

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 513**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06806613 .3**
96 Fecha de presentación: **30.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1940874**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2008**

54 Título: **Receptor de proteína de la neurotoxina botulínica A y sus utilizaciones**

30 Prioridad:
28.10.2005 DE 102005051789

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.04.2012

73 Titular/es:
toxogen GmbH
Feodor-Lynen-Str. 35
30625 Hannover , DE

72 Inventor/es:
RUMMEL, Andreas;
BINZ, Thomas;
MAHRHOLD, Stefan y
BIGALKE, Johannes Wilhelm

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 379 513 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

Receptor de proteína de la neurotoxina botulínica A y sus utilizaciones.

5 Descripción de la invención

10 La presente invención se relaciona con un polipéptido que liga la neurotoxina botulinum A (BoNT/A) generada por *Clostridium botulinum*. Este polipéptido es un polipéptido del dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína 2C (SV2C) de la vesícula sináptica de *homo sapiens*, de manera que liga el fragmento H_c de la neurotoxina botulinum A. La invención se relaciona en particular con el uso del polipéptido y de las partes de péptidos de éste como antagonista para la reducción de la neurotoxicidad de BoNT/A, como auxiliares para la identificación de sustancias que reducen la liga de BoNT/A a células neuronales y para la detección de BoNT/A en diferentes matrices.

15 Las células neuronales liberan sustancias transmisoras mediante la exocitosis. Como exocitosis se hace referencia a la fusión de las membranas de vesículas intracelulares con la membrana del plasma. En este proceso se derrama simultáneamente el contenido vesicular a la hendidura sináptica. La fusión de ambas membranas es regulada mediante calcio que reacciona con la proteína sinaptotagmina. Junto con los demás cofactores la sinaptotagmina controla el estado de tres, así llamadas, proteínas de fusión, la SNAP-25, la sinaptobrevina 2 y la sintaxina 1A. Mientras que la sintaxina A1 y la sinaptobrevina 2 están integradas en la membrana del plasma y de la vesícula, el SNAP-25 está ligado sólo débilmente con la membrana del plasma. Al incrementarse la concentración de calcio intracelular, las tres proteínas ligan entre sí aproximándose las dos membranas y a continuación se fusionan. En las neuronas colinérgicas se libera acetilcolina, que causa las contracciones musculares, la secreción de sudor y otras reacciones mediadas de modo colinérgico.

25 Las tres proteínas de fusión precedentemente mencionadas son las moléculas objetivo (sustratos) de la cadena ligera (LC) de las neurotoxinas clostridianas, que son formadas por las bacterias *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* y *C. tetani*.

30 La bacteria anaeróbica, gram positiva *C. botulinum* produce siete diferentes serotipos de la neurotoxina clostridiana. Éstos se designan como las neurotoxinas Botulinum (BoNT/A a BoNT/G). De entre éstas son sobre todo BoNT/A y BoNT/B las que causan enfermedades neuroparalíticas en el hombre y el animal, que son designadas como botulismo. Las esporas de *C. botulinum* están presentes en la tierra, pero pueden desarrollarse también en conservas alimenticias no correctamente esterilizadas y cerradas de producción casera, que son el origen de muchos casos de botulismo.

35 La BoNT/A es la más activa de todas las sustancias biológicas conocidas. Tan solo 5-6 pg de BoNT/A purificada representan una MLD (dosis letal mínima). Una unidad (U) de BoNT/A es definida como MLD que provoca la muerte después de una inyección intraperitoneal la mitad de ratones Swiss Webster hembras con un peso de 18-20 g cada uno. Se caracterizaron siete BoNT inmunológicamente diferentes. Portan las designaciones BoNT/A, B, C1, D, E, F y G y pueden diferenciarse mediante neutralización con anticuerpos específicos de serotipo. Los diferentes serotipos de BoNT se diferencian en las especies de animales afectados en cuanto a la gravedad y la duración de la parálisis causada. Así, BoNT/A es 500 veces más activa, por ejemplo, en la rata en cuanto a la parálisis que BoNT/B. A esto se le añade que BoNT/B en primates, en una dosificación de 480 U/kg peso corporal, no resultó tóxica. La misma cantidad de BoNT/A corresponde a 12 veces la dosis letal de esta sustancia en los primates. Por otro lado, en los ratones, la duración de la parálisis después de inyección de BoNT/A es 10 veces más larga que después de inyección de BoNT/E.

40 Las BoNT son usadas para el tratamiento de disfunciones neuromusculares que se caracterizan por una hiperactividad en músculos del esqueleto, causada por nervios patológicamente hiperactivos. La BoNT/A es admitida por la U.S. Food and Drug Administration para el tratamiento de blefarospasmo, estrabismo, hiperhidrosis, arrugas y espasmos hemifaciales. Comparado con BoNT/A, los demás serotipos de BoNT poseen obviamente una actividad menor y una duración de actividad más corta. Los efectos clínicos de BoNT/A administrada de manera intramuscular periférica se presentan usualmente dentro de una semana. La duración de la supresión de síntomas por una sola inyección intramuscular de BoNT/A asciende normalmente a aproximadamente tres a seis meses.

45 Las neurotoxinas clostridianas hidrolizan específicamente diferentes proteínas del aparato de fusión. BoNT/A, C1 y E dividen SNAP-25, mientras que BoNT/B, D, F, G, así como la neurotoxina tetánica (TeNT) atacan la proteína de membrana, asociada con la vesícula (VAMP)2 – llamada también sinaptobrevina 2-. BoNT/C1 divide además la sintaxina 1A.

