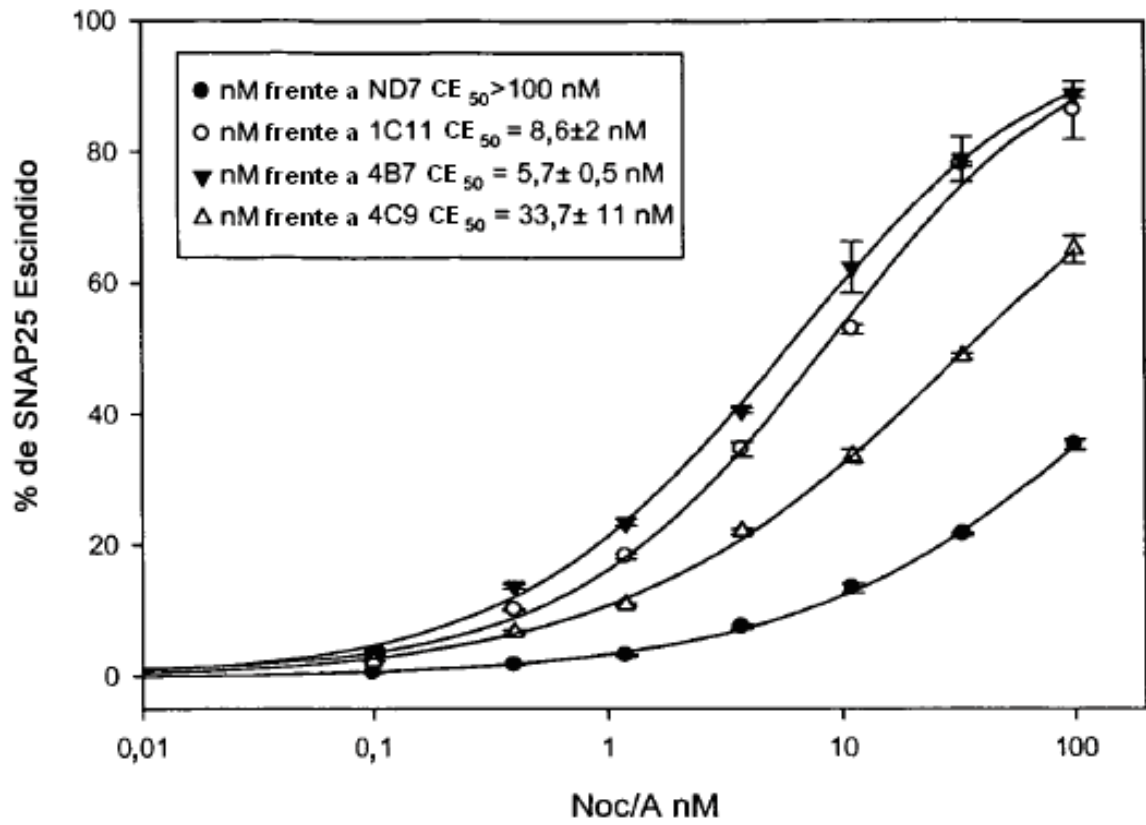


FIG. 5.

