

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 059**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2011 E 11701015 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2526200**

54 Título: **Ensayo in vitro para cuantificar la actividad de neurotoxina clostridial**

30 Prioridad:

22.01.2010 EP 10000667
22.01.2010 US 336502 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2016

73 Titular/es:

MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA (100.0%)
Eckenheimer Landstrasse 100
60318 Frankfurt am Main, DE

72 Inventor/es:

WILK, THOMAS;
TAYLOR, HAROLD y
EISELE, KARL-HEINZ

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 576 059 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

Ensayo *in vitro* para cuantificar la actividad de neurotoxina clostridial

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a métodos novedosos para determinar la actividad biológica desconocida de una neurotoxina clostridial en una muestra con respecto a la actividad biológica conocida de una neurotoxina clostridial en una muestra de referencia. El método comprende la etapa de comparar la actividad biológica de una preparación de neurotoxina clostridial con la actividad biológica de una preparación convencional de una neurotoxina clostridial de referencia en determinados sistemas *in vitro*.

Antecedentes de la invención

15 En los últimos años, las neurotoxinas botulínicas se han convertido en el agente convencional en el tratamiento de indicaciones espásticas y distonías focales. El tratamiento de pacientes implica generalmente la inyección de la neurotoxina en el tejido muscular afectado, llevando al agente cerca de la placa final neuromuscular, es decir próxima al receptor celular que media en su captación en la célula nerviosa que controla dicho músculo afectado. Se han observado diversos grados de propagación de neurotoxinas. Se cree que esta propagación se correlaciona con las cantidades inyectadas y la preparación particular de neurotoxinas inyectadas. Resultantes de la propagación, pueden observarse efectos secundarios sistémicos en el tejido muscular cercano provocados por la inhibición de la liberación de acetilcolina. Los incidentes de parálisis involuntaria de músculos no tratados pueden evitarse en gran medida reduciendo las dosis inyectadas hasta el nivel terapéuticamente relevante. La sobredosis puede ser también un problema con respecto al sistema inmunitario de los pacientes, ya que la neurotoxina inyectada puede desencadenar la formación de anticuerpos neutralizantes. Si esto ocurre, la neurotoxina se inactivará sin poder aliviar la actividad del músculo involuntario.

Diferencias en las variaciones o equivalentes de dosis en la actividad determinada de preparaciones tales como lotes o productos disponibles para la venta producidos durante el proceso de fabricación, comúnmente un proceso de fermentación, suponen un riesgo aumentado para pacientes a través de posibles efectos secundarios y el desarrollo de inmunidad. Por tanto, es de crucial importancia determinar la actividad biológica de una neurotoxina clostridial contenida en dichos lotes de producción o productos para la venta de manera fiable (es decir, sin variación significativa) y de manera tan exacta como sea posible, con el fin de ajustar la concentración de neurotoxinas a una dosis eficaz fiable para beneficio del paciente. Esto puede servir también como un incentivo para que los fabricantes ofrezcan formulaciones que permitan un aprovechamiento óptimo de la actividad biológica para diferentes fines terapéuticos.

En la actualidad, la prueba de neurotoxinas botulínicas se realiza predominantemente usando el ensayo de DL₅₀ en ratón desarrollado hace más de 40 años (véase Boroff y Fleck, J. Bacteriol. 92 (1966) 1580-1581), que está aceptado para pruebas de potencia por agencias reguladoras europeas y de Estados Unidos. Este ensayo implica dosificar a los ratones diluciones de la muestra de neurotoxina botulínica que está sometiéndose a prueba y calcular la disolución a la que se esperaría que el 50% de los ratones muriesen. Puesto que este bioensayo requiere hasta 100 ratones para someter a prueba una única muestra, y se tardan hasta cuatro días en generar resultados, existe una gran necesidad de métodos alternativos que sean más rápidos y más precisos, y/o reduzcan, provoquen menos dolor, molestias, y/o reemplacen el uso de animales tales como ratones. Cualquier método alternativo de este tipo, con el fin de que sea aceptable para las agencias reguladoras para la determinación de la potencia, debe ser adecuado para el fin previsto del producto en cuestión y debe validarse para la sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y robustez. Para pruebas de neurotoxinas botulínicas, debe usarse un ensayo de potencia adecuado para determinar la dosis del producto final o para comparar las actividades fiables de diferentes lotes. Debido a que la actividad de neurotoxinas botulínicas depende de tres dominios funcionales dentro de la molécula de proteína, un ensayo de potencia aceptable debe tener en cuenta la actividad de todos los dominios. Para una discusión de asuntos relacionados con el problema sin resolver del reemplazo del ensayo de DL₅₀ en ratón, véase "Report on the ICCVAM-NICEATM/ ECVAM Scientific Workshop on Alternative Methods to Refine, Reduce or Replace the Mice LD50 Assay for Botulinum neurotoxin Testing", número de publicación de los NIH 08-6416, febrero de 2008.

Por ejemplo, diversos ensayos basados en células que usan una lectura de inmunotransferencia de tipo Western se han comentado en el contexto de identificar alternativas para el ensayo de DL₅₀ en ratón. Eubanks *et al.* describen un ensayo basado en anticuerpos para la detección de la escisión de SNAP25 por BoNT/A en células PC12 o Neuro-2A (Eubanks *et al.*, FEBS Lett. 2005; 579: 5361-4). Un ensayo similar se basa en la detección de SNAP25₁₉₇ en células Neuro-2A diferenciadas (Fernandez-Salas *et al.*, ABS-29 presentado en: Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins International Conference (Toxins 2005), 23-25 de junio de 2005, Denver, CO; Steward *et al.*, ABS-76 presentado en: Basic and Therapeutic of Botulinum and Tetanus Toxins International (Toxins 2005), 23-25 de junio de 2005, Denver, CO).

65 Alternativamente, se establecieron ensayos celulares que monitorizan la red neuronal o la liberación de

neurotransmisores en el tratamiento con neurotoxinas clostridiales. Chaddock *et al.* describen un ensayo basado en la detección de la liberación de ³H-glicina estimulada por potasio en un cultivo primario de células de médula espinal de rata fetal en tratamiento con BoNT/A (Chaddock *et al.*, *Protein Expr Purif.* 2002; 25: 219-28). Gross *et al.* Usaron la reducción de impulsos y ráfagas espontáneos como lectura en médula espinal murina embrionaria y células de la corteza frontal (Gross *et al.*, *Society for Neurosciences* 2003, resumen 122.9). Este ensayo fue desarrollado originalmente por Keefer *et al.* usando o bien BoNT/A o bien toxina del tétanos (Keefer *et al.*, *Society for Neurosciences* 2001, resumen 1302).

