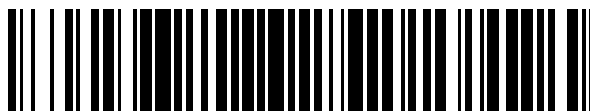


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 279**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05786305 .2**
96 Fecha de presentación: **06.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1786832**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2007**

54 Título: **Proteína transportadora para la introducción de compuestos químicos en neuronas**

30 Prioridad:
06.09.2004 DE 102004043009

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2012

73 Titular/es:
TOXOGEN GMBH (100.0%)
Feodor-Lynen-Str. 35
30625 Hannover, DE

72 Inventor/es:
RUMMEL, ANDREAS

74 Agente/Representante:
CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 390 279 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

Proteína transportadora para la introducción de compuestos químicos en neuronas.

5 La presente invención se refiere a una proteína transportadora definida según las reivindicaciones que se proporcionan a continuación, que se une a las neuronas, que es absorbida por endocitosis mediada por el receptor y que es traslocada del compartimiento endosomal ácido al citosol de las neuronas. Esta proteína se usa como vehículo que trasloca otras sustancias químicas (por ejemplo, proteasas) que no pueden penetrar por la membrana del plasma al citosol de neuronas. La presente invención se refiere al uso de una proteína transportadora para inhibir la liberación de neurotransmisores.

15 Las neuronas liberan las sustancias de transmisores a través de la exocitosis. Por exocitosis se entiende la fusión de la membrana de vesículas intracelulares con la membrana del plasma. Durante este proceso, se eyecta simultáneamente el contenido vesicular en el intersticio sináptico. La fusión de ambas membranas se regula mediante el calcio que reacciona con la proteína sinaptotagmina. Junto con otros factores, la sinaptotagmina controla el estado de tres proteínas de fusión, la SNAP-25, la sinaptobrevina 2 y la sintaxina 1A. Mientras la sintaxina 1A y la sinaptobrevina 2 están integradas en la membrana del plasma respectivamente de la vesícula, la SNAP-25 está unida sólo débilmente con la membrana de plasma. Cuando la concentración de calcio intracelular aumenta, las tres proteínas se unen entre sí, acercándose ambas membranas y finalmente se fusionan entre sí. En las neuronas colinérgicas, se libera acetilcolina que causa contracciones musculares, secreción de sudor y otras reacciones mediadas colinérgicamente.

20 Las proteínas de fusión mencionadas anteriormente son moléculas blanco (sustratos) de las cadenas ligeras de las neurotoxinas de clostridia que son formadas por la bacteria *Clostridium botulinum*.

25 La bacteria *Clostridium botulinum* anaeróbica, gram positiva produce siete diferentes tipos de neurotoxinas proteínicas, que se denominan neurotoxinas Botulinus (BoNT/A a BoNT/G). De éstas, en particular BoNT/A y BNT/B causan enfermedades neuroparalíticas en el ser humano y en animales, que se denominan botulismo. Las esporas de *Clostridium botulinum* se encuentran en la tierra, pero pueden desarrollarse en conservas alimenticias esterilizadas y cerradas inadecuadamente de producción casera, que son consideradas la causa de muchos casos de botulismo.

35 BoNT/A es la más letal de todas las sustancias biológicas conocidas. Sólo aproximadamente 5-6 pg de BoNT/A purificada es una MLD (Multiple Low Dose, dosis baja múltiple, por sus siglas en inglés). Una unidad (inglés Unit, U) de BoNT es definida como la MLD que después de la inyección intraperitoneal mata a la mitad de los ratones Swiss Webster hembra con un peso de 18-20 g, en cada caso. Se caracterizaron siete BoNT inmunológicamente distintas. Se les designa BoNT/A, B, C₁, D, E, F y G y se pueden distinguir por la neutralización con el serotipo de anticuerpos específicos. Los diferentes serotipos se diferencian en las especies de animales concernientes con relación a la gravedad y la duración de la parálisis causada. Así, en el caso de la rata, por ejemplo, BoNT/A es 500 veces más activo, en cuanto a una parálisis, que BoNT/B. En adición a esto, la NoNT/B ha mostrado ser no tóxica en primates en dosis de 480 U/kg peso corporal. La misma cantidad de BoNT/A corresponde a 12 veces la dosis letal (LD) de esta sustancia en primates. Por otro lado, en el caso de ratones, la duración de la parálisis después de inyección de BoNT/A es 10 veces mayor que después de la inyección de BoNT/E.

45 Las BoNT se han empleado clínicamente para el tratamiento de disfunciones neuromusculares que se caracterizan por la hiperactividad en los músculos del esqueleto, causada por nervios periféricos patológicamente superactivos. La BoNT/A es autorizada por la *US Food and Drug Administration* para el tratamiento de blefarospasmo, estrabismo y espasmos hemifaciales. En comparación con la BoNT/A, los demás serotipos de BoNT poseen aparentemente una actividad menor y una duración menor de actividad. Los efectos clínicos de la BoNT/A administrada en forma intramuscular periférica se presentan usualmente dentro de una semana. La duración de la inhibición de síntomas por una sola inyección intramuscular de BoNT/A se prolonga normalmente unos 3 meses.

50 Las neurotoxinas de clostridia hidrolizan diferentes proteínas específicas del aparato de fusión. BoNT/A, C₁ y E desintegran la SNAP-25, mientras que BoNT/B, D, F, G, así como la neurotoxina del tétano (TeNT) atacan la proteína de membrana asociada con la vesícula (VAMP)2, denominada también sinaptobrevina 2. BoNT/C₁ desintegra además la sintaxina 1A.

