



* B R P I 1 0 1 5 3 1 1 B 1 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1015311-0 B1

(22) Data do Depósito: 23/04/2010

(45) Data de Concessão: 09/01/2024

(54) Título: MÉTODO PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE POLIPEPTÍDEO DE NEUROTOXINA PROCESSADA EM UMA SOLUÇÃO, DISPOSITIVO PARA DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE POLIPEPTÍDEO DE NEUROTOXINA PROCESSADA CONTIDA EM UMA SOLUÇÃO E KIT ADAPTADO

(51) Int.Cl.: G01N 33/569.

(30) Prioridade Unionista: 27/04/2009 US 61/214,650; 27/04/2009 EP 09158788.1.

(73) Titular(es): MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA.

(72) Inventor(es): MICHAEL PFEIL; JOSEF FRIEDRICH.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010055432 de 23/04/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/124998 de 04/11/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/10/2011

(57) Resumo: MÉTODO, DISPOSITIVO E KIT PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE POLIPEPTÍDEO DE NEUROTOXINA PROCESSADA E PROCESSADA ATIVA EM UMA SOLUÇÃO CONTENDO POLIPEPTÍDEO DE NEUROTOXINA PROCESSADA E PARCIALMENTE PROCESSADA E/OU NÃO PROCESSADA A presente invenção pertence ao campo das ferramentas para garantir a produção de polipeptídeos e seu controle de qualidade. Especificamente, ela se refere a um método para determinar a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina processada (ativa) em uma solução contendo polipeptídeo de neurotoxina processada e parcialmente processada ou não processada. A presente invenção refere-se ainda a um dispositivo para determinação da referida quantidade e a um kit adaptado para se aplicar o método da presente invenção.

“MÉTODO PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE POLIPEPTÍDEO DE NEUROTOXINA PROCESSADA EM UMA SOLUÇÃO, DISPOSITIVO PARA DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE POLIPEPTÍDEO DE NEUROTOXINA PROCESSADA CONTIDA EM UMA SOLUÇÃO E KIT ADAPTADO”

[0001] A presente invenção pertence ao campo das ferramentas para garantir a produção de polipeptídeos e seu controle de qualidade. Especificamente, ela se refere a um método para determinar a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina processada (ativa) em uma solução contendo polipeptídeo de neurotoxina processada e parcialmente processada ou não processada. A presente invenção refere-se ainda a um dispositivo para determinação da referida quantidade e a um kit adaptado para se aplicar o método da presente invenção.

[0002] *Clostridium botulinum* e *Clostridium tetani* produzem neurotoxinas de alta potência, quais sejam, toxinas botulínicas (BoNTs) e toxinas tetânicas (TeNT), respectivamente. Essas neurotoxinas de *Clostridium* (CNTs) ligam-se especificamente a células neuronais e interrompem a liberação de neurotransmissores. Cada toxina é sintetizada como uma proteína inativa, não processada, de cadeia simples de aproximadamente 150 kDa. O processamento pós-traducional envolve a formação de pontes dissulfeto e proteólise (quebra) limitada por meio de protease(s) bacteriana(s). A neurotoxina ativa consiste de duas cadeias, uma leve N-terminal, com aproximadamente 50 kDa, e uma pesada, com cerca de 100 kDa, unidas por uma ligação dissulfeto. Dos pontos de vista estrutural e funcional, as CNTs consistem de três domínios, quais sejam, a cadeia catalítica leve, a cadeia pesada - que compreende o domínio de translocação (metade N-terminal) - e o domínio de ligação ao receptor (metade C-

terminal) (cf. Krieglstein 1990, Eur J. Biochem. 188, 39; Krieglstein 1991, Eur J. Biochem. 202, 41; Krieglstein 1994, J. Protein 13, 49). As neurotoxinas botulínicas são sintetizadas como complexos moleculares contendo a proteína neurotóxica de 150 kDa e proteínas não tóxicas associadas. O tamanho do complexo difere conforme a cepa de *Clostridium* e os diferentes sorotipos de neurotoxina, variando de 300 kDa até 500 kDa, chegando até 900 kDa. As proteínas não tóxicas nesses complexos estabilizam a neurotoxina e a protegem contra degradação (cf. Silberstein 2004, Pain Practice 4, S19-S26).

[0003] *Clostridium botulinum* secreta sete sorotipos antigenicamente distintos, designados sorotipos A a G, da neurotoxina botulínica (BoNT). Todos os sorotipos, assim como as neurotoxinas tetânicas (TeNT) relacionadas, secretadas pelo *Clostridium tetani*, são Zn²⁺-endoproteases que bloqueiam a exocitose sináptica por meio da clivagem das proteínas SNARE (Couesnon, 2006, Microbiology, 152, 759). As CNTs causam a paralisia muscular flácida observada no botulismo e no tétano (Fischer 2007, PNAS 104, 10447).

[0004] Apesar de seus efeitos tóxicos, complexos de toxinas botulínicas têm sido usados como agentes terapêuticos em diversas doenças. O sorotipo A da toxina botulínica foi aprovado para uso em seres humanos, nos Estados Unidos, em 1989, para o tratamento do estrabismo, do blefaroespasma e de outras desordens. Ele está disponível comercialmente, como preparação protéica de toxina botulínica A, por exemplo, sob os nomes comerciais de BOTOX (Allergan Inc.) ou DYSPORT (Ipsen Ltd.). Uma preparação melhorada da toxina botulínica A, livre do complexo, está disponível comercialmente sob o nome XEOMIN (Merz

Pharmaceuticals GmbH). Para aplicações terapêuticas, a preparação é injetada diretamente no músculo a ser tratado. No pH fisiológico, a toxina é liberada do complexo protéico e o efeito farmacológico desejado acontece. O efeito da toxina botulínica é apenas temporário, razão pela qual pode ser necessária a sua administração repetida para que o efeito terapêutico seja mantido.

[0005] As neurotoxinas do *Clostridium* diminuem a força dos músculos voluntários e são eficazes no tratamento do estrabismo, da distonia focal (inclusive da distonia cervical) e do blefaroespasma essencial benigno. Elas mostraram-se capazes, também, de aliviar o espasmo hemifacial e a espasticidade focal. Além disso, são eficazes em uma ampla gama de outras indicações como desordens gastrointestinais, hiperidrose e correção cosmética das rugas (Jost 2007, Drugs 67, 669).

[0006] Durante o processo de preparação de neurotoxinas de *Clostridium*, as determinações qualitativa e quantitativa, bem como o controle de qualidade do polipeptídeo de neurotoxina ativa, são de particular importância. As preparações de neurotoxina disponíveis atualmente contêm, além da neurotoxina ativa desejada (processada ou madura), um precursor proteoliticamente não processado e/ou um polipeptídeo de neurotoxina parcialmente processada. O precursor proteoliticamente não processado ou o polipeptídeo de neurotoxina parcialmente processada difere do polipeptídeo de neurotoxina madura (ativa, processada) em uma sequência de poucos aminoácidos. Assim, é difícil distingui-los quantitativamente com base em suas propriedades químicas e físicas. Por outro lado, a quantidade de precursor

proteoliticamente não processado e/ou de polipeptídeo de neurotoxina parcialmente processada da proteína total pode ser ainda significativa nessas preparações. A quantidade depende do sistema biológico utilizado na produção e resulta da biossíntese e das condições do processo de fermentação. Portanto, o teor do polipeptídeo de neurotoxina madura, biologicamente ativa desejado, em preparações de neurotoxina, é pré-definido e, atualmente, difícil de determinar.

[0007] Materiais e métodos para um sistema confiável de detecção qualitativa e quantitativa de polipeptídeo de neurotoxina madura (ativa) são altamente desejáveis, mas não estão disponíveis ainda.

[0008] Assim, o problema técnico subjacente à presente invenção pode ser visto como a oferta de materiais e métodos capazes de atender às necessidades acima. Este problema técnico é resolvido pelas modalidades caracterizadas nas reivindicações apresentadas adiante e abaixo neste relatório.