Adicionalmente, se estudiaron ensayos celulares usando sustratos de neurotoxinas botulínicas que portaban marcadores de fluorescencia. Dong *et al.* presentaron un ensayo de FRET en células PC12 usando SNAP25 o sinaptobrevina cada una marcada con dos proteínas fluorescentes para monitorizar la actividad de BoNT/A y BoNT/B, respectivamente (Dong *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 2004; 101: 14701-6). Se estableció un ensayo similar por Steward *et al.* en células Neuro-2A diferenciadas (Steward *et al.*, *International Conference on Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins*, 23-25 de junio de 2005, Denver, EE.UU.: ABS-76).

Sin embargo, los métodos de la técnica anterior a los que se hizo referencia anteriormente no han dado como resultado un método certificado por las autoridades reguladoras. Por tanto, aún debe realizarse el ensayo de muerte de ratón fuera de plazo, y existe todavía la necesidad de identificar ensayos alternativos.

Objetos de la invención

Un objeto de la invención era mejorar los métodos de la técnica anterior y desarrollar métodos precisos y fiables para determinar la actividad biológica desconocida de neurotoxinas clostridiales en una muestra, particularmente para uso farmacéutico y/o estético, de modo que tales métodos puedan usarse para fines regulatorios. Tal método mejorado serviría para satisfacer la gran necesidad de una administración segura y eficaz.

Sumario de la invención

Sorprendentemente, se ha encontrado que los métodos para determinar la concentración desconocida de neurotoxinas botulínicas en una muestra para uso clínico y/o estético pueden desarrollarse en sistemas *in vitro*.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la actividad biológica de una preparación de una neurotoxina clostridial, que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto al menos una partícula de prueba con una muestra de dicha preparación; y
- (b) comparar el efecto biológico de dicha muestra con el efecto biológico de una muestra de referencia;

en el que dicha al menos una partícula de prueba comprende al menos una membrana que encierra un volumen de reacción, en el que dicha membrana porta uno o más receptores para dicha neurotoxina clostridial que pueden mediar en la transferencia de dicha neurotoxina clostridial a dicho volumen de reacción, y en el que dicho volumen de reacción comprende un sustrato para la actividad proteolítica de dicha neurotoxina clostridial.

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un kit para un método *in vitro* para determinar la actividad biológica de una preparación de una neurotoxina clostridial, que comprende:

(a) al menos una partícula de prueba, en el que dicha al menos una partícula de prueba comprende al menos una membrana que encierra un volumen de reacción, en el que dicha membrana porta uno o más receptores para dicha neurotoxina clostridial que pueden mediar en la transferencia de dicha neurotoxina clostridial a dicho volumen de reacción, y en el que dicho volumen de reacción comprende un sustrato para la actividad proteolítica de dicha neurotoxina clostridial; y

(b) uno o más reactivos para determinar la unión de dicha neurotoxina clostridial a dicho uno o más receptores; y/o

(c) uno o más reactivos para determinar la proteólisis de dicho sustrato.

Descripción detallada de la invención

La presente invención puede entenderse más fácilmente mediante la referencia a la siguiente descripción detallada de la invención y los ejemplos incluidos en la misma.

En el contexto de la presente invención, el término "*in vitro*" se refiere a un sistema que no es un organismo vivo (es decir no "*in vivo*"). Además, un sistema "*in vitro*" no incluye una parte multicelular funcional tomada de tal organismo, por ejemplo un órgano o una preparación de órgano.

En el contexto de la presente invención, el término "neurotoxina clostridial" se refiere a una neurotoxina natural que

puede obtenerse de bacterias de la clase Clostridia, incluyendo *Clostridium tetani* y *Clostridium botulinum*, o a una neurotoxina que puede obtenerse de fuentes alternativas, incluyendo de expresión recombinante o de modificación genética o química de una neurotoxina natural de este tipo. Particularmente, las neurotoxinas clostridiales tienen actividad endopeptidasa. Dicha neurotoxina puede obtenerse de una célula clostridial o mediante expresión de la neurotoxina en una célula heteróloga tal como *E. coli*.

En el contexto de la presente invención, el término "preparación de una neurotoxina clostridial" se refiere a una composición que comprende una neurotoxina clostridial, incluyendo, pero sin limitarse a, la materia prima obtenida de un proceso de fermentación (, sobrenadante, composición tras lisis celular), una fracción que comprende una neurotoxina clostridial obtenida de la separación de los componentes de una materia prima de este tipo en un proceso de purificación, una neurotoxina clostridial aislada y esencialmente pura, y una formulación para uso farmacéutico y/o estético que comprende una neurotoxina clostridial y adicionalmente disolventes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término "poner en contacto" tal como se usa en el presente documento significa exponer la partícula de prueba a la muestra. Una manera de exponer la partícula de prueba a la muestra es incubar (bañar) la partícula de prueba en la muestra. Para este fin, la partícula de prueba puede colocarse por ejemplo en un recipiente de reacción que contiene un tampón fisiológico. El experto se dará cuenta de que la elección del tampón depende de las particularidades de la partícula de prueba. Con el fin de exponer la partícula de prueba a la muestra, puede añadirse una cantidad adecuada de la muestra al recipiente de reacción.

El experto reconocerá que puede requerirse un periodo de incubación mínimo para observar un efecto de la muestra que comprende la neurotoxina clostridial sobre la partícula de prueba. Aunque los periodos de incubación pueden ser diferentes de partícula de prueba a partícula de prueba, el experto puede establecer fácilmente condiciones adecuadas, que también dependerán de la concentración final de la neurotoxina.

En el contexto de la presente invención, el término "muestra de referencia" se refiere a una muestra tomada de una preparación patrón de una neurotoxina clostridial de referencia, es decir de una preparación que comprende una neurotoxina clostridial, en donde se conoce la actividad biológica de una cantidad dada de tal preparación patrón. La actividad biológica de tal preparación patrón puede determinarse, por ejemplo, mediante el ensayo de DL₅₀ en ratón descrito anteriormente. El valor de DL₅₀ define la cantidad de neurotoxina a la que muere el 50% de una población de ratones si se aplica dicha cantidad a los ratones de dicha población de ratones. El valor de DL₅₀ define la denominada "unidad" que es la unidad comúnmente aceptada usada para definir una cantidad de una neurotoxina clostridial contenida en una muestra. El experto en la técnica conoce el método para determinar dicho valor. El método se documenta en la Farmacopea Europea (6ª edición; disponible de la Dirección Europea de Calidad de Medicamentos y Asistencia Sanitaria (EDQM), 7 allée Kastner, CS 30026, F-67081 Estrasburgo, Francia).