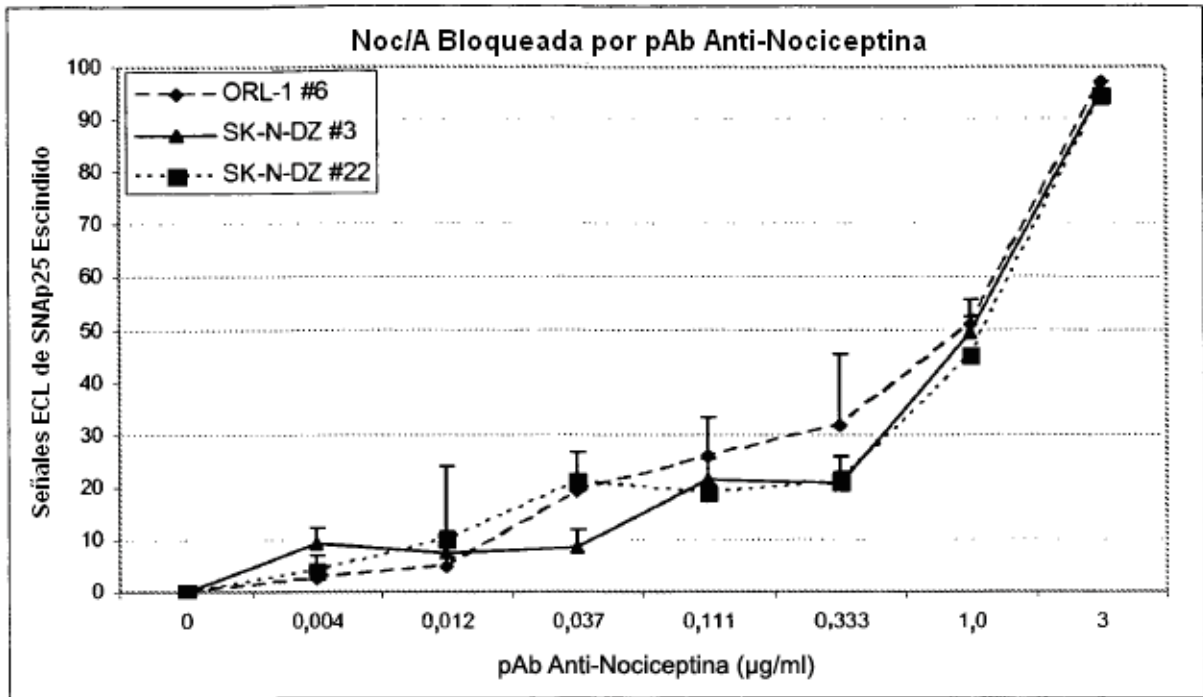


FIG. 6.

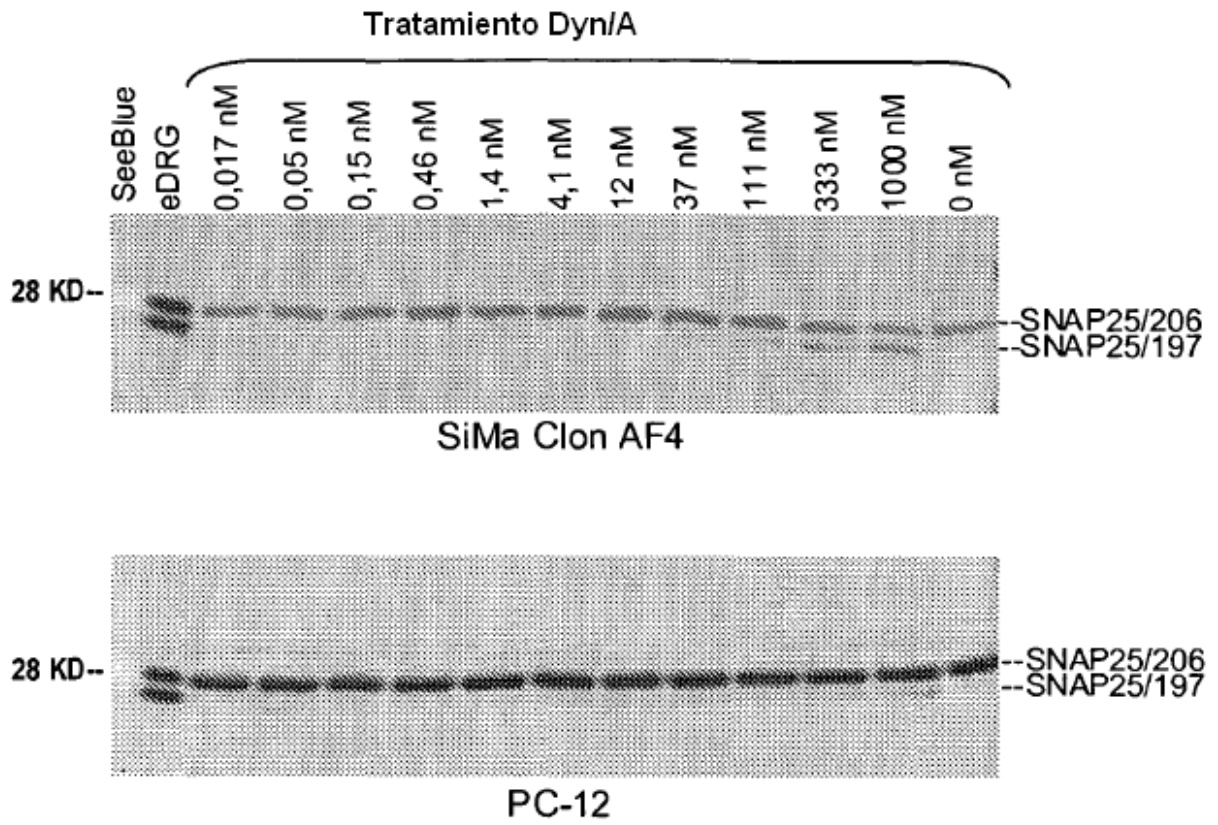


FIG. 7A.