[0009] A presente invenção se refere a um método para determinar a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina processada (ativa) em uma solução contendo polipeptídeo de neurotoxina processada e/ou parcialmente processada ou não processada, caracterizado pelas seguintes etapas:

- a) colocar em contato uma primeira porção da referida solução e um primeiro anticorpo de captura que se ligue, especificamente, às cadeias leves dos polipeptídeos de neurotoxina madura, parcialmente processada e não processada, sob condições que permitam essa ligação formando, assim, um primeiro complexo com anticorpo;

b) colocar em contato o primeiro complexo com anticorpo e um anticorpo de detecção que se ligue, especificamente, à cadeia pesada dos referidos polipeptídeos de neurotoxina madura, parcialmente processada e não processada presentes no complexo com anticorpo formado na etapa anterior, de modo que um primeiro complexo de detecção seja formado;

c) colocar em contato uma segunda porção da referida solução e um segundo anticorpo de captura que se ligue, especificamente, aos ligantes dos referidos polipeptídeos de neurotoxina parcialmente processada e não processada, sob condições que permitam essa ligação formando, assim, um segundo complexo com anticorpo,

d) colocar em contato, o segundo complexo com anticorpo e o anticorpo de detecção, de modo que um segundo complexo de detecção seja formado;

e) determinar a quantidade do segundo complexo de detecção formado nas etapas **b** e **d**, e

f) calcular a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina madura, com base nas quantidades do primeiro e do segundo complexo de detecção determinadas na etapa **e**.

[0010] O método supracitado pode, de modo geral, conter etapas adicionais, inclusive para preparação da solução ou avaliação dos resultados obtidos na etapa **f**. Além disso, as etapas **a** e **b**, assim como **c** e **d**, podem ser conduzidas simultaneamente ou em sequência. Neste último caso, as etapas **a** e **b** podem ser realizadas antes ou depois das etapas **c** e **d**. Além disso, a determinação a que se refere a etapa **e** pode ser feita, neste caso, depois que as duas séries de etapas tiverem sido

realizadas. Ou então, a determinação na etapa **e**, relativa ao primeiro complexo de detecção, pode ser feita após as etapas **a** e **b**, enquanto aquela relativa ao segundo complexo de detecção seria feita após as etapas **c** e **d**. O método pode ser automatizado, no todo ou em parte. A incubação e as etapas de medição podem ser realizadas, por exemplo, por um robô. A análise e a interpretação de dados podem ser realizadas por meio de um algoritmo de cálculo implementado em um computador.

[0011] O termo "polipeptídeo de neurotoxina" como utilizado na presente invenção refere-se aos sete diferentes sorotipos da neurotoxina botulínica - BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G - e à neurotoxina tetânica (TeNT) (ver Tabela 1) e suas variantes.

Tabela 1: Neurotoxinas botulínica e tetânica

SEQ ID NO.:	Referência	N. de acesso:	Neurotoxina (comprimento total)/ Cepa bacteriana
17	Beecher 1997, J Protein Chem 16, 701-712.; Krieglstein 1994, J Protein Chem 13, 49-57.	ABD65472.1 GI:8925859 2	BoNT/A (Hall/62A)
18	Antharavally 1998, J Protein Chem 17, 417-428.	BAE48264.1 GI:8123033 2	BoNT/B (Okra)

19	Sagane 1999, J Protein Chem 18, 885-892.	BAA89713.1 GI:6729213	BoNT/C1 (C-6814)
20	Sagane 1999, J Protein Chem 18, 885-892.	BAA90661.1 GI:6939795	BoNT/D (CB16)
21	Antharavally 1997, J Protein Chem 16, 787-799.	CAA43999.1 GI:40394	BoNT/E (Beluga)
22	Sagane 1999, J Protein Chem 18, 885-892.	CAA73972.1 GI:3805790	BoNT/F (NCTC10281)
23	Campbell 1993, Biochim. Biophys. Acta 1216 (3), 487-491	CAA52275.1 GI:441276	BoNT/G
24	Krieglstein 1991, <u>Eur J Biochem</u> 202, 41-51.; Krieglstein et al. 1990, Eur J Biochem 188, 39-45.	P04958.2 GI:135624	TeNT

[0012] As neurotoxinas aqui citadas contêm, em princípio, uma cadeia leve N-terminal e uma cadeia pesada C-terminal. As neurotoxinas são produzidas como moléculas precursoras de cadeia simples, aqui chamadas de "polipeptídeos de neurotoxina não processada". As sequências da cadeia leve N-terminal e da cadeia

pesada C-terminal são separadas, nas neurotoxinas não processadas, por pelo menos um sítio de clivagem proteolítica. Essas neurotoxinas possuem uma sequência de ligação entre as cadeias leve e pesada, de modo que a cadeia leve fica colocada na porção N-terminal, a partir do primeiro sítio de clivagem, e a cadeia pesada na porção C-terminal, a partir do segundo sítio de clivagem. Em um aspecto da invenção, a referida ligação contém uma sequência de aminoácidos como mostrado em quaisquer dos SEQ ID NO: 1 a 16. Durante o processamento das neurotoxinas, a sequência de ligação será removida. Essas neurotoxinas contêm dois sítios de clivagem proteolítica, um na extremidade N-terminal e outro na C-terminal das sequências de ligação. Durante o processamento dessas neurotoxinas podem surgir intermediários, os quais são quebrados em quaisquer dos sítios de clivagem, ou seja, a sequência de ligação não será removida ainda, mas permanecerá ou na cadeia leve N-terminal, ou na cadeia pesada C-terminal. Esses intermediários são chamados, nesta especificação, de "polipeptídeos de neurotoxinas processadas". Outras neurotoxinas contêm somente um sítio de clivagem. Para essas, deve ficar entendido que nenhuma sequência de ligação pode ser removida. Contudo, a neurotoxina não processada pode ser imunologicamente reconhecida por um sítio de clivagem proteolítica intacto e sequências adjacentes. Para o objetivo da presente invenção, essas sequências adjacentes e o sítio de clivagem também são considerados como um ligante. Assim, o termo "ligante", como utilizado neste documento e especificado acima, refere-se tanto à sequência entre as cadeias leve e pesada dos polipeptídeos de neurotoxina que contêm dois sítios de clivagem, quanto ao sítio de clivagem e sequências adjacentes dos

polipeptídeos de neurotoxina que possuem apenas um sítio de clivagem. Como resultado do processamento obtém-se "polipeptídeo de neurotoxina processada". Este exibe as propriedades biológicas características de uma neurotoxina, ou seja, ligação ao receptor, internalização, translocação através da membrana endossomal para o citosol e/ou clivagem endoproteolítica das proteínas envolvidas na fusão da membrana da vesícula sináptica. Assim, o polipeptídeo de neurotoxina processada é, às vezes, chamado aqui de polipeptídeo de neurotoxina ativa ou madura. A atividade biológica dos polipeptídeos de neurotoxina, em um aspecto, é resultado de todas as propriedades biológicas supracitadas. Ensaio *in vivo* para avaliar a atividade biológica incluem o LD₅₀ em camundongo e o ensaio de hemidiafragma de camundongo *ex vivo*, como descrito por Pearce et al. e por Dressier et al. (Pearce 1994, Toxicol Appl Pharmacol 128: 69-77 e Dressier 2005, Mov Disord 20:1617-1619). A atividade biológica é comumente expressa em unidades camundongo (MU). Como usada aqui, 1 MU é a quantidade de componente neurotóxico capaz de matar 50% de uma população especificada de camundongos após injeção intraperitoneal, ou seja, a LD₅₀ i.p. no camundongo.