En el contexto de la presente invención, el término "partícula de prueba" se refiere a una partícula que se caracteriza por al menos una superficie externa que encierra al menos una cavidad que contiene un volumen de reacción. Normalmente, la superficie externa de dicha partícula de prueba es una bicapa lipídica que encierra un volumen de reacción luminal. La partícula puede generarse *de novo* a partir de sus componentes o puede obtenerse a partir de una célula mediante métodos de preparación conocidos en la técnica (Gray, E. G. & Whittaker, V. P. (1962) J. Anat. (Londres) 96, 79-87). Por ejemplo, pueden obtenerse partículas de prueba adecuadas para el método de la presente invención de la siguiente manera: se decapitan dieciocho ratas, y se extraen rápidamente los cerebros. Los siguientes procedimientos se llevan a cabo a 0-4°C. Se homogeneiza el tejido (aproximadamente 25 g, peso húmedo) en 9 volúmenes de sacarosa 0,32 M enfriada con hielo en tampón Hepes-NaOH 3 mM, pH 7,4. Se centrifuga el homogenado a 1.000 x g durante 10 min. Se centrifuga el sobrenadante a 10.000 x g durante 40 min. Se suspende el sedimento en 9 volúmenes de sacarosa 0,8 M en tampón Hepes-NaOH 3 mM, pH 7,4, y se centrifuga a 80.000 x g durante 90 min. Se lava el sedimento dos veces mediante centrifugación a 10.000 x g durante 10 min con 9 volúmenes de tampón Hepes-NaOH 3 mM, pH 7,0, que contiene NaCl 0,12 M, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 2 mM y CaCl₂ 2 mM, (HBS). El sedimento lavado, designado como fracción sinaptosómica en bruto, se altera en 2 volúmenes de tampón Hepes-NaOH 10 mM, pH 7,0, que contiene EDTA 1 mM (Dojindo Laboratories) y ditiotreitól 1 mM (Sigma) y luego se mezcla con un volumen igual del mismo tampón que contiene MEGA-9 40 mM (Dojindo). Tras 30 min en hielo, se retiran los materiales insolubles mediante centrifugación a 80.000 x g durante 60 min. El sobrenadante se denomina extracto MEGA-9. Con el fin de evitar la degradación proteolítica del receptor proteico, se añade una mezcla de inhibidores de proteasa al tampón usado a lo largo de toda la solubilización y purificación. Estos inhibidores de proteasa son fluoruro de fenilmetilsulfonilo (0,1 mM, Sigma), pepstatina A (5 pg/ml, Peptide Institute, Inc.), e inhibidores de calpaína I y II (3 pg/ml, Nacalai Tesque). El diámetro de tales partículas de prueba es normalmente de entre 10 nm y 1 µm, particularmente entre 0,1 y 10 µm.

En una realización alternativa, la "partícula de prueba" está representada por una segunda cámara de prueba separada de una primera cámara de prueba por una membrana, similar al sistema descrito en Simon & Blobel (A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. Cell. 3 de mayo de 1991; 65(3):371-80). En tal entorno, la primera cámara de prueba corresponde al volumen de reacción externo, en la que se coloca dicha muestra de dicha preparación de una neurotoxina clostridial. La membrana, por ejemplo una bicapa lipídica, corresponde a la superficie de dicha partícula de prueba, y la segunda cámara de prueba corresponde a la cavidad interna de

partículas de prueba que contiene el volumen de reacción. En el método según esta realización alternativa, la muestra se pone en la primera cámara de prueba, dicha membrana porta uno o más receptores para dicha neurotoxina clostridial que puede mediar en la transferencia de dicha neurotoxina clostridial a dicha segunda cámara, y dicha segunda cámara comprende un sustrato para la actividad proteolítica de dicha neurotoxina clostridial.

El término "volumen de reacción" tal como se usa en el presente documento se refiere al volumen cubierto, y separado del volumen externo, por la membrana que rodea a la partícula de prueba. Dentro del volumen de reacción, puede tener lugar la reacción entre la neurotoxina clostridial comprendida en la muestra de la preparación de neurotoxina clostridial y las parejas de reacción para la neurotoxina clostridial, por ejemplo un sustrato, u otras reacciones que dan como resultado un efecto biológico observable y/o detectable. Normalmente, el volumen de reacción está a pH y osmolaridad fisiológicos en condiciones reductoras, por ejemplo por la presencia de glutatión, mercaptoetanol o DTT, y opcionalmente ATP.

El término "efecto biológico" tal como se usa en el presente documento se refiere un cambio o una modificación del estado de la partícula de prueba que puede determinarse o bien directamente o bien indirectamente observando uno o más parámetros asociados con tal cambio o modificación. Los ejemplos de tales cambios o modificaciones son por ejemplo acontecimientos de unión, que dan como resultado la formación de estructuras dimericas o multiméricas, reacciones enzimáticas, tales como reacciones proteolíticas, que dan como resultado una disminución de sustratos, y un aumento de productos resultantes de la reacción enzimática, tal como uno o más productos de escisión de proteólisis, o cambios en la liberación de moléculas de señalización, por ejemplo un neurotransmisor tal como acetilcolina etc., a partir de una partícula de prueba.

Según la enseñanza de la presente invención, el efecto biológico de la muestra que contiene la neurotoxina clostridial se compara con el efecto de una muestra de referencia. El término "muestra de referencia" se refiere a una preparación con una cantidad de neurotoxina conocida. En una realización, el efecto de la muestra se compara con una curva de dosis-respuesta patrón establecida midiendo el efecto de varias muestras de referencia, que contienen cada una una cantidad diferente de la neurotoxina de referencia. En determinadas realizaciones, la cantidad de la muestra de referencia (es decir la cantidad por unidad de patrón, por ejemplo mg/ml, o mg/kg de peso corporal) se representa gráficamente en el eje X y la respuesta se representa gráficamente en el eje Y. Comúnmente, es el logaritmo de la cantidad que se representa gráficamente en el eje X, y en tales casos la curva de dosis-respuesta es normalmente sigmoidea, con la parte más inclinada en el medio, indicando la mitad de la respuesta máxima. En el eje Y, la respuesta se expresa normalmente como porcentaje de la respuesta máxima observada, de modo que la cantidad que provoca la mitad de la respuesta máxima es la cantidad que provoca una tasa de respuesta del 50%, por ejemplo inhibición del 50% (CI₅₀), o eficacia del 50% (CE₅₀).