60 Las bacterias de clostridia liberan las neurotoxinas como polipéptidos de una sola cadena con 1251 a 1315 aminoácidos en cada caso. A continuación, unas proteasas endógenas separan cada una de estas proteínas en un sitio determinado en 2 cadenas en cada caso ('nicking'), permaneciendo unidas, sin embargo, ambas cadenas entre sí mediante un puente de bisulfuro. Estas proteínas de dos cadenas se denominan holotoxinas (Cf. Shone et al (1985), Eur J Biochem 151, 75-82). Las dos cadenas tienen diferentes funciones. Mientras la parte menor, la cadena ligera (light chain = LC), representa una endoproteasa dependiente de Zn²⁺, la unidad mayor (heavy chain = HC) es el transportador de la cadena ligera. Mediante el tratamiento de la HC con endopeptidasas se produjeron dos fragmentos kDa (Cf. Gimenez et al. (1993), J Protein Chem 12, 351-363). La mitad amino terminal (fragmento H_N) se integra a un valor pH bajo en las membranas y ayuda a la LC a penetrar en el citosol de la neurona. La mitad carboxi

terminal (fragmento H_C) se une con los polisialogangliósidos que están presentes sólo en las membranas de neuronas y en receptores de proteínas hasta ahora no identificadas (Halpern *et al.* (1993), *Curr Top Microbiol Immunol* 195, 221-241). Esto explica la neuroselectividad alta de las neurotoxinas de clostridia. Las estructuras de cristales confirman que la BoNT/A dispone de tres dominios que pueden asociarse con las tres etapas del mecanismo de actividad (Cf. Lacy *et al.* (1998), *Nat Struct Bio* 5, 898-902). Estos datos permiten además concluir que existen dos unidades subordinadas autónomas (subdominios) dentro del fragmento H_C con 25 kDa cada una. La primera prueba de la existencia de los dos subdominios funcionales se logró con la mitad amino terminal (H_{CN}) y la mitad carboxi terminal (H_{CC}) del fragmento H_C del TeNT que fueron expresados en forma recombinante y que permitieron apreciar que el dominio H_{CC} ciertamente se une con las neuronas, pero no el dominio H_{CN} (Cf. Herrero *et al.* (2000), *Biochem J* 347, 199-204). El sitio de adhesión del receptor de proteína de la sinaptotagmina se descubrió dentro de los dominios H_{CC} de BoNT/B y G, lo que mostró su funcionalidad separada (Cf. Rummel *et al.* (2004), *J. Biol Chem* 279, 30865-70).

En condiciones fisiológicas, la HC se une con los gangliósidos neuronales, es captada mediante endocitosis mediada por el receptor en el interior de la célula y llega al ciclo de vesícula natural a través del compartimiento endosomal. En el ambiente ácido de los primeros endosomas, la H_N, la mitad amino terminal de HC, penetra en la membrana de la vesícula y forma un poro. Cada sustancia (X) que está unida con HC a través de un puente de bisulfuro, será separada de la HC por los sistemas de redox intracelulares que obtienen acceso al puente de bisulfuro y lo reducen. X aparecerá finalmente en el citosol.

En el caso de las neurotoxinas de clostridia, la HC es el portador de una LC que separa en la etapa final su sustrato específico en el citosol. El ciclo de la formación y disociación de complejo de las proteínas de fusión es interrumpido y se inhibe así la liberación de acetilcolina. Como consecuencia de ello, se paralizan los músculos estriados y las glándulas sudoríparas paran su secreción. La duración del efecto de los serotipos individuales de BoNT es variable y depende de la presencia de la LC intacta en el citosol. Puesto que todas las neuronas poseen receptores para las neurotoxinas de clostridia, no es sólo la liberación de acetilcolina, la que puede verse afectada, sino potencialmente también la liberación de la sustancia P, de noradrenalina, de GABA, glicina, endorfina y de otros transmisores y hormonas.

El hecho de que se bloquee preferentemente la transmisión colinérgica puede explicarse porque la HC penetra en la neurona en la periferia. Las sinapsis centrales son protegidas por la barrera sangre-cerebro que las proteínas no pueden superar.

La HC posee una afinidad alta a las neuronas periféricas que es mediada principalmente por la interacción con unos polisialogangliósidos complejos, estos son unos glicolípidos que consisten en más de un ácido siálico- (Cf. Halpern *et al.* (1995), *Curr Top Microbiol Immunol* 195, 221-41). Por lo tanto, las LC enlazadas con ella alcanzan sólo este tipo de células y se activan sólo en estas células. BoNT/A y B se unen sólo con una molécula de gangliósido GT1b, en cada caso.

Con la finalidad de estudiar el papel de los aminoácidos que construyen el receptáculo de unión, se produce según la invención un fragmento de H_C recombinante. Esta técnica permite el intercambio individual de aminoácidos. Así es posible sustituir los aminoácidos con carga positiva por aminoácidos con carga negativa, o neutrales, y a la inversa. Pequeños cambios en la superficie del receptáculo de unión tienen efectos dramáticos en cuanto a la capacidad de pasar de los gangliósidos. Se pudo mostrar que la afinidad se redujo en más del 99% cuando, por ejemplo, se intercambia el aminoácido en la posición 1266, designado como el motivo de triptófano, como W en SXWY, con un radical alifático, por ejemplo leucina. Se ha observado, sin embargo, también lo contrario. El intercambio de aminoácidos que se extienden hasta el interior del receptáculo de unión produce un incremento de la afinidad a los gangliósidos. Como la configuración del receptáculo de unión es tan importante para la afinidad de la HC al receptor del gangliósido, incrementa o disminuye simultáneamente con la afinidad de la HC con el receptor del gangliósido también la potencia proteolítica de la LC conectada de conformidad con la afinidad.

En un ensayo de ligando - receptor se caracterizaron e intercambiaron, por lo tanto, según la invención, determinados radicales de aminoácidos en la bolsa que une los gangliósidos de BoNT/A, para aumentar así la afinidad al receptor del gangliósido. La afinidad del fragmento de H_C mutado fue determinada en ensayos de adhesión de gangliósidos y sinaptosomas. A continuación, se acopló la HC con las mismas mutaciones a LC-A, para lo cual se aprovechó una secuencia de aminoácidos sensitiva a trombina. La proteína recombinante se activó con trombina ('nicked') y produjo una molécula de cadena doble en que ambas cadenas estaban enlazadas entre sí mediante un solo puente de bisulfuro. La eficacia de los constructos se probó en los sinaptosomas de cerebro de rata -una preparación que libera transmisores. La magnitud de la inhibición de la liberación de transmisores fue tomado como grado de la eficacia de los constructos. Se analizó además la potencia de los constructos individuales con la ayuda de una preparación de nervio-músculo aislado de ratón (Hemi-Diaphragma-Assay=HDA) que representa el blanco fisiológico de las neurotoxinas de clostridia.

