



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3031825 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/12 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.12.16
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.07.24
(86)	European Application Nr.	16153819.4
(86)	European Filing Date	2009.03.13
(87)	The European Application's Publication Date	2016.06.15
(30)	Priority	2008.03.14, US, 36723 P
(84)	Designated Contracting States:	AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; SE ; SI ; SK ; TR
(73)	Proprietor	ALLERGAN, INC., 2525 Dupont Drive, Irvine, CA 92612, USA
(72)	Inventor	Fernandez-Salas, Ester, 1710 Rocky Road, Fullerton, CA 92831, USA Wang, Joanne, 37 Bristlecone, Irvine, CA 92620, USA Garay, Patton E., 5503 E. Pageantry Street, Long Beach, CA 90808, USA Wong, Lina S., 60 Domani, Irvine, CA 92618, USA Hodges, D. Diane, 14351 Pinewood Road, Tustin, CA 92780, USA Aoki, Kei Roger, 2 Ginger Lilly Court, Coto de Caza, CA 92679, USA
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54)	Title	IMMUNO-BASED BOTULINUM TOXIN SEROTYPE A ACTIVITY ASSAYS
(56)	References Cited:	WO-A-2006/042149 WO-A1-95/33850 US-A1- 2008 064 054 JONES ET AL: "Development of improved SNAP25 endopeptidase immuno-assays for botulinum type A and E toxins", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 329, no. 1-2, 23 October 2007 (2007-10- 23), pages 92-101, XP022389333, ISSN: 0022-1759 WILLIAMSON L C ET AL: "Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons: botulinum neurotoxin C acts on synaptosomal-associated protein of 25 kDa.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 29 MAR 1996, vol. 271, no. 13, 29 March 1996 (1996-03-29),

pages 7694-7699, XP002531830, ISSN: 0021-9258

BOYD ROBERT S ET AL: "The effect of botulinum neurotoxins on the release of insulin from the insulinoma cell lines HIT-15 and RINm5F", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 270, no. 31, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 18216-18218, XP001010301, ISSN: 0021-9258

RASOOLY REUVEN ET AL: "Development of an in vitro activity assay as an alternative to the mouse bioassay for Clostridium botulinum neurotoxin type A.", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY JUL 2008, vol. 74, no. 14, July 2008 (2008-07), pages 4309-4313, XP002531831, ISSN: 1098-5336

NABOKINA S ET AL: "Intracellular location of SNAP-25 in human neutrophils.", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 20 OCT 1997, vol. 239, no. 2, 20 October 1997 (1997-10-20), pages 592-597, XP002531826, ISSN: 0006-291X

SCHULTE-BAUKLOH HEINRICH ET AL: "Persistence of the synaptosomal-associated protein-25 cleavage product after intradetrusor botulinum toxin A injections in patients with myelomeningocele showing an inadequate response to treatment.", BJU INTERNATIONAL NOV 2007, vol. 100, no. 5, November 2007 (2007-11), pages 1075-1080, XP002531827, ISSN: 1464-4096

SHIMAZAKI Y ET AL: "Phosphorylation of 25-kDa synaptosome-associated protein. Possible involvement in protein kinase C-mediated regulation of neurotransmitter release.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 14 JUN 1996, vol. 271, no. 24, 14 June 1996 (1996-06-14), pages 14548-14553, XP002531829, ISSN: 0021-9258

FORAN P ET AL: "Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release.", BIOCHEMISTRY 27 FEB 1996, vol. 35, no. 8, 27 February 1996 (1996-02-27), pages 2630-2636, XP002531828, ISSN: 0006-2960

MARCONI S ET AL: "A protein chip membrane-capture assay for botulinum neurotoxin activity", TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY, ACADEMIC PRESS, vol. 233, no. 3, 15 December 2008 (2008-12-15), pages 439-446, XP025678926, ISSN: 0041-008X [retrieved on 2008-09-19]

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for å påvise BoNT/A-aktivitet hos et pattedyr omfattende trinnene med:
 - 5 a. behandling av en celle fra en etablert cellelinje som uttrykker SNAP-25 med en testprøve omfattende et BoNT/A, hvor cellen fra en etablert cellelinje er mottakelig for BoNT/A intoksikasjon, hvor cellen fra en etablert cellelinje er mottakelig for BoNT/A intoksikasjon med omtrent 500 pM eller mindre av et BoNT/A, og hvor nevnte celle er valgt fra gruppen bestående av en SiMa-cellelinje, og en Neuro-2a-cellelinje;
 - 10 b. isolering fra de behandlede cellene av et SNAP-25-spaltingsprodukt som har en karboksylterminal ved P₁ resten til BoNT/A spaltingssete spaltingsbindingen;
 - c. bringe SNAP-25-spaltingsproduktet i kontakt med et monoklonalt anti-SNAP-25-antistoff koblet til en fast-fase bærer, hvor anti-SNAP-25-antistoffet binder en epitop omfattende en karboksylterminal ved P₁ resten til BoNT/A-spaltingssete
15 spaltingsbindingen fra SNAP-25-spaltingsproduktet, hvor anti-SNAP-25-antistoffet har en assosiasjonshastighetskonstant for en epitop som ikke omfatter et karboksylterminalt glutamin til BoNT/A-spaltingssete spaltingsbindingen fra et SNAP-25 spaltingsprodukt på mindre enn $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; og anti-SNAP-25 antistoffet har en likevekts-disassosiasjonskonstant for epitopen på mindre enn 0,450 nM;
 - 20 d. detektering av nærværet av et antistoff-antigen-kompleks omfattende anti-SNAP-25-antistoffet og SNAP-25-spaltingsproduktet omfattende en karboksylterminal ved P₁ resten til BoNT/A-spaltingssete spaltingsbindingen fra SNAP-25-spaltingsproduktet;
hvor deteksjon av antistoff-antigen-komplekset i trinn d er en indikasjon på BoNT/A-aktivitet.
25
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor testprøven er en blod-, plasma-, serum- eller lymfevæskeprøve fra pattedyret.
- 30 3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, hvor testprøven er en blod- eller serumprøve fra pattedyret.
4. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor SNAP-25-spaltingsproduktet har et karboksylterminalt glutamin med SEKV ID NR: 38.
- 35 5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor anti-SNAP-25 antistoffet binder en epitop omfattende et karboksylterminalt glutamin med

SEKV ID NR: 38.

6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor den negative kontrollprøven ikke omfatter noe BoNT/A.

5

7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor deteksjonen av tilstedeværelsen av et antistoff-antigen-kompleks er gjennom anvendelse av en sandwich-immunanalyse.

10

8. Fremgangsmåte ifølge krav 7, hvor sandwich immunanalysen anvender et elektrokjemiluminescense eller kjemiluminescense deteksjonsmetodetrinn.

15

9. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor
(i) anti-SNAP-25-antistoffet omfatter en tungkjede variabel region omfattende hypervariable områder (CDR) omfattende aminosyresekvensene med minst én av SEKV ID NO: 95, 99 og 101 og en lettkjede variabel region omfattende CDRer som omfatter aminosyresekvensene med minst én av SEKV ID NR: 103, 108 og 113, eller
(ii) anti-SNAP-25-antistoffet omfatter en tungkjede variabel region som omfatter CDRer omfattende aminosyresekvensene med minst én av SEKV ID NR: 93, 96 og 100
og en lettkjede variabel region omfattende CDRer som omfatter aminosyresekvensene med minst én av SEKV ID NR: 105, 110 og 115.

20