En una realización, el efecto biológico de la muestra y el efecto biológico de la muestra de referencia se determinan en la misma partícula de prueba.

En una realización, la actividad biológica se determina determinando uno o más de los siguientes parámetros: disminución dependiente del tiempo de la cantidad de sustrato de partida sin cambios, aumento dependiente del tiempo de la(s) cantidad(es) de uno o más productos de escisión que resultan de la escisión proteolítica del sustrato, disminución dependiente del tiempo de la cantidad de un compuesto, por ejemplo un neurotransmisor, liberado a partir de la partícula de prueba. El efecto biológico puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la cantidad de dicho sustrato y dicho producto de escisión puede determinarse en un inmunoensayo, por ejemplo en un ensayo ELISA que puede discriminar entre sustrato y producto. Además, la liberación de dicho compuesto, por ejemplo neurotransmisor, puede determinarse mediante métodos de HPLC o marcando dicho compuesto, por ejemplo neurotransmisor, con un fluoróforo o isótopo apropiado seguido por la medición de la radioactividad o fluorescencia en la partícula de prueba y/o el medio circundante (Jones RG, Liu Y, Sesardic D. (2009) J Immunol Methods. 343 21-7).

En el contexto de la presente invención, el término "membrana" se refiere a una capa que separa el exterior de una partícula de prueba del interior, en donde tal capa es permisible, en condiciones apropiadas, para la neurotoxina clostridial, o componentes de la misma. Una membrana de este tipo puede estar en forma de una bicapa lipídica, por ejemplo como en estructuras celulares que se producen de manera natural, o como en estructuras generadas artificialmente, tales como estructuras liposómicas. Por consiguiente y tal como se explicó anteriormente en el presente documento, la bicapa lipídica puede ensamblarse *de novo* a partir de sus componentes, por ejemplo fosfolípidos, gangliósidos y receptores, o puede obtenerse de una célula, por ejemplo una célula animal, particularmente una célula animal derivada del sistema SNC, mediante métodos de preparación conocidos en la técnica. Además, puede concebirse que se usen partículas membranosas derivadas de células en los métodos de la presente invención y se complementen por ejemplo mediante fosfolípidos o polipéptidos particulares. Además, en determinados casos puede ser necesario tratar dichas partículas antes de su uso con proteasas con el fin de retirar proteínas no deseadas.

En el contexto de la presente invención, el término "uno o más receptores para dicha neurotoxina clostridial que puede mediar en la transferencia de dicha neurotoxina clostridial a dicho volumen de reacción" se refiere a los

receptores que median en la captación celular de neurotoxina clostridial que se encuentran en tejidos neuronales susceptibles de inhibición de neurotoxina clostridial. Receptores conocidos usados por neurotoxinas en el contexto natural son o bien glicolípidos (por ejemplo Couesnon *et al.* Cell Microbiol. febrero de 2008; 10(2):375-87. 28 de septiembre de 2007) o bien proteínas transmembrana (por ejemplo, SV2 humana para neurotoxina botulínica serotipo A, o sinaptotagminas I y II para neurotoxina botulínica serotipo B), o ambos (por ejemplo Rummel *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2 de enero de 2007; 104(1):359-64 y Dong *et al.*, Science. 28 de abril de 2006; 312(5773):592-6). Sin embargo, aun cuando se prefieren receptores que se producen de manera natural, el término "receptor", tal como se usa anteriormente en el presente documento se refiere a cualquier residente en la membrana que pueda mediar en la captación al interior de la luz de la partícula de prueba. Por tanto, según la enseñanza de la presente invención, puede usarse un fosfolípido o un azúcar o un polipéptido como receptor, siempre que esté asociado con el lado externo de la bicapa lipídica y que pueda mediar en la captación de la neurotoxina al interior de la luz de la partícula. Por consiguiente, la enseñanza de la presente invención se extiende a métodos que emplean por ejemplo fragmentos de receptor con anclaje de GPI, es decir moléculas con anclaje de GPI que comprenden el sitio de unión a neurotoxina de un receptor que se produce de manera natural tal como SV2. En casos particulares, por ejemplo si la partícula de prueba de la presente invención se ensambla *de novo*, puede ser ventajoso reemplazar moléculas de receptor que tienen múltiples dominios que abarcan la membrana por análogos de las mismas con anclaje de GPI.

En el contexto de la presente invención, el término "mediar en la transferencia a dicho volumen de reacción" se refiere al cruce de la cadena ligera de la neurotoxina clostridial al interior de la luz de dicha partícula de prueba.

Los inventores observan que el método de la presente invención es muy sensible si la densidad de receptor sobre las partículas de prueba ensambladas *de novo* es particularmente alta. Sorprendentemente, este efecto se observa también con partículas de prueba derivadas de células complementadas con moléculas de receptor adicionales. Por consiguiente, los inventores prevén optimizar las partículas de prueba añadiendo moléculas de receptor hasta el punto de sensibilidad óptima.

En el contexto de la presente invención, el término "sustrato para la actividad proteolítica de dicha neurotoxina clostridial" se refiere a cualquier diana intracelular para tal neurotoxina clostridial (por ejemplo, SNAP25 humana para neurotoxina botulínica serotipo A, C y E, o sinaptobrevina para neurotoxina botulínica serotipo B y F, y toxina del tétanos). Tales dianas son proteínas, que están implicadas en la formación de un complejo SNARE funcional. En una realización, tal sustrato se inactiva mediante interacción con la neurotoxina, en otra realización, tal sustrato se inactiva mediante escisión proteolítica.

El sustrato del método de la presente invención puede ser un sustrato que se produce de manera natural tal como el polipéptido de SNAP-25 de longitud completa o un derivado del mismo. El término "derivado" se refiere por ejemplo a sustratos polipeptídicos modificados con truncamientos o adiciones N-terminales, C-terminales y/o internos, y a polipéptidos modificados que comprenden una o más adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácido. Dicho sustrato polipeptídico puede ser de origen humano o puede tener una identidad de secuencia de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% con la secuencia de polipéptido humano.