50 Las bacterias clostridias liberan las neurotoxinas como polipéptidos de una cadena con, respectivamente, 1251 a 1315 aminoácidos. A continuación, unas proteasas endógenas separan cada una de estas proteínas en un sitio determinado en 2 cadenas en cada caso ('muescado'), permaneciendo ambas cadenas, sin embargo, unidas entre sí mediante un puente disulfúrico. Estas proteínas de cadena doble son designadas como holotoxinas (véase Shone *et al.* (1985), Eur. J., Biochem. 151, 75-82). Las dos cadenas tienen diferentes funciones. Mientras la parte menor

representa la cadena ligera (light chain = LC), una endoproteasa dependiente de Zn^{2+} , la unidad mayor (heavy chain = HC) es el transportador de la cadena ligera. Mediante tratamiento de la HC con endopeptidasas se produjeron dos fragmentos de 50 kDa (véase Gimenez *et al.* (1993), J. Protein Chem. 12, 351-363). La mitad que termina en un amino (fragmento H_N) se integra a un valor pH bajo en membranas y trasloca la LC en el citosol de la célula neuronal. La mitad que termina en carboxilo (fragmento H_C) liga en polisialogangliósidos complejos que sólo existen en las membranas de células neuronales, y en receptores de proteínas identificados hasta la fecha sólo de manera parcial. Esto explica la gran neuroselectividad de las neurotoxinas clostridianas. Las estructuras cristalinas confirman que BoNT/A posee tres dominios que pueden explicar las tres etapas del mecanismo activo (véase Lacy *et al.* (1998), Nat. Struct. Biol. 5, 898-902). Estos datos permiten además concluir que dentro del fragmento H_C existen dos subunidades autónomas (subdominios) de 25 kDa en cada caso. La primera prueba de la existencia de los dos subdominios funcionales fueron proporcionadas con la mitad del extremo amino (H_{CN}) y la mitad del extremo carboxilo (H_{CC}) del fragmento H_C del TeNT, que fueron expresadas de manera recombinante y que permitieron descubrir que el dominio H_{CC} , pero no el dominio H_{CN} liga en neuronas (véase Herreros *et al.* (2000), Biochem. J. 347, 199-204). En un momento posterior se localizó un solo sitio de ligadura de gangliósido dentro del dominio H_{CC} de BoNT/A y B y se caracterizó (véase Rummel *et al.* (2004), Mol. Microbiol. 51, 631-643). El sitio para la ligadura de la sinaptotagmina I y II identificada como receptor de proteína para BoNT/B y G pudo limitarse también a la región de los dominios H_{CC} de BoNT/B y G (véase Rummel *et al.* (2004), Mol. Microbiol. 279, 30865-70). BoNT/A no muestra interacción de tipo alguno en células PC12 ni en estudios de ligadura de proteínas *in Vitro* con uno de los 13 miembros de la familia de proteínas de sinaptotagminas, conocidas en la actualidad.

La presente invención se basa, por lo tanto, en el objetivo que consiste en proporcionar unos medios y métodos para influir en la neurotoxicidad de BoNT/A.

El objetivo se logra proporcionando un polipéptido del dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína 2C de la vesícula sináptica de *Homo sapiens*, que liga el fragmento H_C de la neurotoxina A botulínica. La presente invención se relaciona además con el uso del polipéptido como antagonista para la reducción de la neurotoxicidad de BoNT/A como auxiliar para la identificación de sustancias que reducen la ligadura de BoNT/A con células neuronales y la comprobación de BoNT/A en diferentes matrices.

Mediante la presente invención se presenta a continuación la proteína de la vesícula sináptica 2C (SV2C) como receptor para BoNT/A.

Se pudo demostrar en sus ensayos que ni la sinaptofisina, sinaptoporina, sinaptogirina I & III, glicoproteína de la vesícula sináptica 2A (SV2A) ni la glicoproteína de la vesícula sináptica 2B (SV2B) funcionan como receptor de proteína para BoNT/A. Se pudo mostrar, sin embargo, una ligadura de BoNT/A con SV2C.

En un ensayo de ligando-receptor los dominios luminales de las proteínas sinaptofisina, sinaptoporina, sinaptogirina I & III, SV2A, SV2B y SV2C fueron subclonadas, expresadas de manera recombinante en *E. coli* como proteína de fusión de glutathion-S-transferasa (GST) y aisladas. Los fragmentos H_C de las siete BoNTs y de TeNT fueron expresadas de manera recombinante en *E. coli* y trasladadas *in Vitro* también con ^{35}S -metionina. La afinidad de los fragmentos H_C al dominio luminal de las proteínas de fusión GST precedentemente referidas fue determinada en ensayos de precipitación de glutathion-S-transferasa (GST). En presencia de derivados de GST-SV2C se analizó la inhibición de la neurotoxicidad de BoNT/A y BoNT/B en preparado de nervio-músculo del ratón (ensayo de semidiafragma = HDA), lo que representa el blanco fisiológico de la neurotoxina clostridiana.

En particular el dominio luminal de SV2C (aminoácidos 454-579) representa el fragmento para la interacción con BoNT/A. El péptido 125-mer aislado del dominio luminal puede interactuar sin gangliósido con el fragmento H_C de BoNT/A. Por la interacción del péptido SV2C con BoNT/A su sitio de liga de receptor es ocupado y la interacción con las SV2C incorporadas en la membrana es bloqueada. En detalle, la presente invención comprende un péptido 125-meros que comprende el dominio luminal de SV2C. Estos agentes pueden ser usados para la ligadura específica con el fragmento H_C de BoNT/A. Con ellos, el sitio de liga de receptor de BoNT/A es ocupado y su interacción fisiológica con las SV2C presentes en la membrana de plasma inhibida. Es posible, por lo tanto, evitar una intoxicación aguda con BoNT/A. Además, estos agentes pueden ser utilizados en ensayos de ligadura competitiva para la búsqueda de otras moléculas que se insertan también en el sitio de ligadura de receptor en el fragmento H_C de BoNT/A y actúan, por lo tanto, como antagonistas. Al marcar los agentes, por ejemplo, con fluoróforos, o secuencias especiales de detección, o una inmovilización de fases sólidos, es posible probar directa y específicamente la BoNT/A mediante ligadura de estos agentes en ella. Esto ofrece la opción de detectar BoNT/A específicamente en ambientes y matrices diferentes.