[0013] Em um aspecto do método da invenção, o referido polipeptídeo de neurotoxina é selecionado de um grupo composto por um polipeptídeo de neurotoxina contendo uma sequência de aminoácidos como as mostradas em quaisquer das SEQ ID NO: 17 a 24, e um polipeptídeo de neurotoxina contendo uma sequência de aminoácidos que seja, pelo menos, 40% igual à sequência de aminoácidos do polipeptídeo de neurotoxina mostrada em quaisquer das SEQ ID NO: 17 a 24. As sequências de aminoácidos supracitadas mostram polipeptídeos de neurotoxina não processada. As

sequências dos polipeptídeos de neurotoxina parcialmente processada ou processada correspondentes podem ser deduzidas das referidas sequências pela informação sobre sítios de clivagem fornecidas na Tabela 3 abaixo. Em outro aspecto da invenção, o polipeptídeo de neurotoxina possui uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou, pelo menos 99% igual à sequência de aminoácidos mostrada nas SEQ ID NO: 17 a 24. O termo "igual", como usado na presente invenção, refere-se à identidade sequencial das sequências de aminoácidos, onde as sequências são alinhadas de modo que o mais alto grau de identidade seja obtido. Isto pode ser obtido utilizando-se técnicas ou métodos publicados, codificados em programas de computador, como, por exemplo, BLASTP, BLASTN, FASTA, Altschul 1990, J. Mol. Biol. 215, 403. Os percentuais de identidade são calculados, em um aspecto, sobre a sequência total de aminoácidos. Uma série de programas baseados em diversos algoritmos está à disposição dos técnicos da área, para comparação de diferentes sequências. Neste contexto, os algoritmos de Needleman e Wunsch ou de Smith e Waterman fornecem resultados particularmente confiáveis. Para fazer os alinhamentos de sequências, o programa PileUp (1987, J Mol Evolution 25, 351; Higgins 1989 CABIOS 5, 151) ou os programas Gap e BestFit (Needleman and Wunsch 1970, J Mol Biol 48; 443; Smith and Waterman 1981, Adv Appl Math 2, 482), que são parte do pacote de software GCG (Genetics Computer Group 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711), devem ser usados. Os valores de identidade de sequências indicados acima em porcentagem (%) devem ser determinados, em um aspecto da

invenção, usando o programa GAP sobre a sequência completa, com as seguintes configurações: Ponderação do Gap: 50; Ponderação do Comprimento: 3; Average Match: 10,000 e Average Mismatch: 0,000 que, a menos que haja especificação em contrário, devem ser sempre usadas como configurações-padrão para alinhamentos de sequências. Deve ser entendido que as variantes supracitadas devem, em um aspecto da invenção, conservar pelo menos uma das propriedades biológicas das neurotoxinas e, em outro aspecto, todas as propriedades biológicas de um polipeptídeo de neurotoxina aqui citado. Em outro aspecto, ainda, as variantes podem ser neurotoxinas com propriedades biológicas intensificadas ou alteradas; por exemplo, elas podem possuir sítios de clivagem que sejam melhores para reconhecimento enzimático ou para ligação ao receptor, ou qualquer outra propriedade especificada acima. É aceitável que o conceito da presente invenção se baseie na presença de dois ou mais sítios de clivagem entre as cadeias leve e pesada do polipeptídeo de neurotoxina, ao mesmo tempo em que a natureza desses sítios de clivagem e a sequência específica de aminoácidos entre eles não importe, desde que o agente seja específico para o polipeptídeo de neurotoxina parcialmente processada ou não processada. Sendo assim, é outro aspecto da invenção substituir os sítios de reconhecimento de protease e o peptídeo de ligação entre as cadeias pesada e leve do polipeptídeo de neurotoxina.

[0014] Em outro aspecto, o polipeptídeo de neurotoxina conforme o método da invenção pode ser uma molécula quimérica. Essa referida molécula quimérica, em um aspecto, pode ter domínios simples substituídos. Portanto, em outro aspecto, a

cadeia pesada da neurotoxina é substituída por uma parte de um domínio FC de um anticorpo.

[0015] O termo "quantidade", como usado no método da presente invenção, engloba a quantidade absoluta de um polipeptídeo, a quantidade relativa ou a concentração deste, bem como qualquer valor ou parâmetro que se relacione com ele, ou seja dele derivado.

[0016] O termo "solução", como aqui utilizado, refere-se a qualquer sistema solubilizado contendo o polipeptídeo de neurotoxina madura e seus precursores polipeptídeos de neurotoxina parcialmente processada e/ou não processada. O sistema solubilizado contém, ainda, um solvente. Os solventes incluídos nos vários aspectos da invenção são água, tampões aquosos, solventes orgânicos e líquidos iônicos. Em um aspecto da invenção, o sistema solubilizado é uma solução aquosa. Além disso, a solução pode conter outras moléculas, além do polipeptídeo de neurotoxina madura, do precursor do polipeptídeo de neurotoxina parcialmente processada ou não processada e do solvente, incluindo outros polipeptídeos bacterianos. Em um aspecto, a solução a ser utilizada no método da presente invenção será uma cultura de células bacterianas ou uma preparação purificada, ou parcialmente purificada, obtida a partir dessa cultura.

[0017] O termo "porção", como usado em relação ao método da invenção, refere-se a uma amostra ou alíquota da solução. Em um aspecto do método da invenção, a primeira e a segunda porções citadas na invenção são essencialmente iguais em volume e conteúdo. Isto pode ser alcançado, por exemplo, medindo-se o teor total de proteína na primeira e na segunda porção. Um teor

de proteína total essencialmente idêntico nas duas porções é indicativo de que elas têm o mesmo conteúdo. Contudo, em outro aspecto ainda, uma porção a ser usada como primeira ou segunda porção pode ser uma diluição da amostra ou alíquota da solução. Deverá ser entendido que, dependendo da quantidade de polipeptídeo de neurotoxina a ser determinada (isto é, polipeptídeo de neurotoxina parcialmente processada ou não processada, ou neurotoxina total) pode ser necessária uma diluição a fim de permitir uma determinação qualitativa e quantitativa ideal. Como fazer tais diluições é bem conhecido dos técnicos da área.

[0018] A expressão "colocar em contato", como usada em relação ao método da invenção, refere-se ao ato de colocar os anticorpos de captura citados acima e as neurotoxinas contidas na solução, ou os complexos de anticorpos e os anticorpos de detecção em proximidade física de modo a permitir a interação física e/ou química entre eles. Condições adequadas para permitir interações específicas são bem conhecidas dos técnicos da área. Tais condições irão depender dos anticorpos e da solução a serem usados no método da presente invenção e podem ser adaptados por um técnico da área sem maiores dificuldades. Da mesma forma, o tempo necessário para permitir tal interação também pode ser determinado pelo técnico da área sem dificuldade. Além disso, deve ser entendido que no intervalo entre as etapas de contato citadas no método da presente invenção, podem ser incluídas etapas de lavagem a fim de obter condições adequadas ao contato. Por exemplo, após a formação do primeiro complexo de anticorpo, na etapa **a**, a solução restante deve ser removida antes de adicionar o anticorpo de detecção àquele complexo. Ademais,

depois que o primeiro complexo de detecção for formado, na etapa **b**, pode ser necessário remover o anticorpo de detecção restante (não complexado) antes de determinar a quantidade do primeiro complexo de detecção na etapa **c**. O mesmo se aplica, obviamente, para as etapas **d** a **f**.

[0019] O "anticorpo", como usado neste documento, pode ser um anticorpo monoclonal ou um policlonal, um anticorpo de cadeia simples, um quimérico, um biespecífico, um anticorpo sintético ou um fragmento de qualquer um destes. Fragmentos dos referidos anticorpos incluem Fab, Fv scFv ou derivados quimicamente modificados de quaisquer desses fragmentos. Anticorpos podem ser produzidos por meio dos métodos descritos, por exemplo, em Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988 Anticorpos monoclonais podem ser preparados pelas técnicas originalmente descritas em Köhler 1975, Nature 256, 495 e em Galfré 1981, Meth Enzymol 73, 3. Essas técnicas incluem a fusão de células de mieloma de camundongo com células de baço oriundas de mamíferos imunizados. Anticorpos podem, ainda, ser melhorados por técnicas bem conhecidas na área. Por exemplo, pode ser usada ressonância de plásmon de superfície, como empregada no sistema BIACORE(R), para aumentar a eficiência de anticorpos expressos em fagos, os quais se ligam ao epítipo (ver Schier 1996, Human Antibodies Hybridomas 7, 97; Malmborg 1995, J. Immunol Methods 183, 7). O termo anticorpos, como usado aqui, compreende também equivalentes funcionais de anticorpos, ou seja, agentes capazes de ligarem-se especificamente aos desejados epítopos ou partes dos polipeptídeos de neurotoxina. Em um aspecto, esses equivalentes funcionais incluem o receptor ou proteínas ligantes citadas em algum ponto desta

especificação, ou seus domínios, capazes de mediar a referida ligação específica.