En un determinado aspecto de la presente invención, dicho sustrato se marca con uno o más marcadores. El marcador puede ser por ejemplo un marcador fluorescente o una mezcla de diferentes marcadores fluorescentes o cualquier otra etiqueta detectable, incluyendo por ejemplo marcadores radiactivos, marcadores de ADN/ARN, marcadores peptídicos o proteicos (GST, MBP, NusA, ubiquitina, etc.), marcadores enzimáticos (AP, HRP, luciferasa, etc.) o marcadores físicos tales como isótopos no radiactivos.

En una realización del método según el primer aspecto de la invención, dicho método comprende además tras la etapa (a) la etapa de:

(aa) ajustar el medio que rodea a la partícula de prueba disminuyendo el valor de pH.

El término "disminuyendo el valor de pH" tal como se usa en el presente documento significa reducir el pH desde pH 7,4 hasta un valor de pH por debajo de 6,5, particularmente por debajo de pH 6, más particularmente por debajo de pH 5 y más particularmente entre 4 y 5, y lo particularmente a aproximadamente 4,5. Condiciones que simulan el pH y gradiente redox a través de los endosomas, por ejemplo pH 5,3 en el compartimento cis que contiene BoNT y pH 7,0 en el compartimento trans complementado por ejemplo con el reductor no permeable por la membrana Tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) soportan la actividad del canal. Sin estos pH y gradientes redox a través de la membrana, no se registra actividad del canal (Fischer A, Montal M., Proc Natl Acad Sci USA. 19 de junio de 2007; 104(25):10447-52). En una realización particular, tal ajuste se realiza con el fin de permitir dicha transferencia, es decir la translocación de la cadena ligera de la neurotoxina clostridial a través de la membrana al interior de la luz, es decir el volumen de reacción de la partícula de prueba.

En una realización adicional del método según el primer aspecto de la invención, dicho método comprende además tras la etapa (a) la etapa de:

(ab) ajustar el volumen de reacción en la partícula de prueba disminuyendo el valor de pH; y/o

(ac) ajustar el volumen de reacción en la partícula de prueba aumentando el potencial reductor.

5 En una realización particular, tal/es ajuste(s) se realiza(n) con el fin de permitir dicha actividad proteolítica, es decir la escisión del sustrato por la cadena ligera de la neurotoxina clostridial en la luz, es decir el volumen de reacción de la partícula de prueba.

10 En una realización adicional del método según el primer aspecto de la invención, la etapa (b) comprende la etapa de:

(ba) determinar la unión de las neurotoxinas clostridiales al uno o más receptores.

15 En realizaciones particulares, la unión se determina usando moléculas de unión, tales como anticuerpos, dirigidos contra la neurotoxina clostridial (es decir determinación directa de la cantidad de neurotoxina clostridial unida), o usando moléculas de unión, tales como anticuerpos, dirigidos contra un receptor para la neurotoxina clostridial (es decir determinación indirecta de la cantidad de neurotoxina clostridial unida determinando la cantidad de receptores libres, es decir no unidos). En realizaciones particulares, en primer lugar se aíslan los complejos de partícula de prueba/neurotoxina clostridial, por ejemplo mediante centrifugación, y luego se lavan con el fin de retirar neurotoxina clostridial no unida. Posteriormente, se determina la cantidad de neurotoxina, que se une a partículas de prueba lavadas, por ejemplo en un inmunoensayo (por ejemplo ELISA, inmunotransferencia de tipo Western).

20 En una realización adicional del método según el primer aspecto de la invención, la etapa (b) comprende la etapa de:

(bb) determinar la proteólisis de dicho sustrato.

25 En realizaciones particulares, la proteólisis se determina mediante métodos de ELISA o SNAPtide®. Pueden emplearse métodos de ELISA que usan anticuerpos dirigidos contra o bien el sustrato no escindido o bien uno o más de los productos de escisión (véase, por ejemplo, Ekong *et al.*, Microbiology 1997; 143: 3337-47). El término "métodos SNAPtide®" tal como se usa en el presente documento se refiere a un formato de ensayo que se basa en la medición fluorométrica de la actividad de toxina botulínica proporcionando sustratos basados en SNAP25 marcados fluorescentemente que contienen el sitio de escisión nativo para neurotoxina botulínica de serotipo A (SNAPtide®), o de serotipo E (SNAP Etide®). Los ensayos SNAPtide® y SNAP Etide® están disponibles por ejemplo de List Biological Laboratories, Inc.

30 En determinadas realizaciones de los métodos de la presente invención, la partícula de prueba es una partícula de prueba que puede obtenerse de una célula, en particular una partícula de prueba no celular, tal como fragmentos de membrana subcelulares o fantasmas de eritrocitos que contienen natural o artificialmente receptores apropiados para el analito.

35 En tales realizaciones particulares, la partícula de prueba no celular es un sinaptosoma. En determinadas de tales realizaciones, el sinaptosoma se deriva de un cerebro de mamífero, por ejemplo un cerebro de rata o ratón, o un cerebro de un animal transgénico que expresa una o más proteínas SNARE humanas.

40 En otra realización, dicha partícula de prueba no celular es una partícula de prueba generada artificialmente. La partícula generada artificialmente puede ser por ejemplo un liposoma. Tal partícula puede ensamblarse esencialmente tal como se describe en: Liposome Drug Delivery Systems, G. V. Betageri, S. A. Jenkins, D. L. Parsons (1993). En resumen, la partícula de prueba comprende:

45 a) una membrana por ejemplo, una bicapa de fosfolípidos esférica, que encierra un volumen de reacción interno;

b) un volumen de reacción interno que contiene:

50 - un sistema de tampón adecuado, por ejemplo HEPES 50 mM / ZnCl₂ 20 μM pH 7,0

- un agente reductor, por ejemplo ditiotreitól 5 mM

55 - un sustrato de proteólisis para la neurotoxina clostridial;

60 c) estructuras de direccionamiento a los sitios de unión del receptor por ejemplo, los receptores de neurotoxina clostridial tipo A, es decir la proteína de vesícula sináptica 2 (SV2) y el gangliósido GT1 b. En una realización, estos receptores están integrados en la membrana de la partícula de prueba exponiendo sus estructuras de direccionamiento a la superficie externa de la partícula de prueba.