La SV2C es una glicoproteína de células neuronales y células neuroendócrinas (como artículo general: Janz, R. y Südhof T.C., Neuroscience 94 (1999), 1279-1290). Está constituida por 727 aminoácidos presentando un peso molecular de 86 kDa y está incorporada con 12 dominios de transmembrana en la membrana de la vesícula sináptica. El término amino que presenta una longitud de aproximadamente 160 aminoácidos y el término carboxilo corto de 11 aminoácidos se encuentran igual en el citosol como una sección de 90 aminoácidos entre los dominios de transmembrana 6 y 7. Intravesicular se encuentra sólo una región con longitud de 125 aminoácidos (aminoácidos 454-579) entre los dominios de transmembrana 7 y 8, el dominio intravesicular o luminal (LD) que contiene tres sitios

de N-glicosilación putativos y dos puentes de disulfida putativos. No se ha confirmado el papel de SV2C como transportador de iones respectivamente azúcar en la vesícula sináptica, pero una interacción que depende de la fosforilación del término amino de las tres isoformas SV2 con aquellas de la sinaptotagmina señala que mediante SV2 es influida la cantidad de sinaptotagmina libre para ligar con Ca^{+2} seguida por la iniciación de la exocitosis.

Mediante exocitosis la membrana de la vesícula sináptica fusiona con la membrana de plasma presináptica, por lo que las proteínas de vesícula sináptica se encuentran brevemente también en la membrana presináptica. Por ello, los dominios intravesiculares de las proteínas de vesícula sináptica son expuestas en forma extracelular. La ligadura del fragmento H_c de BoNT/A a los polisialogangliosidos complejos, presentes en gran cantidad, en la superficie de la célula neuronal no es suficiente para recibir solos la neurotoxina. Pero debido a la acumulación de las moléculas de BoNT/A en la superficie de la célula neuronal éstas pueden difundir lateralmente a la membrana y la probabilidad del encuentro productivo con el receptor de proteína, raras veces expuesto, es aumentada. En el caso de SV2C el dominio luminal con un tamaño de 125 aminoácidos es expuesto extracelularmente después de la fusión vesicular y está disponible, por lo tanto, como receptor de proteína para la BoNT/A. Como la neurotoxina se ubica bastante densamente encima de la membrana debido a la ligadura de gangliósido, resultan disponibles análogamente a la interacción con la BoNT/B/G sinaptotagmina preferentemente los aproximadamente 30 primeros y últimos aminoácidos del dominio luminal como receptor. Después de recibir el complejo de receptor-neurotoxina en el endosoma, éste es acidificado, el dominio de translocación se inserta en la membrana endosomal y trasloca la LC parcialmente desplegada en el citosol, en el que ésta disocia en la etapa final su sustrato específico. El ciclo de la formación y disociación de complejo de las proteínas de fusión es interrumpido y se inhibe, por lo tanto, la emisión de acetilcolina. En consecuencia los músculos estriados son paralizados y las glándulas sudoríparas detienen su secreción. La duración del efecto de los diferentes serotipos de BoNT es diferente y depende de la presencia de LC intactos en el citosol.

Que se bloquee preferentemente la transmisión colinérgica puede explicarse porque la HC penetra la periferia de la neurona. Las sinapsis centrales son protegidas por la barrera hematoencefálica que no puede ser superada por las proteínas.

A continuación se definen los conceptos, tal como deben ser entendidos en el contexto de la presente solicitud.

La neurotoxina botulínica A (BoNT/A) producida de manera recombinante de *E. coli*, que contiene, entre otros, la secuencia de aminoácidos idéntica a la neurotoxina botulinum A nativa, se comporta farmacológicamente de manera idéntica a la BoNT/A nativa y se denomina neurotoxina botulínica recombinante de tipo salvaje. El fragmento H_c de BoNT/A producido de manera recombinante posee las mismas secuencias de aminoácidos que el fragmento H_c nativo correspondiente y las mismas características de ligadura que la BoNT/A nativa. Las células nerviosas mencionadas en este contexto son neuronas motoras colinérgicas. Preferentemente, la BoNT/A liga específicamente las moléculas asociadas a la membrana de plasma, proteína de transmembrana, proteínas de vesícula sináptica, una proteína de la familia de SV2, preferentemente SV2C, preferentemente al dominio luminal de SV2C. La ligadura se determina preferentemente *in Vvtro*. Más preferentemente, la determinación se realiza mediante el uso de un ensayo de precipitación GST, que se explica en detalle en los ejemplares.

La secuencia de SV2C resulta de acceso público en los bancos de datos. La ID de secuencia para SV2C de *homo sapiens* es designada, entre otras, GenBank NP_055794, para SV2C de *Rattus novegicus* entre otras GenBank NP_113781, para SV2C de *Mus musculus* entre otras GenBank XP_127490.

La expresión "polipéptido" hace referencia en la presente memoria a polímeros de aminoácidos constituidos por por lo menos dos unidades de monómeros. Los monómeros pueden ser, en este caso, aminoácidos naturales o no naturales. Preferentemente, un péptido posee por lo menos 10 monómeros de aminoácidos. Los aminoácidos individuales pueden estar modificados en este caso. Las modificaciones pueden ser de origen natural (por ejemplo, postraslacionales) o ser introducidas sintéticamente como, por ejemplo, glicosilación, di- y oligomerización, y modificaciones de los restos cis.