[0020] De acordo com o método da presente invenção, o "primeiro anticorpo de captura" liga-se, especificamente ao epítipo composto pela cadeia leve do polipeptídeo de neurotoxina madura e pelo polipeptídeo de neurotoxina parcialmente processada e/ou não processada. A expressão "ligação específica", como usada aqui, em geral, significa que o anticorpo não faz reação cruzada significativa com outros epítopos da cadeia pesada ou do ligante do polipeptídeo de neurotoxina a ser determinado, nem com outros polipeptídeos. A ligação específica a que este texto se refere pode ser testada por meio de diversas técnicas bem conhecidas, entre elas, por exemplo, experimentos de competição e Western blots. Um epítipo, como usado nesta invenção, refere-se ao determinante antigênico que é reconhecido pelo anticorpo.

[0021] Em outro aspecto, anticorpos de captura diferentes podem ser usados para substituir o primeiro anticorpo de captura. Para este fim, é possível que pelo menos um anticorpo de captura se ligue especificamente aos epítopos da cadeia leve do polipeptídeo de neurotoxina não processada, pelo menos um outro anticorpo de captura se ligue, especificamente, aos epítopos da cadeia leve do polipeptídeo de neurotoxina parcialmente processada e, pelo menos outro anticorpo de captura se ligue especificamente aos epítopos da cadeia leve do polipeptídeo de neurotoxina processada. Deverá ser entendido que, para os objetivos do método da presente invenção, esses três tipos de anticorpos assemelham-se ao primeiro anticorpo de captura. Analogamente, um anticorpo de captura que se ligue

especificamente aos epítomos da cadeia leve dos polipeptídeos de neurotoxina parcialmente processada e não processada pode ser usado em combinação com um anticorpo de captura que se ligue especificamente aos epítomos da cadeia leve do polipeptídeo de neurotoxina processada.

[0022] O referido primeiro anticorpo de captura pode, em um aspecto, ser imobilizado. Esta imobilização do anticorpo pode, em princípio, ser conseguida por meio da ligação reversível ou não reversível, direta ou indireta (via moléculas de ligação) do anticorpo a um suporte sólido. Em um aspecto, o primeiro anticorpo de captura é imobilizado antes de o método ser aplicado. Em outro aspecto, o primeiro anticorpo de captura é imobilizado depois que o primeiro complexo com anticorpo foi formado, mas antes de ser colocado em contato com o anticorpo de detecção. Materiais para suporte sólido são bem conhecidos na área e incluem, *inter alia*, matrizes polissacarídicas disponíveis comercialmente, selecionadas de um grupo composto por sefarose, sephadex, agarose, sephacel, microcelulose e esferas de alginato; matrizes polipeptídicas; esferas de poliestireno; esferas de látex; esferas magnéticas; partículas metálicas coloidais; vidro; aparas e superfícies plásticas e/ou de sílica; tiras de nitrocelulose; membranas; placas; duracytes; poços e paredes de bandejas de reação; tubos plásticos. Em um aspecto da invenção, este suporte sólido é feito de poliestireno gama-irradiado.

[0023] O termo "primeiro complexo com anticorpo" refere-se a um complexo contendo o primeiro anticorpo de captura ligado, especificamente, ao polipeptídeo de neurotoxina processada, parcialmente processada ou não processada. O referido complexo

com anticorpo é formado em decorrência do contato do primeiro anticorpo de captura com a solução que contém os polipeptídeos de neurotoxina processada, parcialmente processada e/ou não processada, como definido acima.

[0024] De acordo com o método da invenção, o “segundo anticorpo de captura” se liga, especificamente, a um epítipo, que contém o ligante dos polipeptídeos de neurotoxina não processada e/ou parcialmente processada, ou partes dele. Nos casos em que falta a sequência de ligação, é esperado que o referido segundo anticorpo de captura se ligue, especificamente, a um epítipo contendo o sítio de clivagem proteolítica não clivado ou partes dele. Em um aspecto da invenção, o segundo anticorpo de captura não reage paralelamente, em grau significativo, com o polipeptídeo de neurotoxina processada. Em um aspecto, o referido segundo anticorpo de captura imobilizado se liga, especificamente, a um epítipo contendo, sendo contido ou consistindo essencialmente de uma sequência de aminoácidos como a mostrada na SEQ ID NO: 1 a 16 (ver Tabela 2 ou 3 abaixo).

Tabela 2: Sequências de aminoácidos dos sítios de clivagem de diferentes polipeptídeos de neurotoxina e sequências adjacentes

SEQ ID N.:	Sequência do epítipo incluindo sítios de clivagem (em destaque)	Neurotoxina (Cepa bacteriana)
1	KLL C VRGIITSK TKSLDKGY NKALN....DL C IK V	BoNT/A (Hall/62A)
2	IQM C KSV K APG.....I C ID V	BoNT/B (Okra)

3	TKF CH KAIDGR SL YNK TL.....D CR ELL V	BoNT/C1 (C-6814)
4	TKV CL RRLTK..... NSR D.....D STC IK V	BoNT/D
5	IRF CK NIVSV KG IRK SIC IE I	BoNT/E (Beluga)
6	VKF CK SVIPR KG TKAPPRL C IR V	BoNT/F (NCTC10281)
7	IAM CK PVMYKNT.....GKS.....EQ C II V	BoNT/G
8	IGL CK KKIIPPTNIRE N LYN R TASLTDLGGEL C IK I	TeNT

Tabela 3: Sequências de aminoácidos das regiões de ligação

SEQ ID N.:	Sequência dos epítomos	Sítios de clivagem	Neurotoxina/ Ceba bacteriana
9	TKSLDKGYNK	K438 / T439 K448 / A449	BoNT/A (Hall/62A)
10	CKSVKAPGIC	K441 / A442	BoNT/B (Okra)
11	SLYNK	R444 / S445 K449 / T450	BoNT/C1 (C-6814)
12	NSR	K442 / N443 R445 / D446	BoNT/D (CB16)
13	GIR	K419 / G420	BoNT/E (Beluga)

		R422 / K423	
14	KGTK	R435 / K436 K439 / A440	BoNT/F (NCTC10281)
15	NGTK		BoNT/G
16	ENLYNR	R449 (alternativamente, e, R455)	TeNT

[0025] Devido à presença do epítopo supracitado, os polipeptídeos de neurotoxina não processada ou parcialmente processada podem ser ligados, especificamente, pelo segundo anticorpo de captura e, assim, formar um segundo complexo com anticorpo. O referido segundo anticorpo de captura é, em um aspecto, imobilizado como explicado detalhadamente acima.

[0026] Da mesma forma, o termo "segundo complexo com anticorpo" refere-se a um complexo contendo o segundo anticorpo de captura ligado, especificamente, ao polipeptídeo de neurotoxina parcialmente processada ou não processada. O referido segundo complexo com anticorpo, contudo, não deve conter polipeptídeo de neurotoxina processada.

[0027] De acordo com o método da invenção, o "anticorpo de detecção" liga-se, especificamente, ao primeiro e/ou ao segundo complexo com anticorpo. Em um aspecto, os anticorpos de detecção para o primeiro e para o segundo complexo com anticorpo são idênticos. No entanto, em outro aspecto, diferentes anticorpos de detecção podem ser usados para o primeiro e o segundo complexos com anticorpo. Em um aspecto, o anticorpo de detecção

liga-se, especificamente, a epítomos na cadeia pesada dos polipeptídeos de neurotoxina processada, parcialmente processada e não processada. Devido à presença do mesmo epítomo em ambos os complexos, o primeiro ou o segundo complexo com anticorpo podem ser especificamente ligados e, assim, ser detectados pelo anticorpo de detecção neste aspecto da invenção.

[0028] Em consequência da ligação específica do anticorpo de detecção, forma-se, respectivamente, um primeiro complexo de detecção ou um segundo complexo de detecção.

[0029] Sendo assim, o termo "primeiro complexo de detecção" refere-se a um complexo contendo o primeiro complexo com anticorpo e o anticorpo de detecção. Analogamente, o termo "segundo complexo de detecção" refere-se a um complexo contendo o segundo complexo com anticorpo e o anticorpo de detecção.