Las enfermedades y síntomas que deben tratarse con TrapoX están acompañados por una actividad focal aumentada de neuronas motores y de neuronas vegetativas. La actividad aumentada produce contracciones dolorosas de los músculos inervados por estas células y una secreción excesiva de líquido de células glandulares.

La actividad aumentada produce además arrugas faciales en diferentes regiones. La causa es una liberación aumentada patológicamente de acetilcolina de los terminales nerviosos periféricos. Si se inyecta TrapoX en el músculo afectado, se produce, después de un periodo de latencia de 1-3 días un relajamiento del músculo afectado, se para la secreción y se alisa el cutis facial. Esto es condicionado por una inhibición de la liberación de acetilcolina por el TrapoX. El paciente se siente casi libre de molestias y los dolores, causados por las contracciones musculares, se alivian y desaparecen por completo.

La liberación de acetilcolina se inhibe tanto en seres humanos como en animales. Por lo tanto, se usa el ensayo con animales en forma rutinaria tanto para probar la presencia de NoNT en intoxicaciones como también para determinar la actividad de medicamentos de BoNT (Botox, Dysport, Xeomin). La actividad de BoNT se cuantifica, realizando una determinación de la LD₅₀ en el ratón. En este sentido, se busca la dosis que mata el 50% de los animales de una población. Es evidente que además de las dosis, que no matan animal alguno, se administran también dosis que matan el 100% de los animales de un grupo. Como el veneno se administra de forma sistémica (i.p.) una gran cantidad de animales mueren con gran sufrimiento de parálisis respiratoria, causada por una parálisis de los músculos de la respiración. Con la finalidad de evitar los ensayos con animales, se puso en práctica un ensayo de hemidiafragma del ratón. Los ratones de ensayos murieron en el ensayo LD₅₀ por parálisis respiratoria causada por la parálisis de los músculos respiratorios. Es posible, por lo tanto, extraerle a un ratón el músculo respiratorio incluyendo el nervio que lo inerva (*Nervius phrenicus*) y envenenarlo *invVitro*. La BoNT se unirá con sus receptores, se absorberá en la célula y se traslocará y dividirá finalmente su sustrato, en consecuencia de lo cual el músculo se paraliza. Existe una correlación directa entre el valor LD₅₀ y la parálisis del músculo respiratorio. Este ensayo *in vitro* representa, para así decirlo, una versión reducida del ensayo con animales (Wohlfarth K, Goeschel H, Frevert J, Dengler R, Bigalke H, Botulinum A toxis: units versus units. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1997 Mar; 335(3):335-40).

Se puede partir, por lo tanto, de la suposición de que la BoNT que paraliza el diafragma *in vitro*, también actuará en el ratón vivo y lo matará según la dosis administrada. Este procedimiento sustituto de ensayo con animal es tan convincente que el ensayo de hemidiafragma de ratón se aceptará en breve por la Farmacopea de la UE como procedimiento de prueba de autoridad oficial para BoNT para los estados miembro de la UE. Es posible, por lo tanto, concluir de la actividad aumentada de TrapoX en el preparado de diafragma de ratón a una actividad mayor también en el ser humano.

El complejo BoNT/A se empleó en el pasado reciente para el tratamiento de las distonías motores, así como para amortiguar la actividad simpática excesiva (véase Benecke *et al.* (1995), Akt Neurol 22, 209ss) y para aliviar el dolor y la migraña (véase Sycha *et al.* (2004), J Neurol 251, 19-30). Este complejo consiste en la neurotoxina, diferentes hemaglutininas y una proteína no tóxica que no forma hemaglutinina. En el pH fisiológico, el complejo se disocia rápidamente. La neurotoxina que se desprende de él es el único componente del complejo que es terapéuticamente relevante y que produce un alivio de los síntomas. Como la enfermedad neurológica fundamental no se cura, es necesario volver a inyectar el complejo en intervalos de tres a cuatro meses. En función de la cantidad de proteína exógena inyectada, algunos pacientes desarrollan anticuerpos específicos de BoNT/A. Estos pacientes se vuelven resistentes a la neurotoxina. Una vez que las células sensitivas al antígeno reconocen la neurotoxina y se hayan formado anticuerpos, las células de memoria relevantes se preservarán por años. Por ese motivo, es importante tratar a los pacientes con preparados de actividad máxima en dosis tan bajas como sea posible. Los preparados deberían, además, no contener otras proteínas de origen bacteriano, ya que estas podrían actuar como aditivos inmunológicos. Este tipo de sustancias atrae a los macrófagos que reconocen tanto los aditivos inmunológicos como también las neurotoxinas y los presentan a los linfocitos que responden en consecuencia con la formación de inmunoglobulinas. Por lo tanto, deben utilizarse en la terapia sólo los productos de máxima pureza, que no contienen proteínas ajenas.

Ihara *et al.* (véase, Ihara *et al.* (2003), Biochim. Biophys Acta 1625 (1): 19-26) describe la secuencia del gen para la neurotoxina tipo B de *Clostridium botulinum*, que está asociada con el botulismo infantil, la expresión de la mitad del terminal C de la cadena pesada y su actividad de unión. Ginaski *et al.* (véase, Ginaski *et al.* (200), FEBS Lett. 482 (1-2): 110-124) describe que la confrontación de secuencias basada en la estructura para los subdominios en hoja de trébol beta de la familia de la neurotoxina clostridial garantiza informaciones a escala de restos individuales por un sitio de unión de gangliósidos putativo. Rummel *et al.* (véase, Rummel *et al.* (2004), Mol. Microbiol. 51(3): 631-643) describe que el dominio Hcc de la neurotoxina Botulinum A y B presenta un único sitio de unión de gangliósidos, que muestra interacción de hidratos de carbono específica para serotipos. Goodnough *et al.* (véase, Goodnough *et al.* (2002), FEBS Lett. 513 (2-3): 163-168) describe el desarrollo de un vehículo de transmisión para el transporte intracelular de los antagonistas de la neurotoxina Botulinum. El documento WO 00/55208 divulga una toxina quimérica, que comprende la cadena pesada de una neurotoxina botulínica y una cadena no clostridial de toxinas.