"% de identidad" significa % de identidad al nivel de las proteínas, determinada mediante métodos conocidos, por ejemplo, comparaciones de secuencia por computadora (BLAST) Basic Local Alignment Search Tool, S.F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410. Los métodos preferidos para determinar la identidad producen en primer lugar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. En la medida que los pares de secuencias se comparan entre sí, también es posible usar los programas GAP (Devereux, J. et al., Nucleic Acids Res. 12812) =: 387(1987) y BestFit. En general es posible usar parámetros estándares, preferentemente los siguientes:

Algoritmo: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970)

Martiz comparativa: BLOSUM 62 de Henikoff y Henikoff, PNAS USA 89(1992), 10915-10919

Índice de intersticio (Gap Penalty): 12

Índice de longitud de intersticio (Gap Length Penalty): 4

La expresión "anticuerpo" incluye los anticuerpos clásicos, anticuerpos de cadena simple y fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos preferidos son en la presente memoria F(ab)₂ y F(ab).

5 La expresión "composición" comprende, además de mezclas, también proteínas de fusión. El polipéptido contenido en la composición puede estar presente en forma de un conjugado. Resultan preferidos en la presente memoria los conjugados con colorantes, partículas de hierro, epitopos como Flag o HA-Tag, péptidos de unión cruzada, de afinidad o isótopos radioactivos.

10 Según otra forma de realización preferida, la secuencia de aminoácidos del polipéptido se diferencia de la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *H. sapiens* por la adición, sustitución, eliminación, inserción y/o inversión de por lo menos un aminoácido, preferentemente de no más de 5 aminoácidos, particularmente de no más de 1 aminoácido. La adición, sustitución, eliminación, inserción o inversión pueden ser realizadas en este caso de manera en sí conocida.

15 La presente invención proporciona además unos ácidos nucleicos que codifican el polipéptido inventivo. Se ofrecen inventivamente también unos vectores que contienen el ácido nucleico inventivo y para la replicación y expresión opcional bajo el control de un promotor apropiado en una célula huésped apropiada. Según otro aspecto de la presente invención está previsto un procedimiento para la producción del polipéptido inventivo que comprende la expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica el polipéptido en una célula huésped apropiada y eventualmente aislar del polipéptido producido de una manera en sí conocida.

20 El ácido nucleico codificante puede ser en la presente memoria ARN, ADN o sus mezclas. El ácido nucleico puede estar modificado, además, en cuanto a su resistencia a la nucleasa como, por ejemplo, mediante la inserción de ligaduras de fosforotioato. El ácido nucleico puede ser producido de un ácido nucleico primitivo donde el ácido nucleico primitivo resulta accesible por ejemplo mediante clonación de bancos de genoma o de ADNc. El ácido nucleico puede ser producido además mediante síntesis de fases sólidas. Resultarán evidentes para el experto en la materia los métodos apropiados. Siempre que se parte de un ácido nucleico primitivo es posible realizar por ejemplo por mutagénesis local un cambio deliberado que produce en el plano del aminoácido por lo menos una adición, inserción, eliminación y/o sustitución. El ácido nucleico es unido entonces de manera operativa con un promotor apropiado. Resultan evidentes para el experto la materia los promotores apropiados para la expresión en sistemas de expresión conocidos. La selección del promotor depende en la presente memoria del sistema de expresión usado para la expresión. En general resultan preferidos los promotores constitutivos, pero también es posible usar promotores inducibles. El constructo así preparado comprende por lo menos una parte de un vector, en particular elementos regulativos, donde el vector es seleccionado, a título de ejemplo, de derivados λ , adenovirus, baculovirus, vaccina virus, virus SS40 y retrovirus. El vector es, preferentemente, capaz de expresar el ácido nucleico en una célula huésped dada.

25 La invención proporciona además células huésped que contienen el vector y que son apropiadas para la expresión del vector. Se conocen en el estado de la técnica múltiples sistemas de expresión procariontes y eucariontes en los que las células huésped están seleccionadas, a título de ejemplo, de células procariontes como *E. coli* o *B. subtilis*, de células eucariontes como *S. cerevisiae* y *P. pastoris* o también de células eucariontes superiores como células de insectos o células de mamífero.

45 El péptido, es decir, polipéptido puede ser obtenido también directamente mediante síntesis o condensación de fragmentos. El experto en la materia conoce los procedimientos apropiados.

El péptido, es decir, polipéptido es purificado a continuación. Para ello se usan métodos conocidos por el experto en la materia, como por ejemplo métodos de cromatografía o electrofóresis.

50 Según otro aspecto de la presente invención está prevista una composición que comprende por lo menos un polipéptido inventivo. La composición puede estar conjugada en la presente memoria, por ejemplo, con moléculas de colorante o vehículos.

55 Según otro aspecto de la presente invención, está previsto un anticuerpo o un fragmento de éste que liga con la secuencia de aminoácido del dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *homo sapiens*. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos mediante métodos conocidos por el experto en la materia mediante inmunización de animales de ensayos como ratones y el aislamiento posterior y la selección de hibridomas.

60 Preferentemente el anticuerpo puede bloquear la ligadura de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C en la neurotoxina botulínica A. Esto puede probarse en ensayos competitivos conocidos como ensayos de radioinmunología o ELISA.

65 Según otro aspecto de la presente invención está prevista una composición farmacéutica que comprende por lo menos un polipéptido inventivo y/o por lo menos un anticuerpo inventivo. La composición farmacéutica puede

contener opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, un diluyente y/o aditivo. La composición farmacéutica es apropiada para la administración oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular o tópica.

5 La composición farmacéutica es administrada para el tratamiento del botulismo, después de una sobredosis en un tratamiento terapéutico o una aplicación cosmética de BoNT/A, intoxicación o para la prevención.