[0030] Em um aspecto do método da invenção, o referido anticorpo de detecção contido no primeiro ou no segundo complexo de detecção fica acoplado a um marcador detectável, permitindo a medida da quantidade de anticorpo de detecção ligada ao complexo de detecção. Medindo-se esta quantidade de anticorpo de detecção ligado, a quantidade do primeiro ou do segundo complexo com anticorpo pode ser determinada, uma vez que a quantidade de anticorpo de detecção ligado ao complexo de detecção correlaciona-se com a quantidade de complexo com anticorpo contida no complexo de detecção. A marcação pode ser feita por métodos diretos ou indiretos. Marcação direta envolve a ligação do marcador diretamente (de modo covalente ou não covalente) ao primeiro anticorpo de detecção. Marcação indireta envolve a ligação (covalente ou não covalente) de um agente, o qual se liga especificamente ao anticorpo de detecção e carrega um

marcador detectável. Esse agente pode ser, por exemplo, um anticorpo secundário (ordem superior), que se ligue especificamente ao anticorpo de detecção. Neste caso, o anticorpo secundário será acoplado a um marcador detectável. Deverá ser entendido que anticorpos de ordem superior podem ser usados em combinação para detectar o complexo de detecção. Frequentemente, anticorpos de ordem superior são usados para aumentar o sinal. Anticorpos de ordem superior adequados podem incluir, também, o bem conhecido sistema streptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.) e os bem conhecidos Dako LSAB™2 e LSAB™+ (streptavidina-biotina marcado), ou Dako PAP (Peroxidase Anti-Peroxidase). Em outro aspecto, o referido marcador do primeiro anticorpo de detecção é selecionado de um grupo composto por corantes fluorescentes, moléculas quimioluminescentes, marcadores radioativos e enzimas capazes de gerar um sinal detectável. Marcadores fluorescentes típicos incluem proteínas fluorescentes (como GFP e seus derivados), Cy3, Cy5, vermelho Texas, fluoresceína e os corantes Alexa (p/ex., Alexa 568). Marcadores radioativos típicos incluem ³⁵S, ¹²⁵I, ³²P, ³³P e semelhantes. Alternativamente, um marcador detectável acoplado ao referido primeiro anticorpo de detecção também pode ser uma enzima capaz de gerar um sinal detectável, por exemplo, pela conversão de um substrato. Em um aspecto, essa enzima pode ser uma peroxidase (p/ex., peroxidase da raiz-forte) ou uma fosfatase alcalina.

[0031] A expressão "determinação da quantidade", como aqui utilizada, refere-se à medida da quantidade absoluta, da quantidade relativa ou concentração, de modo quantitativo ou semi-quantitativo. A medida será feita com base nas propriedades

químicas, físicas ou biológicas do marcador detectável acoplado ao primeiro anticorpo de detecção. Medidas adequadas para detecção são bem conhecidas dos técnicos da área e dependem da natureza do marcador detectável, como definido acima. Deverá ser entendido, contudo, que a quantidade de marcador detectável que pode ser medida correlaciona-se, diretamente, com a quantidade de complexo de detecção o qual, por sua vez, correlaciona-se com a quantidade de complexo com anticorpo e, portanto, com a quantidade da espécie de neurotoxina a ser determinada, ou seja, neurotoxina total (processada, não processada e parcialmente processada) ou neurotoxinas não processada e parcialmente processada. Deverá ser entendido, também, que a determinação da quantidade de polipeptídeos de neurotoxina, em um aspecto, requer ainda a calibração do método com soluções-padrão contendo quantidades pré-definidas de polipeptídeos de neurotoxina. Como fazer essa calibração é um processo bem conhecido dos técnicos da área.

[0032] O termo "cálculo", como usado em relação ao método da presente invenção, refere-se às operações matemáticas que permitem a determinação da quantidade de neurotoxina processada com base nas quantidades de neurotoxina total (ou seja, processada, não processada e parcialmente processada) e de neurotoxinas parcialmente processada e não processada. Em um aspecto do método da presente invenção, este cálculo compreende a subtração das quantidades de neurotoxina parcialmente processada e não processada da quantidade de neurotoxina total.

[0033] Vantajosamente, o método da presente invenção permite uma determinação confiável da quantidade de neurotoxina processada em uma dada preparação. Desse modo, a qualidade das

preparações de neurotoxina pode ser aumentada, já que essas preparações podem ser testadas relativamente a quantidades constantes do polipeptídeo de neurotoxina processada desejado.

[0034] Em princípio, o método da presente invenção pode ser aplicado acoplando-se um primeiro anticorpo de captura a um suporte sólido, tal como um frasco de reação. Analogamente, o segundo anticorpo de captura deve ser acoplado a outro suporte sólido, fisicamente separado (por exemplo, outro frasco de reação). Os dois anticorpos de captura acoplados aos suportes sólidos serão, em seguida, colocados em contato com as referidas porções da solução contendo a neurotoxina processada, não processada e/ou parcialmente processada a ser determinada. Essa solução pode ser, por exemplo, uma cultura purificada de células bacterianas de *Clostridium sp.* Deverá ser entendido que uma primeira porção será colocada em contato com o primeiro anticorpo de captura no primeiro suporte sólido e uma segunda porção será posta em contato com o segundo anticorpo de captura no segundo suporte sólido. As porções têm, geralmente, o mesmo volume e são normalizadas quanto a seus conteúdos, por exemplo, seu teor total de proteína. O contato será mantido por tempo suficiente para permitir a ligação específica do primeiro e do segundo anticorpo de captura a seus respectivos antígenos. Por exemplo, o contato pode ser mantido por aproximadamente uma hora, em temperatura ambiente. Em seguida, a primeira e a segunda porções da solução serão descartadas e os suportes sólidos (por exemplo, os frascos de reação) serão lavados uma ou duas vezes, sob condições de tamponamento que não afetem o primeiro e o segundo complexos com anticorpo, os quais se formaram com os anticorpos de captura nesses suportes. Após as etapas de lavagem, o (primeiro)

anticorpo de detecção será adicionado aos suportes sólidos sob condições que permitam a ligação específica do anticorpo de detecção. Excesso do anticorpo de detecção deverá ser removido por meio de outras etapas de lavagem usando um tampão apropriado. Em seguida, as quantidades do primeiro e do segundo complexo de detecção podem ser determinadas através da determinação da quantidade de anticorpo de detecção especificamente ligado. Essa determinação deverá ser efetuada de acordo com a natureza do marcador do anticorpo de detecção, por exemplo, medindo-se a densidade ótica ou a intensidade de fluorescência. A quantidade medida para o marcador detectável pode ser comparada com padrões de calibração a fim de determinar a quantidade de espécies de neurotoxina, ou seja, total (processada, não processada e parcialmente processada) ou não processada e parcialmente processada, no primeiro ou no segundo complexo de detecção. Deverá ser entendido que o primeiro complexo de detecção representa a quantidade de neurotoxina total, enquanto o segundo complexo de detecção representa apenas a quantidade de polipeptídeos de neurotoxina parcialmente processada e não processada. Sendo assim, a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina processada pode ser calculada na configuração detalhada acima subtraindo-se a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina parcialmente processada ou não processada da quantidade total de polipeptídeo de neurotoxina.

[0035] Deve ser entendido que as definições e explicações dos termos dadas acima aplicam-se *mutatis mutandis* a todos os aspectos descritos nessa especificação, exceto quando indicado em contrário.

[0036] A presente invenção refere-se também a um método para determinar a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina processada (ativa) em uma solução contendo polipeptídeo de neurotoxina processada e parcialmente processada e/ou não processada, caracterizado pelas etapas:

- a) colocar em contato uma primeira porção da referida solução e um primeiro anticorpo de captura que se ligue, especificamente, às cadeias pesadas dos polipeptídeos de neurotoxina madura, parcialmente processada e não processada, sob condições que permitam essa ligação formando, assim, um primeiro complexo com anticorpo;
- b) colocar em contato o primeiro complexo com anticorpo e um anticorpo de detecção que se ligue, especificamente, à cadeia leve dos referidos polipeptídeos de neurotoxina madura, parcialmente processada e não processada presentes no complexo com anticorpo formado na etapa anterior, de modo que um primeiro complexo de detecção seja formado;
- c) colocar em contato uma segunda porção da referida solução e um segundo anticorpo de captura que se ligue, especificamente, aos ligantes dos referidos polipeptídeos de neurotoxina parcialmente processada e não processada, sob condições que permitam essa ligação formando, assim, um segundo complexo com anticorpo;
- d) colocar em contato, o segundo complexo com anticorpo e o anticorpo de detecção, de modo que um segundo complexo de detecção seja formado,
- e) determinar a quantidade do segundo complexo de detecção formada nas etapas **b** e **e**, e

f) calcular a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina madura, com base nas quantidades do primeiro e do segundo complexos de detecção determinadas na etapa **e**.