En determinadas realizaciones de la presente invención, la neurotoxina clostridial a la que se hace referencia en el presente documento es una neurotoxina de *C. botulinum* y es de serotipo A, B, C1, D, E, F o G o es un derivado biológicamente activo de la misma, en la que dicho derivado puede ser una neurotoxina modificada genéticamente tal como un mutante que comprende una delección de uno o más aminoácidos, una adición de uno o más aminoácidos y/o una sustitución de uno o más aminoácidos. Preferiblemente, dichos aminoácidos delecionados o añadidos son aminoácidos consecutivos. Según la enseñanza de la presente invención, puede añadirse o deleccionarse cualquier número de aminoácidos, siempre que la neurotoxina sea biológicamente activa. Por ejemplo, pueden añadirse o deleccionarse 1, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 15, hasta 25, hasta 50, hasta 100, hasta 200, hasta 400, hasta 500 aminoácidos o incluso más aminoácidos. En determinados aspectos, la presente invención se refiere a neurotoxinas, con una adición de más de 500 aminoácidos, tal como por ejemplo hasta 600 o hasta 800 aminoácidos adicionales, o incluso más aminoácidos adicionales. Por consiguiente, un derivado de la neurotoxina puede ser un fragmento biológicamente activo de una neurotoxina que se produce de manera natural. Este fragmento de neurotoxina puede contener una delección N-terminal, C-terminal y/o una o más delecciones internas. "Biológicamente activo", tal como se usa en este contexto, significa que dicho derivado se capta en la célula nerviosa y que puede denervar dicho nervio del músculo o la glándula, al que está conectado. Además, dichas neurotoxinas clostridiales pueden estar asociadas con proteínas complejantes o pueden estar libres de proteínas complejantes (véase a continuación).

En realizaciones particulares, la neurotoxina clostridial es de serotipo A o E, y/o es un derivado biológicamente activo de la misma.

En el contexto de la presente invención, el término "neurotoxina botulínica" se refiere a neurotoxinas que pueden obtenerse de *Clostridium botulinum*. Actualmente, se conocen siete tipos serológicamente distintos, designados serotipos A, B, C1, D, E, F y G, incluyendo determinados subtipos (por ejemplo A1, A2 y A3). En *Clostridium botulinum*, estas neurotoxinas se forman como complejos proteicos que comprenden un componente neurotóxico y al menos otra proteína no tóxica. Por tanto, el término "neurotoxina botulínica serotipo A", tal como se usa en el presente documento, se refiere a el complejo de neurotoxina botulínica, tal como los complejos de 450 kDa y 900 kDa que pueden obtenerse por ejemplo de cultivos de *Clostridium botulinum*. Preparaciones que comprenden tales complejos están disponibles comercialmente, por ejemplo de Ipsen Ltd. (Dysport®) o Allergan Inc. (Botox®).

Además, el término neurotoxina botulínica también se refiere a neurotoxina botulínica que está libre de proteínas complejantes y que tiene un peso molecular de aproximadamente 150kDa. Por tanto, en realizaciones particulares, la neurotoxina clostridial es un componente neurotóxico aislado de neurotoxina botulínica, particularmente de neurotoxina botulínica de serotipo A o E. En el contexto de la presente invención, el término "componente neurotóxico aislado de neurotoxina botulínica serotipo ..." se refiere al componente neurotóxico del complejo de serotipo de neurotoxina botulínica correspondiente libre de proteínas complejantes. Este componente neurotóxico es un polipéptido bicatenario con una cadena pesada de 100 kDa unida mediante un enlace disulfuro a una cadena ligera de 50 kDa. La cadena pesada es responsable de la entrada en la célula neuronal, mientras que la cadena ligera comprende una actividad endopeptidasa responsable de la escisión de una o más proteínas que es/son parte del denominado complejo SNARE implicado en el proceso que da como resultado la liberación de neurotransmisor a la hendidura sináptica. Un componente neurotóxico de alta pureza de la neurotoxina de *C. botulinum* de serotipo A, libre de cualquier otra proteína botulínica, está disponible por ejemplo de Merz Pharmaceuticals GmbH, Fráncfort (Xeomin®).

El término "otro fragmento aislado de dicha cualquier neurotoxina botulínica ..., en donde tal fragmento tiene actividad neurotóxica" se refiere a un complejo de neurotoxina que carece de determinadas de las proteínas no tóxicas de una neurotoxina botulínica tal como se definió anteriormente, o determinadas partes del componente neurotóxico tal como se definió anteriormente comprendido en la misma, al tiempo que mantiene la actividad neurotóxica. De manera correspondiente, el término "otro fragmento aislado de dicho cualquier ... componente neurotóxico, en donde tal fragmento tiene actividad neurotóxica" se refiere a un componente de neurotoxina que carece de determinadas partes del componente neurotóxico de una neurotoxina botulínica tal como se definió anteriormente, al tiempo que mantiene la actividad neurotóxica. Un experto habitual en la técnica conoce bien métodos para preparar o identificar tales fragmentos, y métodos para identificar si tales fragmentos mantienen la actividad neurotóxica.

En el contexto de la presente invención, el término "derivado" y el término "variante o análogo sintético" se refieren a un complejo de neurotoxina o componente neurotóxico que es un derivado química, enzimática o genéticamente modificado de una neurotoxina tal como se define en el presente documento, incluyendo una neurotoxina química o genéticamente modificada de *C. botulinum*. Un derivado químicamente modificado puede ser uno que se modifica mediante piruvación, fosforilación, sulfatación, lipidación, pegilación, glicosilación y/o la adición química de un aminoácido o un polipéptido que comprende entre 2 y aproximadamente 100 aminoácidos. Un derivado enzimáticamente modificado es uno que se modifica mediante la actividad de enzimas, tales como enzimas endo- o exoproteolíticas. Tal como se indicó anteriormente, un derivado genéticamente modificado es uno que se ha modificado mediante delección o sustitución de uno o más aminoácidos contenidos en, o mediante adición de uno o más aminoácidos (incluyendo polipéptidos que comprenden entre 2 y aproximadamente 100 aminoácidos) a, las proteínas de dicha neurotoxina o un componente neurotóxico de la misma. Un experto habitual en la técnica conoce

bien métodos para preparar tales derivados química o genéticamente modificados, y métodos para identificar si tales derivados mantienen la actividad neurotóxica.