10 Según otro aspecto de la presente invención está previsto un método para la reducción de la neurotoxicidad de BoNT/A en mamíferos, comprendiendo la administración de un principio activo al mamífero, donde el principio activo reduce al menos en 10%, preferentemente en al menos 50%, en particular en al menos 80% la liga de BoNT/A al dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *homo sapiens*.

El principio activo puede determinarse mediante el método de selección descrito a continuación.

15 Preferentemente es administrado al mamífero un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos idéntica al dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C (SV2C) de *homo sapiens* y que reduce la ligadura de BoNT/A en SV2C.

20 También preferentemente se administra al mamífero un anticuerpo que reduce la ligadura de BoNT/A al dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *homo sapiens*.

Además, preferentemente es administrado un principio activo al mamífero que reduce la expresión del dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *homo sapiens*. El principio activo puede ser en la presente memoria una molécula antisentido. Resultan evidentes para el experto en la materia los procedimientos para la producción de moléculas antisentido.

25 El procedimiento puede usarse para la reducción de la neurotoxicidad de BoNT/A en botulismo, después de sobredosis en tratamiento terapéutico o aplicación cosmética de BoNT/A, intoxicación o para la prevención.

30 El mamífero es preferentemente un *homo sapiens*.

Según otro aspecto de la presente invención está previsto un procedimiento para la identificación de un principio activo que reduce la ligadura de BoNT/A en el dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *homo sapiens*, comprendiendo:

35 (a) poner en contacto un principio activo con una solución de BoNT/A y GST-SV2V(454-579)

(b) determinar la cantidad de GST-SV2V(454-579) ligada

40 (c) seleccionar el principio activo que reduce la cantidad de BoNT/A ligada a GST-SV2V(454-579).

La selección puede realizarse en la presente memoria por ejemplo mediante bibliotecas químicas. Se consideran además bancos de moléculas de ADN y/o ARN.

45 Preferentemente, el dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *homo sapiens* está insertado en una membrana de plasma de una célula. Las células apropiadas para ello son las células neuroendocrinales como PC12, células de neuroblastoma como 2A, y células de hibridoma de tejido cerebral embrional como NT2.

50 Resulta preferido además que la ligadura reducida de BoNT/A a la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *homo sapiens* por la presencia del principio activo es probada mediante la neurotoxicidad disminuida de la BoNT/A en el ensayo de semidiafragma del ratón.

55 Según otro aspecto de la presente invención se ofrece el principio activo obtenible mediante el procedimiento descrito anteriormente.

Según otro aspecto de la presente invención está previsto un procedimiento para la detección de BoNT/A de *Clostridium botulinum* en una muestra arbitraria, que comprende:

60 (a) inmovilizar un polipéptido en una fase sólida donde el polipéptido presenta una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 70% al dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2c de *Homo sapiens* y que disminuye la ligadura de BoNT/A con SV2C;

(b) poner en contacto el polipéptido inmovilizado con una muestra en condiciones que permiten la ligadura de BoNT/A con el polipéptido;

65 (c) eluir el complejo de BoNT/A-polipéptido; y

(d) detectar el complejo o sus componentes.

La inmovilización puede realizarse, a título de ejemplo, mediante acoplamiento BrCN del polipéptido en materias, como la sefarosa, conocidas para la cromatografía. Las condiciones que permiten la ligadura de BoNT/A al polipéptido pueden determinarse mediante ensayos rutinarios. Las condiciones deben seleccionarse de manera tal que ninguna de las partes de la unión se desnaturalice. La elusión, a título de ejemplo, puede ser realizada por competición o cambio de las condiciones de pH y/o de sal. El complejo o sus componentes pueden ser escindidos, a título de ejemplo, mediante SDS-PAGE.

El siguiente ejemplo 9 es proporcionado a título ilustrativo y no limitativo.

Figuras 1A a 1C: El fragmento H_c de BoNT/A interactúa con SV2C. (Figura 1A) Representación esquemática de las glicoproteínas de la vesícula sináptica. (Figuras 1B, 1C) Proteínas de fusión GST inmovilizadas en bolitas de sefarosa GT son incubadas con fragmentos H_c de BoNT recombinantes (B) o marcadas con ³⁵S en la presencia de gangliósidos. Los fragmentos H_c ligados en la fase sólida son comprobados mediante SDS-PAGE y tinción azul Coomassie o autorradiografía.

Figura 2: el fragmento H_c de BoNT/A liga con la región intravesicular adyacente al dominio 8 de transmembrana de SV2C. Las proteínas de fusión GST inmovilizadas en las bolitas de sefarosa GT son incubadas con fragmentos H_c recombinantes de BoNT en presencia de gangliósidos. Los fragmentos H_c ligados en la fase sólida son comprobados mediante SDS-PAGE y tinción azul Coomassie o química inmunológica.

Materiales y métodos

Construcción de plásmidos y producción de proteínas recombinantes

Fueron producidos unos plásmidos para la expresión de *E. coli* de longitud completa, respectivamente, fragmentos H_c recombinantes de BoNT/A-G y TeNT con StreTag en el extremo de carboxilo para purificar la afinidad respectivamente para la transcripción/traslación *in Vitro* con ³⁵S-metionina como vector primitivo mediante procedimientos de PCR con cebadores apropiados, ADNc que codifica BoNT/A-G y TeNT y el vector de expresión pQe3 (Qiagen AG) respectivamente pSP72 (Promega).