Con la presente invención, se proporciona una proteína transportadora (Trapo), que puede superar los problemas descritos anteriormente del procedimiento conocido hasta la fecha.

Según un aspecto, la presente invención comprende una proteína transportadora, obtenible mediante la modificación de la cadena pesada de la neurotoxina formada por *Clostridium botulinum*, en la que la neurotoxina es la neurotoxina

5 tipo A de botulina (BoNT/A) y en la que la proteína transportadora se une con las neuronas con una afinidad mayor que la neurotoxina nativa, en la que la actividad de unión es determinada en el ensayo sobre sinaptosomas, y en la que por lo menos un aminoácido en las posiciones 1117, 1252, 1253, 1270, 1278 hasta 1279 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina Botulinum tipo A es eliminado o sustituido por un aminoácido, que existe en estado natural o no es de origen natural.

10 Según otro aspecto, la presente invención comprende una proteína transportadora, obtenible mediante la modificación de la cadena pesada de la neurotoxina tipo A de *Clostridium botulinum* (BoNT/A), en la que los aminoácidos 1092 a 1296 de la neurotoxina tipo A de *Clostridium botulinum*, que contienen los dominios que se unen con los gangliósidos, son reemplazados por las secuencias siguientes: proteína de neurotoxina tipo B de *Clostridium botulinum*, aminoácidos 1079 a 1291, proteína de neurotoxina tipo C₁ de *Clostridium botulinum*, aminoácidos 1093 a 1291, proteína de neurotoxina de *Clostridium tetani*, aminoácidos 1111 a 1315.

15 Según otro aspecto, la invención comprende asimismo una proteína transportadora, obtenible mediante la modificación de la cadena pesada de la neurotoxina tipo A (BoNT/A) de *Clostridium botulinum*, siendo reemplazado el fragmento Hc de BoNT/A completo (aminoácidos 867 a 1296) por el fragmento Hc de BoNT/B (aminoácidos 866 a 1291).

20 La expresión "enlace con neuronas con mayor afinidad que la neurotoxina nativa". La neurotoxina nativa es preferentemente la neurotoxina nativa de *C. botulinum* tipo A. La neurotoxina Botulinus producida de manera recombinante de *E. coli* que contiene, entre otras, la secuencia de aminoácidos idéntica a la neurotoxina nativa Botulinus, se comporta farmacológicamente de manera idéntica a la neurotoxina Botulinus nativa y se denomina neurotoxina Botulinus recombinante tipo silvestre. Las neuronas referidas en esto son neuronas motores colinérgicas. La proteína transportadora se une preferentemente de modo específico con los polisialogangliósidos de las superficies de las membranas de neuronas como, por ejemplo, GD1a, GD1b o GT1b. El enlace se determina preferentemente *in vitro*. Con particular preferencia, se realiza la determinación mediante el uso de un ensayo que se describe con detalle en los ejemplos.

30 La expresión "modificación de cadenas pesadas de la neurotoxina formada por *C. botulinum*". La secuencia de aminoácidos y/o de ácido nucleico de la cadena pesada (HC) de la neurotoxina formada por *C. botulinum* se pueden obtener de manera generalizada de los bancos de datos de acceso público para cada uno de los serotipos conocidos A a G (Cf. también la tabla 1). La modificación comprende, que se haya eliminado, adicionado o insertado en la secuencia de aminoácidos al menos un aminoácido, o se haya sustituido al menos un aminoácido de la neurotoxina nativa por otro aminoácido natural o no existente de manera natural y/o un aminoácido esté modificado de forma postraslacional en la secuencia de aminoácidos dada. Las modificaciones postraslacionales comprenden glicosilaciones, acetilaciones, acilaciones, desaminaciones, fosforilaciones, isoprenilaciones, glicosilfosfatidilinositolizaciones y otras modificaciones que son conocidas por el experto en la materia.

40 La HC de la neurotoxina generada por *C. botulinum* comprende tres subdominios, a saber, el dominio de traslocación amino terminal H_N con tamaño de 50 kDa, el dominio H_{CN} contiguo de 25 kDa y el dominio ubicado en el terminal carboxilo con 25 kDa, H_{CC}. En conjunto, los dominios H_{CN} y H_{CC} se denominan fragmentos H_C. Las secciones de aminoácidos correspondientes de los respectivos subdominios pueden desprenderse de la tabla 1 para los serotipos individuales y sus variantes.

45 Para la descripción detallada de las proteínas híbridas con dominios de diferentes serotipos de BoNT se introduce, en lo que sigue, la siguiente nomenclatura. La expresión scAtAAB designa, por ejemplo, una neurotoxina de una cadena (sc) consistiendo de cuatro dominios LC, H_N, H_{CN} y H_{CC} siendo cada dominio caracterizado según su proveniencia con la letra mayúscula del respectivo serotipo. Es decir, en scAtAAB, las LC, H_N y H_{NC} provienen de BoNT/A, mientras que el dominio H_{CC} fue intercambiado de BoNT/A contra aquel de BoNT/B. La letra minúscula "t" simboliza una secuencia de detección de trombina insertada entre LC y H_N.

Tabla 1: Números de banco de datos de las secuencias de aminoácidos y distribución de los subdominios de las siete neurotoxinas Botulinus.