5 En una realización particular, dicha neurotoxina clostridial se selecciona del grupo de neurotoxina botulínica serotipo A o E, el componente neurotóxico aislado de neurotoxina botulínica serotipo A o E, un fragmento aislado de neurotoxina botulínica serotipo A o E, o del componente neurotóxico de neurotoxina botulínica serotipo A o E, en donde tal fragmento tiene actividad neurotóxica, y cualquier variante o análogo sintético de neurotoxina botulínica serotipo A, o E, respectivamente, o del componente neurotóxico de la misma, en donde tal variante o análogo tiene actividad neurotóxica. El término "fragmento" se refiere a una neurotoxina que carece de 1, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 15, hasta 25, hasta 50, hasta 100, hasta 200, hasta 400, hasta 500 aminoácidos o incluso más aminoácidos. Preferiblemente, dichos aminoácidos son aminoácidos consecutivos.

15 Particularmente, dicha neurotoxina clostridial es la neurotoxina de *C. botulinum* de serotipo A, o es el componente neurotóxico aislado de neurotoxina botulínica de serotipo A, que está disponible de Merz Pharmaceuticals GmbH, Fráncfort (Xeomin®).

En determinadas realizaciones del primer aspecto de la presente invención, dicha preparación de neurotoxina clostridial es para uso farmacéutico y/o estético.

20 En determinadas realizaciones de la presente invención, la neurotoxina clostridial en la preparación de neurotoxina clostridial se produce en un proceso de fermentación.

25 En realizaciones particulares la preparación de neurotoxina clostridial se produce mediante un proceso de fermentación usando cepas de *Clostridium botulinum*. Se conocen bien en la técnica métodos para el proceso de fermentación usando cepas de *Clostridium botulinum* (véase, por ejemplo, Siegel y Metzger, Appl. Environ. Microbiol. 38 (1979) 606-611; Siegel y Metzger, Appl. Environ. Microbiol. 40 (1980) 1023-1026).

30 En realizaciones particulares, la preparación de neurotoxina clostridial se produce en células heterólogas, es decir se produce de manera recombinante expresando secuencias de ácido nucleico que codifican para una neurotoxina en células huésped apropiadas. Se conocen bien en la técnica métodos para la expresión recombinante de neurotoxina clostridial (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/076902 o EP 1 206 554). Un ejemplo de una célula heteróloga es *E. coli*.

35 En determinadas realizaciones de la presente invención, la neurotoxina clostridial en dicha preparación de neurotoxina clostridial y la neurotoxina clostridial de referencia pertenecen al mismo serotipo.

En realizaciones particulares, la neurotoxina clostridial en dicha preparación de neurotoxina clostridial y la neurotoxina clostridial de referencia son idénticas.

40 En este contexto, los términos "pertenecen al mismo serotipo" e "idénticas" se refieren a la naturaleza del agente neurotóxico activo presente en la preparación de neurotoxina clostridial y la neurotoxina clostridial de referencia. Por ejemplo, cuando la preparación de neurotoxina clostridial contiene el componente neurotóxico aislado (es decir sin ninguna proteína complejante) de neurotoxina botulínica serotipo A, y la neurotoxina clostridial de referencia es neurotoxina botulínica serotipo A (es decir el complejo completo), la neurotoxina clostridial en dicha preparación de neurotoxina clostridial y la neurotoxina clostridial de referencia pertenecen al mismo serotipo, pero no son idénticas. Cuando la preparación de neurotoxina clostridial contiene el componente neurotóxico aislado (es decir sin ninguna proteína complejante) de neurotoxina botulínica serotipo A, y la neurotoxina clostridial de referencia es el componente neurotóxico aislado de neurotoxina botulínica serotipo A también, la neurotoxina clostridial en dicha preparación de neurotoxina clostridial y la neurotoxina clostridial de referencia son idénticas (aún cuando la preparación de neurotoxina clostridial y la preparación que contiene la neurotoxina clostridial de referencia pueden diferir en la cantidad y concentración de la respectiva neurotoxina y/o la presencia de componentes adicionales tales como tampones, excipientes etc.).

55 En realizaciones particulares, la neurotoxina clostridial es de serotipo A, y el uno o más receptores se toman de la lista de: SV2, un receptor de gangliósido, y un derivado biológicamente activo de SV2 o un receptor de gangliósido.

En tales realizaciones particulares, el receptor de gangliósido se toma de la lista de GT1b (véase Rummel *et al.*, Molecular Microbiology 2004; 51: 631-43) y GD1b.

60 En realizaciones particulares, el sustrato es SNAP-25 o un derivado biológicamente activo de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1: Determinación de efectos biológicos en sinaptosomas de cerebro de rata

65 Se obtiene una preparación de sinaptosomas de cerebro de rata tal como se describe en la bibliografía a partir de un

5 gradiente de Percoll tras la homogeneización de cerebro de rata (véase Rummel *et al.*, Molecular Microbiology 2004; 51: 631-43). Los sinaptosomas se diluyen en tampón fisiológico (por ejemplo NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, Hepes 20 mM, glucosa 10 mM, BSA al 0,5%, pH 7,4). Se determina la cantidad de sinaptosomas que está presente determinando la cantidad total de proteínas sinaptosomales. Para todos los experimentos, se usa una concentración fija de proteínas sinaptosomales totales, por ejemplo 10 mg/ml.

10 Se añade una cantidad fija de diferentes diluciones a partir de una serie de dilución de una neurotoxina botulínica serotipo A de referencia con actividad biológica conocida (expresada como unidades de ratón) a la preparación de sinaptosomas. Tras la incubación durante aproximadamente 2 h a aproximadamente 0°C, se lavan repetidamente los sinaptosomas usando tampón fisiológico y centrifugación, con el fin de retirar neurotoxina no unida. Después de eso, se lleva el pH de la disolución hasta pH 4,5 añadiendo, por ejemplo, HCl 1 M. Se continúa la incubación durante aproximadamente 30 min. Se lisan los sinaptosomas usando, por ejemplo, Triton X-100 (véase Sahyoun *et al.*, J. Biol. Chem. 1989; 264: 1062-1067), y se determinan las cantidades de SNAP25 y/o sus productos de escisión en un ensayo ELISA tal como se describió (Ekong *et al.*, Microbiology 1997; 143: 3337-47). Durante el tratamiento final de los sinaptosomas, pueden añadirse inhibidores de neurotoxina botulínica, tal como se describe, por ejemplo, por Boldt *et al.*, Chem. Commun., 2006, 3063-3065, para terminar la actividad proteolítica de la neurotoxina.