Las partes de ADNc que codifican los segmentos intravesiculares de las diversas proteínas de la vesícula sináptica fueron clonadas en el vector pGEX-4T3 usando los oligonucleótidos correspondientes y un banco ADNc de ratón embrional (GST-Syo-157-218, GST-Syg-I-45-98) o de plásmidos con ADNc correspondiente como modelo: GST-Syg-I-127-169 (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH; www.rzpd.de; ID IRAKp961C072Q), GST-SV2A-468-618 (RZPD-ID IRAKp961024100Q), GST-Syo-22-103 (rata; T. C. Südhof, Dallas), GST-Syg-III-46-88 y GST-Syg-III-128-168 (ratón; T. C. Südhof, Dallas), GST-SV2B-413-560 (rata; S. Bajjalieh, Seattle), y GST-SV2C-454-603 (rata; R. Janz, Houston). Un plásmido que codifica el híbrido GST-SV2C/A que comprende los aminoácidos 454-553 de SV2C y 568-594 de SV2A fue generado también con los oligonucleótidos correspondientes mediante PCR. Las secuencias de ácidos nucleicos de todos los plásmidos fueron confirmadas mediante secuenciación de ADN. Los fragmentos H_c recombinantes fueron producidos en la cepa M15 de *E. coli* [pRep4] (Qiagen) durante una inducción de diez horas a temperatura ambiente y purificados en una matriz StrepTactin (IBA GmbH) según las recomendaciones del fabricante. Las proteínas de fusión GST obtenidas de *E. coli* BL21 fueron aisladas con la ayuda de glutation inmovilizado en bolitas de sefarosa. Las fracciones que contenían la proteína deseable fueron combinadas y dializadas contra tampón de Tris-NaCl-triton ((20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100, pH 7.2) respectivamente tampón Krebs-Ringer (18 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM K₂HPO₄, 25 mM NaHCO₃, 2,5 mM CaCl₂, 1,1 mM Glucosa).

Los fragmentos de H_c marcadas con ³⁵S fueron sintetizados *in vitro* de derivados de pSP72 que fueron linealizados corriente abajo mediante el codón de la terminación de carboxilo de la neurotoxina usando el sistema de lisado de reticulocitos (Promega, Mannheim) y L-³⁵S-metionina (840 kBq, >37 TBq/mmol; Amersham Biosciences) en una preparación de 2 µl.

Ensayo de precipitación GST

Las proteínas de fusión GST (0.15 nmol, en cada caso) que estaban inmovilizadas en bolitas de sefarosa GT fueron incubadas con fragmentos H_c (0.1 nmol) en ausencia o presencia de una mezcla de gangliósido de cerebro vacuno (18 % GMI, 55 % GD1a, 10 % GT1b, 2% otros gangliósidos; Calbiochem; 20 µg en cada caso) en un volumen total de 100 µl de tampón de Tris-NaCl-triton durante 3h a 4 °C. Las bolitas fueron coleccionadas mediante centrifugación, el sobrenadante eliminado y las bolitas separadas fueron lavadas tres veces en cada caso con 160 µl del mismo tampón. Las fracciones de bolitas lavadas fueron hervidas en tampón de muestras SDS y analizadas junto con las fracciones de sobrenadante por SDS-PAGE y tinción azul Coomassie, autorradiografía o por inmunotransferencia.

Ensayo de semidiafragma de ratón (HDA)

El ensayo de semidiafragma de ratón fue realizado según se describe en Habermann E, Dreyer F, Gigalke H (1980) Tetanus toxin blocks the neuromuscular transmission in vitro like botulinum A toxin. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 31 1 : 33-40. Se estimuló el *Nervus phrenicus* mediante un Hertz y se registró la amplitud de contracción continuamente mediante un medidor de fuerza y el paquete de programa en línea VitdoDat (FMI GmbH, Seeheim-Ober Beerbach). Después de añadir las BoNT se midió el tiempo en el cual la amplitud de contracción disminuye a 50% del valor inicial (semiperíodo paralítico). La longitud completa del tipo salvaje scBoNT/A fue medida por lo menos de forma triple en las siguientes concentraciones finales: 24.3 pM, 72.8 pM, 223 pM y 728 pM. A esta relación de concentración-efecto se le aproximó una función de potencia:

$y(A)=225,87x^{-0.2573}$ ($R^2=0,9627$). De la misma manera se preparó la relación de concentración-efecto $y(B)=523,59x^{-0.297}$ ($R^2=0,983$) para la longitud completa del tipo salvaje scBoNT/B con las siguientes concentraciones finales: 100 pM, 300 pM, 1000 pM y 3000 pM. Para los ensayos de inhibición scBoNT/A (223 pM) y scBoNT/B fueron mezcladas o bien con GST-SV2C-454-579 o GST-S V2-C/A (concentración final 4,7 o 11,2 μ M), incubadas durante 15 min a 20° C y HDA adicionado. Mediante las funciones de potencia se transformaron los semiperíodos paralíticos en parte extendidos a dosis de neurotoxina correspondientemente más bajas y se expresó como % de toxicidad.

Resultados

Los dominios luminales y los dominios de transmembrana en el extremo de carboxilo de las proteínas sinaptofisina, sinaptoporina, sinaptogirina I & III, sinaptotagmina II, SV2A, SV2B y SV2C fueron subclonados y expresados de modo recombinante como proteína de fusión de glutation-S-transferasa (GST) en *E. coli* y aislados. Los fragmentos H_c de las siete BoNTs y de la neurotoxina del tétano (TeNT) fueron expresadas tanto de manera recombinante en *E. coli* como también trasladadas *in vitro* con ³⁵S-metiotina. La afinidad de los fragmentos H_c a los dominios luminales de las proteínas de fusión GST anteriores fue determinada en ensayos de precipitación de glutation-S-transferasa (GST). Para ello se incubó la respectiva proteína de fusión GST con diferentes fragmentos H_c y se realizó una separación de fase. El fragmento H_c libre de BoNT permaneció en el sobrenadante separado, mientras que el fragmento H_c ligado pudo ser detectado en la fase sólida junto con la proteína de fusión GST. La sustitución de los fragmentos H_c recombinantes por fragmentos H_c marcados con ³⁵S, así como de BoNT/A de longitud completa proporcionó los mismos resultados en los ensayos de precipitación de GST en comparación con el fragmento H_c de BoNT/A.