BoNT	nº de banco de datos de la secuencia de proteínas	nº de aminoácidos	HC		
			H _N	H _C	
				H _{CN}	H _{CC}
BoNT/A	AAA23262 AAM75961 AAQ06331 BTCLAB	1296	449-866	867-1091	1092-1296
	P10845	1296	449-866	867-1091	1092-1296
	CAA36289	1296	449-866	867-1091	1092-1296
	CAA51824 I40645 Q45894	1296	449-866	867-1091	1092-1296
BoNT/B	AAL11499 AAL11498	1291	442-855	866-1078	1079-1291
	CAA73968	1291	442-855	866-1078	1079-1291
	AAK97132	1291	442-855	866-1078	1079-1291
	A48940 AAA23211 P10844	1291	442-855	866-1078	1079-1291
	BAC22064	1291	442-855	866-1078	1079-1291
	CAA50482 140631	1291	442-855	866-1078	1079-1291
BoNT/C1	A49777 BAA14235 BAB71749 CAA51313 S46431	1291	450-863	864-1092	1093-1291
	P18640	1291	450-863	864-1092	1093-1291
	BAA08418	1280	450-863	864-1083	1084-1280
	BAA89713	1280	450-863	864-1083	1084-1280
	CAA38175 P19321 S11455	1276	446-859	860-1079	1080-1276
BoNT/D	AAB24244	1276	446-859	860-1079	1080-1276
	BAA07477 S70582	1285	446-859	860-1088	1089-1285
	BAA90661	1285	446-859	860-1088	1089-1285
	BAB86845 CAA44558 S21178	1252	423-842	843-1066	1067-1252
BoNT/E	CAA43999 Q00496	1251	423-842	843-1066	1067-1251
	CAA43998 JH0256 P30995	1251	423-842	843-1066	1067-1251
	1904210A AAA23263 140813 P30996	1274	440-860	861-1086	1087-1274
BoNT/F	CAA73972	1280	440-861	862-1087	1088-1280
	AAA23210 CAA57358	1278	440-861	862-1084	1085-1278
	CAA48329 533411	1268	432-853	854-1075	1076-1268
	CAA52275 Q60393 S39791	1297	447-860	861-1086	1087-1297

5 La presente invención se refiere, en particular, a una proteína transportadora, que se obtiene mediante la modificación de la HC de la neurotoxina formada por *Clostridium botulinum*, uniéndose la proteína referida con

mayor afinidad que la neurotoxina nativa específica con las neuronas y siendo captada por estas células mediante endocitosis.

5 La proteína transportadora proporcionada en la presente invención posee una afinidad específica mayor de su dominio de unión de los gangliósidos con respecto a los polisialogangliósidos complejos. El aumento de la afinidad se logra, preferentemente, mediante sustitución o delección de aminoácidos.

10 Según una forma de realización preferida, la proteína transportadora posee una afinidad por lo menos un 15% mayor que la neurotoxina nativa. La proteína transportadora posee preferentemente una afinidad por lo menos un 50% mayor, con particular preferencia por lo menos un 80% mayor, y especialmente una afinidad por lo menos un 90% mayor que la neurotoxina nativa.

15 Según la invención, la modificación de la HC se realiza en la zona del fragmento H_C de la neurotoxina dada. En la medida en que la modificación comprende la sustitución, delección, inserción o adición, ésta puede realizarse, por ejemplo, mediante mutagénesis enfocada; el experto en la materia conoce los procedimientos para ello. Los aminoácidos presentes en la neurotoxina nativa son modificados con aminoácidos presentes en estado natural o no presentes en estado natural. Los aminoácidos se clasifican en principio en diferentes grupos fisicoquímicos. El aspartato y glutamato pertenecen a los aminoácidos con carga negativa. A los aminoácidos con carga positiva pertenecen la histidina, arginina y lisina. A los aminoácidos polares pertenecen la asparagina, glutamina, serina, treonina, cisteína y tirosina. A lo aminoácidos no polares pertenecen la glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina y triptofano. Grupos laterales aromáticos están presentes en los aminoácidos histidina, fenilalanina, tirosina y triptofano. Se prefiere en general que un aminoácido sea intercambiado por otro aminoácido que pertenece a otro grupo fisicoquímico.

25 Según la invención, la proteína transportadora es derivada de la secuencia de proteínas de la neurotoxina de *Clostridium botulinum* tipo A (números de banco de datos AAA23262 y CAA51824).

30 La presente invención se refiere a una proteína transportadora, en la que al menos un aminoácido es eliminado o sustituido por un aminoácido de presencia natural o que no está presente en estado natural en las posiciones 1117, 1253, 1270 y 1278 a 1279 de la secuencia de proteínas de la neurotoxina de *Clostridium botulinum* tipo A (número de banco de datos AAA23262 y CAA51824).

35 Otra forma de realización de la presente invención se refiere a una proteína transportadora, en la que los aminoácidos están sustituidos en las posiciones 1092 a 1296 de la secuencia de proteínas de la neurotoxina de *Clostridium botulinum* tipo A (número de banco de datos AAA23262 y CAA51824), una zona que comprende el dominio de la adhesión a gangliósido, por la secuencia de la neurotoxina de *Clostridium botulinum* del tipo B (número de banco de datos AAA23211), aminoácidos 1079 a 1291, *Clostridium botulinum* del tipo C₁ (número de banco de datos CAA51313), aminoácidos 1093 a 1291.

40 Otros dominios apropiados para el intercambio con las posiciones de aminoácidos pueden desprenderse de la tabla 1.

45 Otra forma de realización de la presente invención se refiere a una composición, que contiene una proteína transportadora según la invención y al menos una molécula (X) de intervención. La molécula de intervención puede ser una molécula orgánica pequeña, un péptido o una proteína; preferentemente enlazada en forma covalente, por ejemplo, por un enlace de péptido, éster, éter, sulfuro, bisulfuro o carbono-carbono.

50 La molécula que interviene comprende adicionalmente todas las sustancias conocidas terapéuticamente activas. Se prefieren en este sentido los citostáticos, antibióticos, virustáticos, pero también la inmunoglobulina.

55 Para aprovechar mejor la mayor afinidad del Trapo, se unió en forma amino terminal a través de una secuencia de aminoácidos que es reconocida y separada específicamente por la proteasa trombina con una LC de BoNT/A, por lo que se generó un TrapoX determinado. La eficacia del TrapoX referido aumentó en comparación con el BoNT/A nativo por un factor particularmente preferido de al menos 3. Este nuevo producto, que está libre de proteínas extrañas, reducirá dramáticamente la estimulación del sistema inmune, gracias a la mayor pureza de la materia y la menor dosificación.