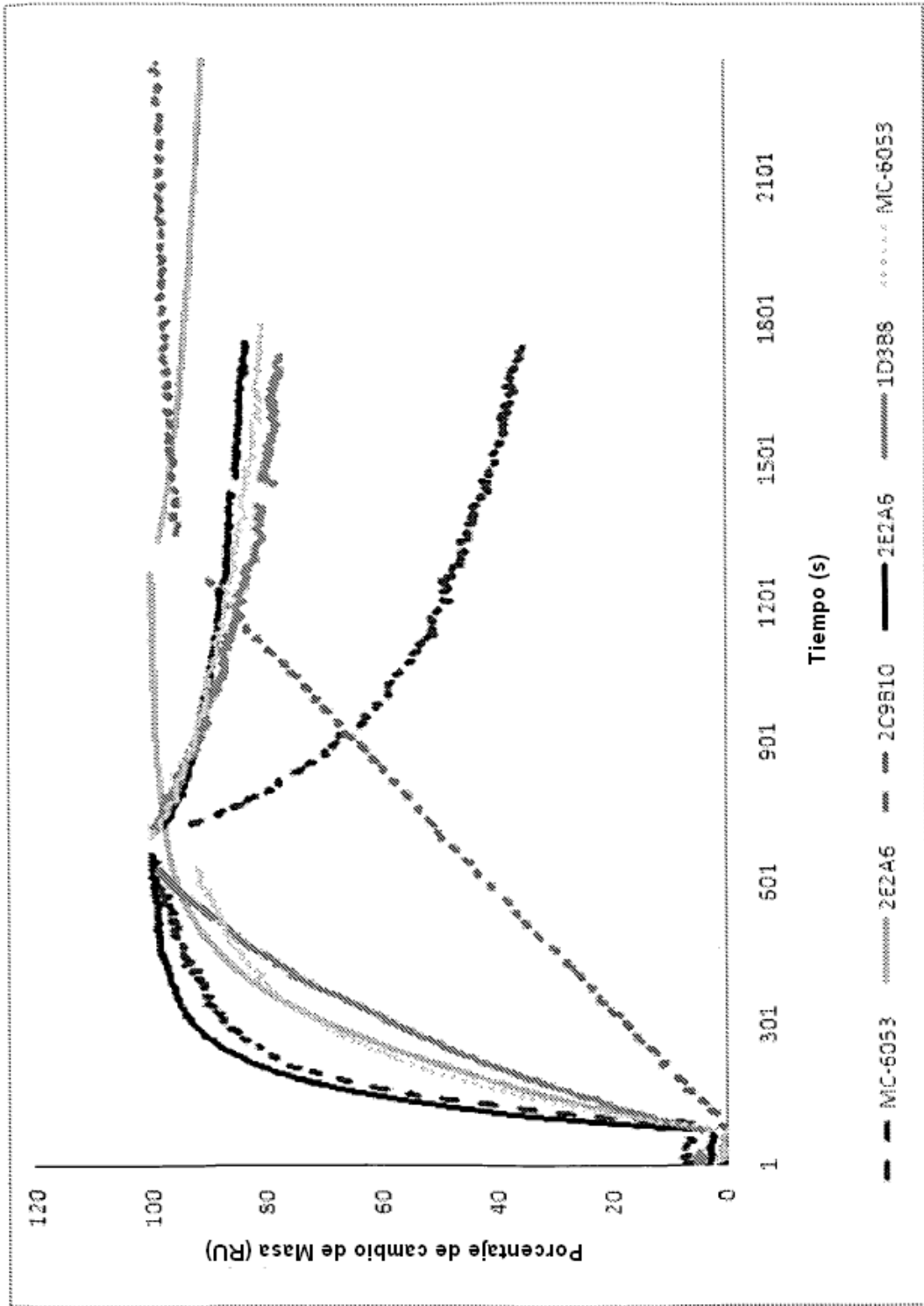


FIG. 7B.