[0037] Em outro aspecto dos métodos da invenção, estes incluem, ainda, a determinação da atividade ligante do polipeptídeo de neurotoxina.

[0038] O termo "atividade ligante", como usado em relação ao método da invenção, refere-se à capacidade do polipeptídeo de neurotoxina processada de ligar-se a uma proteína receptora de superfície presente, por exemplo, em terminações nervosas colinérgicas periféricas. Proteínas receptoras incluídas neste aspecto são SV2 para BoNT/A, sinaptotagminas I e II para BoNT/B e BoNT/G, e um co-receptor gangliosídeo (GT_{1B}). Em um aspecto do método da invenção, a referida atividade ligante pode ser determinada *ex vivo* utilizando um substrato modelo que substitua a proteína receptora de superfície mimificando seu domínio de ligação. Esse substrato modelo é, em um aspecto da invenção, um peptídeo marcado derivado das proteínas receptoras mencionadas acima. Em outro aspecto, marcadores adequados incluem aqueles já mencionados nesta especificação e, em particular, a biotina.

[0039] Assim, a presente invenção também contempla um método para determinação da atividade ligante de um polipeptídeo de neurotoxina, caracterizado pelas seguintes etapas:

a) colocar em contato uma porção de uma solução contendo polipeptídeo de neurotoxina e um polipeptídeo marcado de modo a formar um complexo; e

b) determinar o complexo formado na etapa **a** com base no marcador, de modo que a presença ou ausência do complexo,

ou sua quantidade, seja um indicador da atividade ligante do polipeptídeo de neurotoxina naquela solução.

[0040] O complexo pode ser determinado com base na natureza do marcador usado para marcar o peptídeo. Em um aspecto, por exemplo, o peptídeo biotinilado contido em um complexo pode ser determinado por meio de um conjugado de Streptavidina capaz de gerar um sinal detectável. A presença, ausência ou a intensidade do sinal será um indicador da atividade ligante dos polipeptídeos de neurotoxina na solução, ou de sua força.

[0041] Em outro aspecto do método da invenção, este inclui, ainda, a determinação da atividade proteolítica do polipeptídeo de neurotoxina.

[0042] O termo "atividade proteolítica", como usado de acordo com o método da invenção, refere-se à capacidade da neurotoxina processada de quebrar, proteoliticamente, a ligação a proteínas receptoras sensíveis a N-etilmaleimida (SNARE), envolvidas na fusão da membrana de vesículas sinápticas. Em um aspecto, essa quebra é dependente de zinco(II). A referida atividade proteolítica pode ser determinada usando-se um substrato modelo que substitua uma proteína SNARE de ocorrência natural. Além disso, após a clivagem, um marcador detectável, como um corante, pode ser liberado do referido substrato modelo. Em um aspecto, o substrato modelo é um composto contendo a fórmula geral X-para-nitroanilida, onde X é igual a arginina ou a um peptídeo contendo a sequência arginina-Y em que Y representa um ou mais aminoácidos. Em outro aspecto, o composto é a arginina-para-nitroanilida.

[0043] Portanto, a presente invenção contempla, também, um método para determinação da atividade proteolítica de uma neurotoxina, caracterizado pelas seguintes etapas:

a) colocar em contato, uma porção de uma solução contendo um polipeptídeo de neurotoxina e um composto de fórmula geral X-para nitroanilida, onde X é igual a arginina ou a um peptídeo contendo a sequência arginina-Y, em que Y representa um ou mais aminoácidos; e

b) determinar a atividade proteolítica do polipeptídeo de neurotoxina na solução, com base na quantidade de para-nitroanilina liberada na etapa **a**, a qual se correlaciona com a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina.

[0044] Em um aspecto, Y representa um resíduo peptídico contendo uma sequência de aminoácidos como mostrada em qualquer uma das SEQ ID NO: 25 ou 26.

[0045] O polipeptídeo de neurotoxina processada contido na referida porção da solução pode clivar e, assim, liberar para-nitroanilina do restante do peptídeo. Para-nitroanilina é um corante bem conhecido na área. A determinação da atividade proteolítica do polipeptídeo de neurotoxina na solução em questão baseia-se na quantidade de para-nitroanilina liberada, a qual se correlaciona com a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina.

[0046] A presente invenção contempla, também, um dispositivo para determinação da quantidade de polipeptídeo de neurotoxina processada contida em uma solução, constituído por:

a) um arranjo de um primeiro anticorpo de captura, um segundo anticorpo de captura e um anticorpo de detecção que

permita realizar as etapas **a** a **e** dos métodos descritos acima; e

b) meios para calcular a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina madura, com base nas quantidades do primeiro e do segundo complexo de detecção determinadas pelo arranjo da etapa **a**.

[0047] O termo "dispositivo", como utilizado aqui, refere-se a um sistema contendo, pelo menos, o arranjo citado acima e meios ligados operacionalmente, uns aos outros, para permitir a determinação. Em um aspecto, o arranjo pode ser um suporte sólido com anticorpos de captura imobilizados, como citado acima, o qual pode estar presente em frascos fisicamente separados para permitir um contato separado com a primeira e com a segunda porção da solução. Além disso, o dispositivo pode conter, em um aspecto, uma unidade para determinação da quantidade dos complexos de detecção. Dependendo do tipo de anticorpo de detecção a ser utilizado, esta unidade incluirá um detector para os sinais gerados pelo anticorpo de detecção. Ademais, a unidade pode conter, também, em um aspecto, meios para calibração (por exemplo, um algoritmo computacional) capazes de comparar os sinais medidos com padrões de calibração, a fim de determinar as quantidades de polipeptídeos de neurotoxina presentes em uma solução ou em uma porção dela. O dispositivo incluirá, ainda, meios para calcular a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina madura com base nas quantidades do primeiro e do segundo complexo de detecção; por exemplo, um algoritmo computacional para realizar esse cálculo.

[0048] Ainda, a invenção refere-se a um kit adaptado para aplicar os métodos citados acima, contendo:

- a) um arranjo de um primeiro anticorpo de captura, um segundo anticorpo de captura e um anticorpo de detecção que permita realizar as etapas **a** a **e** dos métodos descritos acima;
- b) meios para calcular a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina madura, com base nas quantidades do primeiro e do segundo complexo de detecção determinadas pelo arranjo da etapa **a**; e
- c) instruções para aplicar o referido método.

[0049] O termo "kit", como utilizado aqui, refere-se a uma coleção dos materiais ou reagentes supracitados da presente invenção, os quais podem estar reunidos ou não. Os componentes do kit podem estar em frascos separados (ou seja, um kit de partes separadas) ou serem fornecidos em um frasco só. Além disso, deve ser entendido que o kit da presente invenção deve ser usado para aplicar os métodos referidos acima. Em um aspecto, espera-se que todos os componentes sejam fornecidos prontos para serem usados na aplicação dos métodos referidos acima. Em outro aspecto, o kit contém instruções para aplicar os referidos métodos. Essas instruções podem ser fornecidas através de um manual do usuário em papel, ou em formato eletrônico. Por exemplo, o manual pode conter instruções para interpretar os resultados obtidos quando da aplicação dos métodos detalhados acima utilizando-se o kit da presente invenção.

[0050] Todas as referências citadas neste relatório descritivo são a ele incorporadas por referência, com relação a seu conteúdo total e ao conteúdo especificamente mencionado neste documento.

Figuras:

[0051] Figura 1: Esquema da ligação de pelo menos um (ou mais) anticorpos de detecção.

[0052] Figura 2: Esquema da ligação específica do segundo anticorpo de captura do precursor do polipeptídeo de neurotoxina parcialmente processada ou não processada, e da subsequente ligação de pelo menos um (ou mais) anticorpos de detecção.

[0053] Figura 3: Esquema da determinação da atividade ligante do polipeptídeo de neurotoxina.