60 Otra forma de realización de la presente invención se refiere a una proteína transportadora, en la que la proteína es una proteasa que separa una o varias proteínas del aparato de liberación de neurotransmisores, seleccionándose la proteasa del grupo de las neurotroxinas que consisten en la LC de las neurotoxinas de *Clostridium botulinum*, en particular del tipo A, B, C₁, D, E, F y G o de un fragmento proteolíticamente activo de la LC de una neurotoxina de *Clostridium botulinum*, en particular del tipo A, B, C₁, D, E, F y G, poseyendo en esto el fragmento al menos 0,01% de la actividad proteolítica de la proteasa nativa, preferentemente al menos 5%, con particular preferencia al menos 50%, en particular al menos 90%. La proteína transportadora y la proteasa son derivadas preferentemente del mismo serotipo de la neurotoxina de *C. botulinum*, se prefiere en particular que el dominio H_N de la proteína transportadora y la proteasa se deriven del serotipo A de la neurotoxina de *C. botulinum*. Las secuencias de las

proteasas son accesibles de manera generalizada y los números del banco de datos pueden desprenderse de la tabla 1. La actividad proteolítica de las proteasas se determina mediante una cinética de separación de sustrato (véase Binz *et al.* (2002), *Biochemistry* 41(6), 1717-23).

- 5 Las LC se caracterizan porque contienen la secuencia His-Glu-Leu-Xaa-His-(Xaa)₃₃₋₃₅-Glu-(Xaa)₈₄₋₉₀-Glu-(Xaa)₁₁₁-Arg-Xaa-Xaa-Tyr, pudiendo ser Xaa cualquier aminoácido. La proteína transportadora de la presente invención se caracteriza porque la proteína y las proteasas provienen de los grupos precedentes de proteínas o proteasas.

10 Según otra forma de realización de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la producción de la proteína transportadora. En una primera etapa, se prepara un ácido nucleico que codifica la proteína transportadora. El ácido nucleico puede representar ARN, ADN o mezclas de estos. El ácido nucleico puede estar además modificado con relación a su resistencia a la nucleasa como, por ejemplo, mediante la inserción de enlaces de fosfortioato. El ácido nucleico puede producirse a partir de un ácido nucleico de salida, siendo accesible el ácido nucleico de salida, por ejemplo, mediante clonación de bancos de genoma o de ADNc. Además, es posible producir el ácido nucleico directamente mediante síntesis de fase sólida. Los procedimientos apropiados son conocidos por el experto en la materia. En caso de que se parta de un ácido nucleico de salida, puede realizarse una modificación enfocada, por ejemplo, mediante mutagénesis orientada a un sitio que produce en el plano del aminoácido al menos una adición, inserción, delección y/o sustitución. El ácido nucleico es enlazado a continuación de forma operativa con un promotor apropiado. Promotores apropiados para la expresión de sistemas de expresión conocidas son conocidos por el experto en la materia. La selección del promotor del sistema de expresión usado para la expresión. Se prefieren en general los promotores constructivos, pero se pueden usar también los promotores inducibles. El constructo así producido comprende al menos una parte de un vector, en particular unos elementos regulatorios, seleccionándose en esto, por ejemplo, el vector de los λ -derivados, adenovirus, b α culovirus, SV-40-virus y retrovirus. El vector es preferentemente capaz de expresar el ácido nucleico en una célula huésped determinada. La invención proporciona además unas células huésped que contienen el vector y que son aptas para la expresión del vector. Se conocen en el estado de la técnica muchos sistemas de expresión procariontes y eucariontes, seleccionándose las células huésped, por ejemplo, de entre células procariontes como *E. coli* o *B. megaterium*, de células eucariontes como *S. cerevisiae* y *P. pastoris*. Ciertamente, pueden usarse también células eucariontes superiores como células de insectos o de mamíferos, pero se prefieren células huésped que no poseen un aparato de glicosilación como *C. botulinum*.

35 En la medida en que se ofrece una composición según la invención, que contiene además de la proteína transportadora también al menos una molécula de intervención y esta molécula de intervención es un péptido o una proteína con función ya sea teniendo una cisteína carboxilo terminal o un grupo mercapto, es posible producir el péptido o la proteína de manera recombinante tal como se describe en lo precedente, por ejemplo, usando vectores binarios o mediante diferentes células huésped. En la medida en que se usa la misma célula huésped para la expresión tanto de la proteína transportadora como del péptido o de la proteína, se forma preferentemente un enlace de bisulfuro intermolecular *in situ*. Para la producción más eficaz en la misma célula huésped puede trasladarse el ácido nucleico que codifica el péptido o la proteína también con el de la proteína transportadora en el mismo marco de lectura, de modo que se produce un polipéptido de una cadena. Para ello, se forma entonces preferentemente un enlace de bisulfuro intermolecular *in situ*. Para una hidrólisis más sencilla del enlace peptídico también presente entre la proteína transportadora y el péptido o la proteína, se inserta en el término amino de la proteína transportadora una secuencia de aminoácidos que es reconocida y dividida específicamente por la proteasa trombina o por una endoproteasa específica de la célula huésped.

45 Si es posible, se puede inducir un enlace de bisulfuro intermolecular correspondiente, después de la purificación separada de la proteína transportadora y de la proteína posteriormente por un procedimiento de oxidación conocido por el experto. El péptido o la proteína pueden obtenerse también directamente mediante síntesis o condensación de fragmentos. Los procedimientos correspondientes son conocidos por el experto en la materia.

50 La proteína transportadora y el péptido o la proteína son purificados a continuación. Para ello, se usan unos procedimientos conocidos por el experto en la materia como, por ejemplo, el procedimiento de cromatografía o de electroforesis.

55 Otra forma de realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la proteína transportadora y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente compatible, un diluyente y/o aditivo y que es apto para el tratamiento de las siguientes disfunciones y enfermedades: espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica, espasticidades, distonías, migraña, dolores, enfermedades de la columna cervical y lumbar, estrabismo, hipersalivación y enfermedades depresivas.