Tabla 1: el dominio intravesicular de SV2C bloquea la actividad de BoNT/A en el HDA.

BoNT	BoNT [pM]	Inhibidora	Inhibidor [PM]	Semiperiodo paral. t1/2 b [min]	Toxicidad contra BoNT puro [%]	Inhibición [%]
BoNT/A	223	Ninguno		50 ± 7	100	
BoNT/A	223	SV2C-454-579	4,7	72 ± 3	25,1 ± 1,0	75
BoNT/A	223	SV2C-454-579	11,2	83 ± 8	14,6 ± 1,5	85
BoNT/A	1000	ninguno		57 ± 6	100	
BoNT/A	1000	SV2C-454-579	4,7	56 ± 13	105,1 ± 24,8	0
BoNT/A	1000	SV2C-454-579	11,2	60 ± 7	86,6 ± 9,7	14
BoNT/A	223	SV2-C/A	4,7	51 ± 4	100,0 ± 1,0	0
BoNT/A	223	SV2-C/A	11.2	51 ± 5	100,0 ± 1,0	0

^a los inhibidores fueron usados como proteínas de fusión GST.

^b valores promedio ± S-D. (n = 3-9).

^c tipo silvestre de scBoNT/A de longitud completa fue medido por lo menos en forma triple con las siguientes concentraciones finales: 24.3 pM, 72.8 pM, 223 pM y 728 pM. A esta relación de concentración-efecto se le aproximó una función de potencia: $y(A)=225,87x^{-0.2573}$ ($R^2=0,9627$). De la misma manera se preparó la relación de concentración-efecto $y(B)=523,59x^{-0.297}$ ($R^2=0,83$) para la longitud completa del tipo silvestre scBoNT/B con las siguientes concentraciones finales: 100 pM, 300 pM, 1000 pM y 3000 pM.

Se encontró de esta manera que ninguno de los ocho fragmentos H_c de BoNT/A, B, C1, D, E, F, G y TeNT liga con el dominio luminal de sinaptofisina, sinaptoporina, sinaptogirina I & III, SV2A y SV2B independientemente de la presencia de gangliósidos complejos. Según es conocido, los fragmentos de BoNT/B y G ligan con el dominio luminal de sinaptotagmina II, pero no el fragmento H_c de BoNT/A. Sólo el fragmento H_c recombinante, el marcado con ³⁵S y la BoNT/A de longitud completa ligan específicamente con el dominio luminal fusionado con SV2C

independientemente de la presencia de gangliósidos complejos. Todos los demás fragmentos H_c no muestran interacción con SV2C (figuras 1A a 1C).

- 5 Se mostró además que la ligadura del fragmento H_c de BoNT/A con el dominio luminal de SV2C es más débil después de acortar el dominio 8 de transmembrana (GST-SV2C 454-579) (figura 2). Una eliminación en el extremo de carboxilo de 20 aminoácidos (GST-SV2C 454-553) y una reducción adicional produjeron la terminación de la acción recíproca con BoNT/A. También las eliminaciones en el extremo de amino impide la liga de BoNT/A con las proteínas de fusión GST-SV2C.
- 10 Las proteínas de fusión GST de las SV2A y SV2B homólogas a SV2C tampoco mostraron ligadura con BoNT/A con o sin dominio de transmembrana del extremo de carboxilo. La generación de un híbrido constituido por GST, los aminoácidos 454-554 de SV2C y los aminoácidos 568-594 de Sv2A tampoco presentó ningún tipo de interacción con el fragmento H_c de BoNT/A.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido aislado del dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *Homo sapiens*, ligando el polipéptido aislado el fragmento H_c de la neurotoxina botulínica A.
- 10 2. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido se diferencia de la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *H. sapiens* por la adición, sustitución, eliminación, inserción y/o inversión de por lo menos un aminoácido, pero no más de 5 aminoácidos, particularmente de no más de 1 aminoácido.
- 15 3. Ácido nucleico que codifica un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 2.
4. Vector que contiene un ácido nucleico según la reivindicación 3 y además un promotor apropiado para el control de la expresión, estando el ácido nucleico que codifica el polipéptido bajo el control del promotor.
- 20 5. Célula huésped que contiene un ácido nucleico según la reivindicación 3 y/o un vector según la reivindicación 4.
6. Procedimiento para la producción del polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende la expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica el polipéptido según la reivindicación 3 y/o de un vector según la reivindicación 4 en una célula huésped apropiada y opcionalmente aislar el polipéptido producido de manera en sí conocida.
- 25 7. Composición que comprende por lo menos un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 2.
- 30 8. Anticuerpo para la reducción de la neurotoxicidad de BoNT/A en mamíferos, que reduce la ligadura de BoNT/A con la secuencia de aminoácidos del dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *Homo sapiens* por lo menos 10%, preferentemente por lo menos 50%, en particular por lo menos 80%, ligándose el anticuerpo a la secuencia de aminoácidos del dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la SV2C de *Homo sapiens*.
- 35 9. Anticuerpo según la reivindicación 8, para la reducción de la neurotoxicidad de BoNT/A en el botulismo, después de una sobredosis en un tratamiento terapéutico o aplicación cosmética de BoNT/A, intoxicación o para la prevención.
- 40 10. Anticuerpo según la reivindicación 8 ó 9, siendo el mamífero el *Homo sapiens*.
- 45 11. Molécula antisentido para la reducción de la neurotoxicidad de BoNT/A en mamíferos, que reduce la expresión del dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *Homo sapiens*.
- 50 12. Molécula antisentido según la reivindicación 11, para la reducción de la neurotoxicidad de BoNT/A en el botulismo, después de una sobredosis en un tratamiento terapéutico o una aplicación cosmética de BoNT/A, una intoxicación o para la prevención.
- 55 13. Molécula antisentido según una de las reivindicaciones 11 a 12, siendo el mamífero un *Homo sapiens*.
- 60 14. Procedimiento para la identificación de un anticuerpo o una molécula antisentido que reduce la ligadura de BoNT/A con el dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *Homo sapiens*, que comprende:
 - (a) poner en contacto un anticuerpo o una molécula antisentido con una solución de BoNT/A y GST-SV2V(454-579);
 - (b) determinar la cantidad de GST-SV2V(454-579) ligada;
 - (c) seleccionar el anticuerpo o la molécula antisentido que reduce la cantidad de BoNT/A ligada a GST-SV2V(454-579).
15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *Homo sapiens* está alojado en una membrana de plasma de una célula.
16. Procedimiento según la reivindicación 14 o 15, en el que la ligadura, reducida por la presencia del anticuerpo o de la molécula antisentido, de BoNT/A con la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *Homo sapiens* es detectada por la neurotoxicidad reducida del BoNT/A en el ensayo de semidiafragma de ratón.