[0054] Figura 4: Esquema da determinação da atividade proteolítica do polipeptídeo de neurotoxina.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinar a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina processada em uma solução contendo polipeptídeo de neurotoxina processada e parcialmente processada e/ou não processada, **caracterizado** pelas seguintes etapas:

a) colocar em contato uma primeira porção da referida solução e um primeiro anticorpo de captura que se ligue, especificamente, às cadeias leves dos polipeptídeos de neurotoxina processada, parcialmente processada e não processada, sob condições que permitam a ligação do referido anticorpo à referida neurotoxina formando, assim, um primeiro complexo com anticorpo, em que o referido polipeptídeo de neurotoxina não processada é selecionado do grupo formado por um polipeptídeo de neurotoxina como mostrado em qualquer uma das SEQ ID NO: 17 a 24;

b) colocar em contato o primeiro complexo com anticorpo e um anticorpo de detecção que se ligue, especificamente, à cadeia pesada dos referidos polipeptídeos de neurotoxina processada, não processada e parcialmente processada presentes no complexo com anticorpo formado na etapa **a**, de modo que um primeiro complexo de detecção seja formado;

c) colocar em contato uma segunda porção da referida solução e um segundo anticorpo de captura que se ligue, especificamente, aos ligantes do referido polipeptídeo de neurotoxina parcialmente processada ou não processada, sob condições que permitam a ligação do

referido anticorpo ao referido polipeptídeo de neurotoxina parcialmente processada ou não processada formando, assim, um segundo complexo com anticorpo, em que o referido ligante é um epítipo de um peptídeo que contém uma sequência de aminoácidos como mostrado em qualquer uma das SEQ ID NO: 1 a 16;

d) colocar em contato o segundo complexo com anticorpo e um anticorpo de detecção que é diferente do anticorpo de detecção da etapa **b** e que se ligue, especificamente, ao complexo com anticorpo formado na etapa **c**, de modo que um segundo complexo de detecção seja formado;

e) determinar a quantidade do primeiro complexo de detecção formado na etapa **b** e a quantidade do segundo complexo de detecção formado na etapa **d**, e

f) calcular a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina processada, com base nas quantidades do primeiro e do segundo complexos de detecção determinadas na etapa **e**.

2. Método para determinar a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina processada em uma solução contendo polipeptídeo de neurotoxina processada e parcialmente processada e/ou não processada, **caracterizado** pelas seguintes etapas:

a) colocar em contato uma primeira porção da referida solução e um primeiro anticorpo de captura que se ligue, especificamente, às cadeias pesadas dos polipeptídeos de neurotoxina processada, parcialmente processada e não processada, sob condições que permitam a ligação do referido anticorpo ao referido polipeptídeo de neurotoxina processada, parcialmente processada e não

processada formando, assim, um primeiro complexo com anticorpo, em que o referido polipeptídeo de neurotoxina não processada é selecionado de um grupo formado por um polipeptídeo de neurotoxina como mostrado em qualquer uma das SEQ ID NO: 17 a 24;

b) colocar em contato o primeiro complexo com anticorpo e um anticorpo de detecção que se ligue, especificamente, à cadeia leve dos referidos polipeptídeos de neurotoxina processada, parcialmente processada e não processada presentes no complexo com anticorpo formado na etapa **a**, de modo que um primeiro complexo de detecção seja formado;

c) colocar em contato uma segunda porção da referida solução e um segundo anticorpo de captura que se ligue, especificamente, aos ligantes dos referidos polipeptídeos de neurotoxina parcialmente processada e não processada, sob condições que permitam a ligação do referido anticorpo ao referido polipeptídeo de neurotoxina parcialmente processada e não processada formando, assim, um segundo complexo com anticorpo, em que o referido ligante é um epítipo de um peptídeo que contém uma sequência de aminoácidos como mostrado em qualquer uma das SEQ ID NO: 1 a 16;

d) colocar em contato, o segundo complexo com anticorpo e um anticorpo de detecção que é diferente do anticorpo de detecção na etapa **b** e que se liga, especificamente, ao complexo com anticorpo formado na etapa **c**, de modo que um segundo complexo de detecção seja formado;

- e) determinar a quantidades do primeiro complexo de detecção formado na etapa **b** e a quantidade do segundo complexo de detecção formado na etapas **d**; e
- f) calcular a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina processada, com base nas quantidades do primeiro e do segundo complexos de detecção determinadas na etapa **e**.

3. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o referido primeiro anticorpo de captura é imobilizado.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que o referido segundo anticorpo de captura é imobilizado.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o cálculo da etapa **f** inclui subtrair a quantidade determinada do segundo complexo de detecção da quantidade determinada do primeiro complexo de detecção.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que esse método inclui a determinação da atividade ligante do polipeptídeo de neurotoxina.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelas seguintes etapas:

- a) colocar em contato uma porção de uma solução contendo polipeptídeo de neurotoxina e um polipeptídeo marcado de modo a formar um complexo; e
- b) determinar o referido complexo formado na etapa **a** com base no marcador, de modo que a presença ou ausência do complexo, ou sua quantidade, seja um indicador da atividade ligante do polipeptídeo de neurotoxina na referida solução.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que o referido método inclui a determinação da atividade proteolítica do polipeptídeo de neurotoxina.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelas seguintes etapas:

- a) colocar em contato uma porção de uma solução contendo um polipeptídeo de neurotoxina e um composto de fórmula geral X-para-nitroanilida, onde X é igual a arginina ou a um peptídeo contendo a sequência arginina-Y, em que Y representa um ou mais aminoácidos; e
- b) determinar a atividade proteolítica do polipeptídeo de neurotoxina na solução, com base na quantidade de para-nitroanilina liberada na etapa **a**, a qual se correlaciona com a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina.

10. Dispositivo para determinação da quantidade de polipeptídeo de neurotoxina processada contida em uma solução, **caracterizado** por ser constituído por:

- a) um arranjo de um primeiro anticorpo de captura, um segundo anticorpo de captura e dois anticorpos de detecção diferentes, em que o referido arranjo permite realizar as etapas **a** a **f** dos métodos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 9; e
- b) meios para calcular a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina processada, com base nas quantidades do primeiro e do segundo complexos de detecção determinadas pelo arranjo da etapa **a**.

11. Kit adaptado para a execução do método conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, o referido kit **caracterizado** por conter:

- a) um arranjo de um primeiro anticorpo de captura, um segundo anticorpo de captura e dois anticorpos de detecção diferentes, em que o referido arranjo permite realizar as etapas **a** a **f** dos métodos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 9;
- b) meios para calcular a quantidade de polipeptídeo de neurotoxina processada, com base nas quantidades do primeiro e do segundo complexos de detecção determinadas pelo arranjo da etapa **a**; e
- c) instruções para executar o referido método.