60 La composición farmacéutica es apta para la administración oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular y tópica. Se prefiere en esto la administración intramuscular. Una unidad de dosis de la composición farmacéutica contiene aproximadamente de 0,1 μ g a 1 mg de la proteína transportadora y/o la composición inventiva.

65 Otra forma de realización de la presente invención incluye una composición cosmética que consiste en la proteína transportadora y un vehículo farmacéutico, diluyente y/o aditivo, apropiado para el tratamiento de hiperhidrosis y

arrugas faciales muy pronunciadas. La composición cosmética es apta para la administración oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular y tópica. Se prefiere, en este sentido, la administración intramuscular. La unidad de dosis de la composición cosmética contiene aproximadamente de 0,1 pg a 1 mg de la proteína de transporte y/o la composición inventiva. La composición cosmética es apropiada para el tratamiento de hiperhidrosis y arrugas faciales.

La proteína transportadora descrita en la presente invención puede producirse por una célula huésped apropiada tal como, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* o *Bacillus megaterium*, que reproduce un vector de expresión recombinante, en el que el vector codifica una proteína transportadora.

La presente invención se pondrá más claramente de manifiesto mediante las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 muestra que la afinidad del fragmento H_C mutado de BoNT/A con respecto a las preparaciones de membrana de sinaptosomas de cerebro de rata es tres veces mayor que aquella del fragmento H_C del tipo silvestre de BoNT/A.

La figura 2 muestra la unión de diferentes muteínas de fragmento de H_C de BoNT/A en sinaptosomas de cerebro de rata, estando, en este sentido, la afinidad del fragmento H_C del tipo silvestre como estándar en el 100%. En el primer bloque, se representan las afinidades de las muteínas BoNT/A que muestran mutaciones de los aminoácidos Y1117 que producen un incremento. En el segundo bloque, se representan otras muteínas de BoNT/A. En el tercer bloque, se muestran las afinidades de la muteínas de BoNT/A que poseen unas mutaciones dobles que refuerzan la unión en membranas de neuronas (sinaptosomas).

La figura 3 muestra la neurotoxicidad mayor de la muteína Y1117A de BoNT/A en comparación con el tipo silvestre de BoNT/A en el preparado aislado de *Nervus phrenicus* - diafragma del ratón.

La figura 4 muestra la unión de cuatro híbridos de fragmento H_C de BoNT/A H_CAB, H_CAC, H_CA y H_CAT = neurotoxina de tétano) en membranas de neuronas (sinaptosomas), habiéndose fijado el tipo silvestre de fragmento de H_C de BoNT/A como estándar en 100%.

La figura 5 muestra la neurotoxicidad aumentada del híbrido de toxina completa que está constituida por la BoNT/A y el fragmento H_C o el dominio H_{CC} de BoNT/B en comparación con el tipo silvestre en el preparado aislado de *Nervus phrenicus* - diafragma del ratón.

La invención comprende, en detalle, una proteína transportadora (Trapo) que surge mediante la modificación de la HC de la neurotoxina tipo A producida por *Clostridium botulinum*, que se une preferentemente de manera específica con las neuronas, que es captada de modo intracelular por endocitosis mediada por receptores y que es trasladada del compartimiento endosomático ácido al citosol de las neuronas. Esta proteína se utiliza a modo de transportador para introducir proteasas y otras sustancias unidas con el mismo, que no pueden penetrar la membrana de plasma y llegar al citosol de las neuronas, en las células. Los sustratos de las proteasas son proteínas y péptidos localizados en el interior de las células que participan en la liberación de transmisores. Después de la separación de los sustratos, se bloquean las funciones específicas de las neuronas, sin que las células sean dañadas. Una de estas funciones es la exocitosis que realiza la liberación de los neurotransmisores. Si se inhibe la liberación de los transmisores, entonces se bloquea la transmisión de señales de célula a célula. Por ejemplo, se paralizan los músculos estriados cuando la liberación de acetilcolina está inhibida en el sitio de contacto neuromuscular. Este efecto puede aprovecharse terapéuticamente, cuando TrapoX es aplicada en las terminaciones neuronales de músculos espásticos o distonales. Otras sustancias activas son, por ejemplo, sustancias activas con efectos antivirales. Conjugadas con Trapo, pueden ser útiles para el tratamiento de infecciones virales del sistema nervioso. La presente invención se refiere también al uso de una proteína de transporte para inhibir la liberación de neurotransmisores.

Cuando los pacientes son tratados con las formas nativas de BoNT/A y B, la inyección de estas proteínas no humanas causa la formación de anticuerpos, a pesar de la dosis baja, de manera que la terapia debe terminarse para evitar un choque anafiláctico. Al aplicar una sustancia con el mismo mecanismo activo pero una eficiencia superior de transporte de la actividad enzimática, es posible reducir la dosis drásticamente y no se formarán anticuerpos. Esta propiedad aparece en la proteína transportadora descrita en la presente memoria.

Aun cuando se proporcionan ejemplos para la aplicación, el modo de aplicación apropiado y la dosificación se determinan generalmente en forma individual por el médico que aplica el tratamiento. Decisiones de esta naturaleza son tomadas de forma rutinaria por el médico familiarizado con el campo especializado. En este sentido, pueden seleccionarse, por ejemplo, el modo de aplicación y la dosificación de la neurotoxina de la invención descrita en la presente memoria sobre la base de criterios como la solubilidad de la neurotoxina seleccionada o la intensidad del dolor que debe tratarse.

El intervalo de tratamiento para BoNT/A y B nativa es actualmente de entre tres y cuatro meses. Una prolongación de este intervalo reduciría el riesgo de la formación de anticuerpos y permitiría una mayor duración del tratamiento

con BoNT. El aumento de LC en el citosol extendería su descomposición en el tiempo y extendería no esto el período de su actividad. La proteína transportadora descrita en la presente memoria posee una afinidad y una tasa de absorción mayores que la HC-A nativa.