17. Composición farmacéutica que comprende por lo menos un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 2 y/o por lo menos un anticuerpo, ligándose el anticuerpo a la secuencia de aminoácido del dominio luminal (454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *Homo sapiens*.

5 18. Procedimiento para la detección de BoNT/A de *Clostridium botulinum* en una muestra cualquiera que comprende:

10 (a) inmovilizar un polipéptido en una fase sólida, presentando el polipéptido una secuencia de aminoácidos idéntica por lo menos en un 70% al dominio luminal (aminoácidos 454-579) de la glicoproteína de la vesícula sináptica 2C de *Homo sapiens* y que disminuye la ligadura de BoNT/A con SV2C;

(b) poner en contacto el polipéptido inmovilizado con una muestra en condiciones que permiten la ligadura de BoNT/A con el polipéptido;

15 (c) eluir el complejo de BoNT/A-polipéptido; y

(d) detectar el complejo o sus componentes.

Figura 1

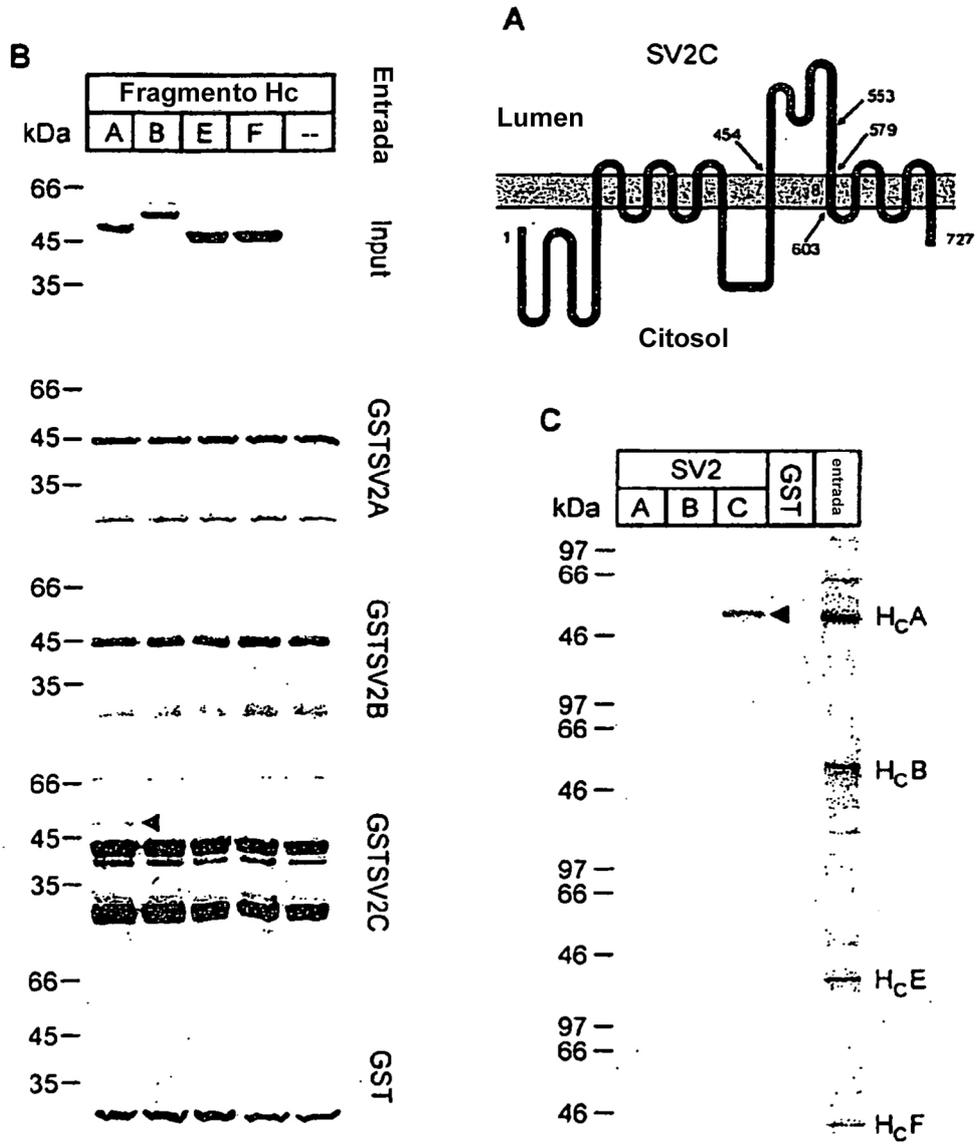


Figura 2