FIGURA 1

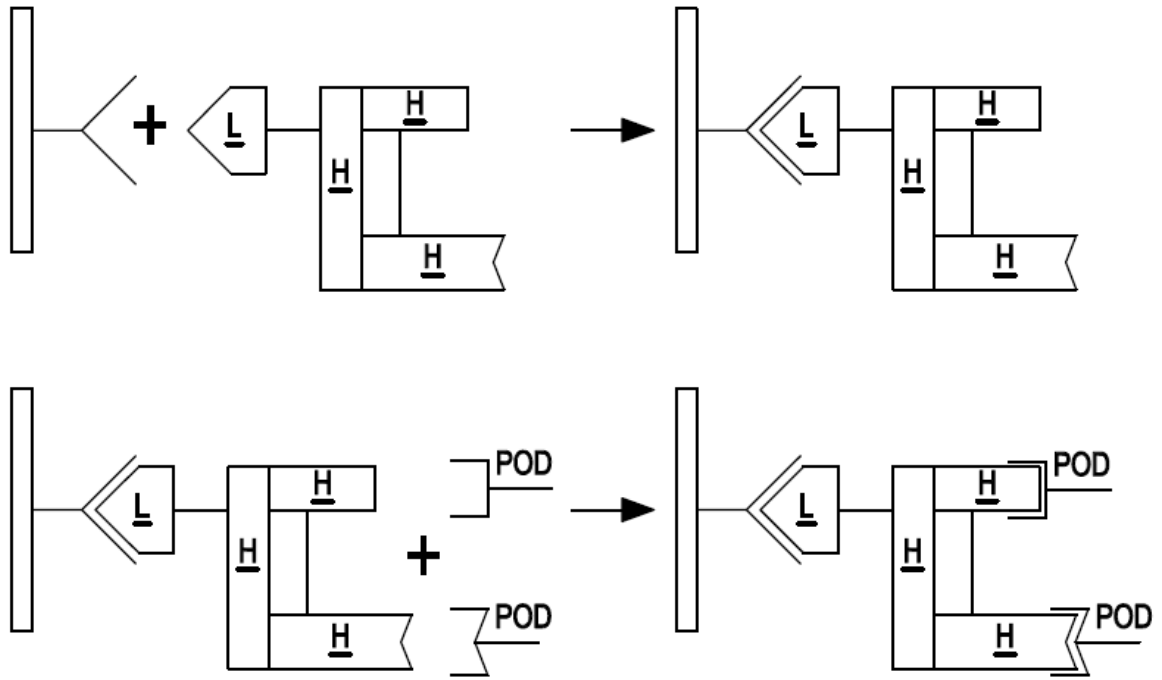


FIGURA 2

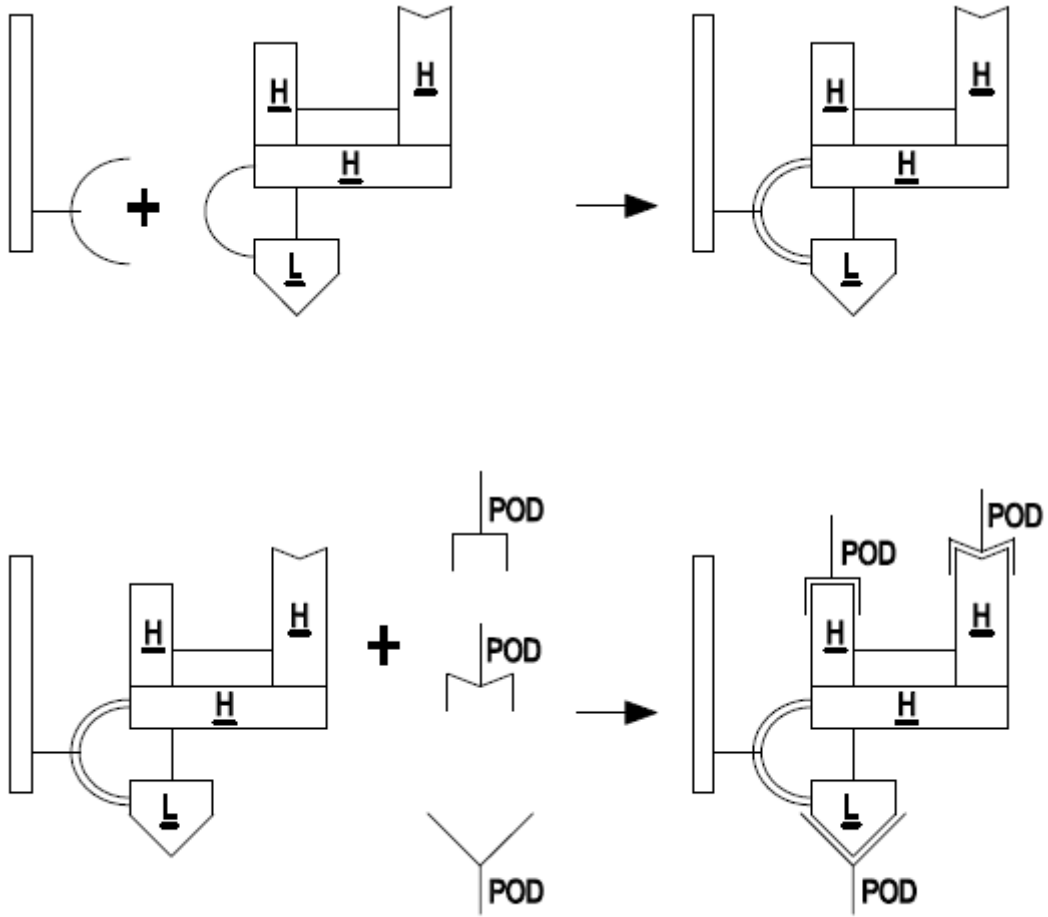


FIGURA 3

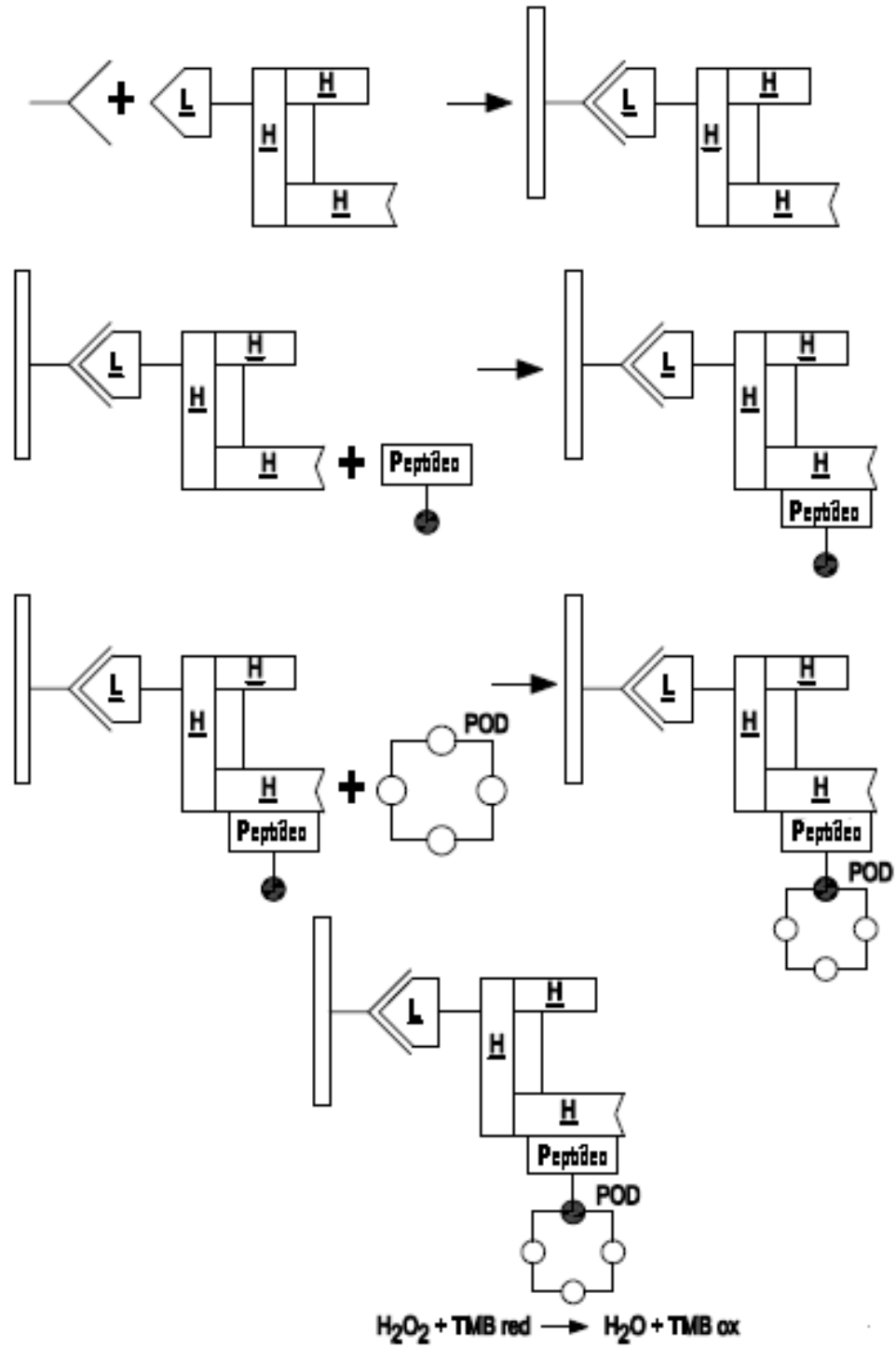


FIGURA 4