20 Se repite el mismo experimento con una serie de dilución de la neurotoxina de clostridios de una manera por lo demás idéntica. La cantidad de preparación de neurotoxina de clostridios necesaria para lograr la CE₅₀ (es decir la mitad de la escisión máxima del sustrato SNAP25) puede correlacionarse entonces con la cantidad correspondiente de neurotoxina botulínica serotipo A de referencia con actividad biológica conocida.

Ejemplo 2: Determinación de efectos biológicos en vesículas artificiales

25 Se forman liposomas a partir de fosfolípidos, tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, o mezclas de las mismas, tal como se describe en la bibliografía, en presencia de SV2, GT1b y/o GD1b recombinante, y SNAPtide® (o-Abz/Dnp) o SNAPtide® (FITC/DABCIL) (List Biological Laboratories, Inc., n.ºs de producto 520 y 521, respectivamente) o-Abz/Dnp). Los liposomas resultantes se lavan repetidamente con el fin de retirar el exceso de reactivos no incorporados en los liposomas. La cantidad de SV2 integrada en las membranas puede determinarse usando anticuerpos dirigidos contra SV2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

35 Se añade una cantidad fija de diferentes diluciones a partir de una serie de dilución de una neurotoxina botulínica serotipo A de referencia con actividad biológica conocida (expresada como unidades de ratón) a la preparación de liposomas. Tras la incubación durante aproximadamente 2 h a aproximadamente 0°C, se lavan repetidamente los liposomas usando tampón fisiológico y centrifugación, con el fin de retirar la neurotoxina no unida. Después de eso, se lleva el pH de la disolución hasta pH 4,5 añadiendo, por ejemplo, HCl 1 M. Se continúa la incubación durante aproximadamente 30 min, y se determina el aumento de intensidad de fluorescencia (véase el manual de instrucciones para el ensayo SNAPtide®), que es directamente proporcional a la cantidad de escisión que está produciéndose. Alternativamente, la reacción de escisión puede observarse directamente dentro de la partícula de prueba usando espectroscopía de correlación de fluorescencia (véase, por ejemplo, Brock y Jovin (1998). Fluorescence correlation microscopy (FCM) - fluorescence correlation spectroscopy (FCS) taken into the cell. Cell. Mol. Biol. 44, 847-856).

45 Se repite el mismo experimento con una serie de dilución de la preparación de neurotoxina de clostridios de una manera por lo demás idéntica. La cantidad de preparación de neurotoxina de clostridios necesaria para lograr la CE₅₀ (es decir la mitad de la escisión máxima del sustrato SNAPtide®) puede correlacionarse entonces con la cantidad correspondiente de neurotoxina botulínica serotipo A de referencia con actividad biológica conocida.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para determinar la actividad biológica de una preparación de una neurotoxina clostridial, que comprende las etapas de:
- 5 (a) poner en contacto al menos una partícula de prueba con una muestra de dicha preparación; y
- (b) comparar el efecto biológico de dicha muestra con el efecto biológico de una muestra de referencia;
- 10 en el que dicha al menos una partícula de prueba comprende al menos una membrana que encierra un volumen de reacción, en el que dicha membrana porta uno o más receptores para dicha neurotoxina clostridial que puede mediar en la transferencia de dicha neurotoxina clostridial a dicho volumen de reacción, y en el que dicho volumen de reacción comprende un sustrato para la actividad proteolítica de dicha neurotoxina clostridial;
- 15 en el que la actividad biológica se determina determinando uno o más de los siguientes parámetros:
- (i) disminución dependiente del tiempo de la cantidad de sustrato de partida sin cambios;
- (ii) aumento dependiente del tiempo de la(s) cantidad(es) de uno o más productos de escisión que resultan de la
- 20 escisión proteolítica de dicho sustrato; y
- (iii) disminución dependiente del tiempo de la cantidad de un compuesto liberado a partir de la partícula de prueba.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además tras la etapa (a) la etapa de:
- 25 (aa) ajustar el medio que rodea a dicha partícula de prueba disminuyendo el valor de pH.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además tras la etapa (a) la etapa de:
- 30 (ab) ajustar dicho volumen de reacción en dicha partícula de prueba disminuyendo el valor de pH; y/o
- (ac) ajustar el volumen de reacción en la partícula de prueba aumentando el potencial reductor.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que etapa (b) comprende la etapa de:
- 35 (ba) determinar la unión de dicha neurotoxina clostridial a dicho uno o más receptores.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa (b) comprende la etapa de:
- 40 (bb) determinar la proteólisis de dicho sustrato.
6. Método según la reivindicación 5, en el que dicha proteólisis se determina mediante métodos de ELISA o SNAPtide®.
- 45 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha partícula de prueba es una partícula de prueba no celular.
8. Método según la reivindicación 7, en el que dicha partícula de prueba no celular es un sinaptosoma.
- 50 9. Método según la reivindicación 7, en el que dicha partícula de prueba no celular es una partícula generada artificialmente.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 9, en el que dicha neurotoxina clostridial es una neurotoxina de *C. botulinum* y es de serotipo A, B, C1, D, E, F o G o es un derivado biológicamente activo de la
- 55 misma.
11. Método según la reivindicación 10, en el que dicha neurotoxina clostridial es de serotipo A o E, o es un derivado biológicamente activo de la misma.
- 60 12. Método según la reivindicación 11, en el que dicha neurotoxina clostridial es de serotipo A, y en el que dicho uno o más receptores se toman de la lista de: SV2, un receptor de gangliósido, y un derivado biológicamente activo de SV2 o un receptor de gangliósido.
13. Método según la reivindicación 12, en el que dicho receptor de gangliósido se toma de la lista de GT1 b y GD1 b.
- 65 14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 13, en el que dicho sustrato es SNAP-25 o una

variante biológicamente activa del mismo.

15. Kit para un método *in vitro* para determinar la actividad biológica de una preparación de una neurotoxina clostridial, que comprende:

5 (a) al menos una partícula de prueba, en el que dicha al menos una partícula de prueba comprende al menos una membrana que encierra un volumen de reacción, en el que dicha membrana porta uno o más receptores para dicha neurotoxina clostridial que puede mediar en la transferencia de dicha neurotoxina clostridial a dicho volumen de reacción, y en el que dicho volumen de reacción comprende un sustrato para la actividad proteolítica de dicha
10 neurotoxina clostridial; y

(b) uno o más reactivos para determinar la unión de dichas neurotoxina clostridial a dicho uno o más receptores; y/o

(c) uno o más reactivos para determinar la proteólisis de dicho sustrato.