5 El siguiente ejemplo sirve sólo a título explicativo y no debería considerarse limitativo.

Ejemplos

Expresión recombinante de TrapoX producida con técnica genética en *E. coli*

10 La secuencia de ADN de la HC de BoNT/A se amplificó en el ADN del cromosoma de *Clostridium botulinum* (no. de banco de datos AAA32262) mediante PCR. Para ello, se sustituyó el codón para el aminoácido tirosina 1117 con la ayuda de oligonucleótidos específicos con una tripleta de bases que codifican el radical del aminoácido de alanina. Además, se completó el término 5' del gen con una secuencia de ADN que codifica la secuencia de reconocimiento de trombina. Esta secuencia de ADN se introdujo en un vector de expresión bacteriano. Para ello, se fusionó el gen insertado para Trapo en el extremo 3' con un oligonucleótido que codifica un péptido de afinidad carboxi terminal como, por ejemplo, el tag Strep, tag 6xHN o tag His₆. El vector de expresión pAR-Trapo producido de esta manera es la base de salida para la adición de las moléculas portadoras como la LC de la BoNT.

20 La secuencia de ADN de la LC de BoNT/A se amplificó en la secuencia de ADN de cromosoma de *Clostridium botulinum* (no. de banco de datos AAA23262) con el procedimiento de PCR y se insertó en el vector de expresión pAR-Trapo contra la corriente de la secuencia de reconocimiento de trombina codificada. El vector de expresión pAR-Trapox así generado se transformó con una cepa *E. coli* K12 y se indujo en condiciones de la etapa 2 de seguridad biológica y respetando los reglamentos emitidos para el proyecto por la administración del municipio de Hannover, Az 501g.40654/3/57/3 la expresión de la TrapoX. La TrapoX expresada en exceso se aisló mediante cromatografía de afinidad como proteína de una cadena teniendo un peso molecular de 150 kDa según las instrucciones del fabricante. A continuación se hidrolizó la proteína con la trombina conjugada en sefarosa, produciéndose una proteína pura cuyas dos cadenas quedaron unidas entre sí por un puente de bisulfuro.

30 Esta proteína poseía en comparación con el tipo silvestre de BoNT/A una afinidad aumentada en un 300% al gangliósido GT1b aislado, inmovilizado en placas de microtitulación y con preparaciones de membrana de sinaptosomas de cerebro de rata (figura 1). La actividad catalítica de la LC-A no estaba modificada, según se mostró en la separación *in Vitro* de SNAP-25 recombinante. La potencia de la TrapoX con relación a la inhibición de la liberación de neurotransmisor en sinaptosomas funcionales del cerebro de rata había aumentado en comparación con la BoNT/A nativa obtenida de *Clostridium botulinum*- en el 300%. En preparados de nervio-músculo del ratón (HDA) también se había incrementado la potencia de la trapoX en un 300% frente a la BoNT/A nativa (figura 2).

Medición de la unión en sinaptosomas de cerebro de rata y de la neurotoxicidad en el HDA de diferentes muteínas de BoNT/A

40 La unión de fragmentos de H_C con marca radioactiva en sinaptosomas de ratas se midió, según se indica en Rumme *et al.*, J. Mol. Biol. 326 (2003), 835-847. La neurotoxicidad de las muteínas de BoNT/A se determinó según descrito por Habermann *et al.*, Naunyn Schmiedebreg's Arch. Pharmacol. 311 (1980), 33-40.

45 La comparación de la unión de las diferentes muteínas de BoNT/A en comparación con el tipo silvestre se muestra en la siguiente tabla:

Tabla para la figura 2

Mutación	% vs. Tipo silvestre	Desviación estándar
Wildtyp	100,0	15,00
Y1117A	332,3	29,00
Y1117C	324,2	44,75
Y1117D	124,4	26,94
Y1117E	183,3	27,95
Y1117F	235,9	38,41
Y1117G	112,8	21,34
Y1117H	120,0	22,29
Y1117I	248,1	21,95
Y1117L	253,6	25,65
Y1117M	182,8	18,41
Y1117N	250,3	20,13
Y1117P	150,3	14,98
Y1117Q	187,3	28,19
Y1117R	115,4	16,80

Mutación	% vs. Tipo silvestre	Desviación estándar
Y1117S	199,2	32,65
Y1117T	264,1	28,55
Y1117V	346,9	37,61
F1252Y	208,0	38,36
H1253K	153,0	9,24
V1262I	97,8	9,38
Q1270N	122,3	37,81
L1278H	170,0	61,59
G1279N	153,6	44,54
Y1117C/H1253K	324,8	22,72
Y1117V/H1253K	332,9	33,48

5 La mutación de determinados aminoácidos individuales dentro del receptáculo de unión del gangliósido de BoNT/A produjo un incremento de la adhesión a neuronas. Preferentemente, se sustituye en la posición 1117 la tirosina por alanina, cisteína o valina. En particular, la sustitución del radical de tirosina en la posición 1117 por alanina produce un incremento de la afinidad aproximadamente del 330%.

10 Otras mutaciones de aminoácidos individuales del receptáculo de unión de gangliósido en la posición 1252 y 1253 produjeron también un incremento de la unión. En particular, la mutación de F1252 en tirosina y H1253 en lisina produjeron un incremento de la afinidad de un 110% o un 50%.

15 Además, pueden esperarse incrementos de la unión con las neuronas en el caso de mutaciones en las posiciones 1202, 1262, 1270, 1278 y 1279.

Se sometieron a prueba también unas muteínas de BoNT/A con mutaciones dobles, produciendo en particular las muteínas Y1117/H1253K y Y1117V/H1253K un aumento de la unión con las sinaptosomas (Cf. figura 2).

Se determinó además que el aumento de la unión, en particular, de la muteína Y1117A de BoNT/A produjera un aumento de la neurotoxicidad en el ensayo de *N. phrenicus* - neurotoxicidad (ensayo HDA; figura 3).

20 Determinación de la unión y la neurotoxicidad de híbridos de BoNT/A H_{CC}

La determinación de la unión y la neurotoxicidad se realizó según lo descrito anteriormente.

25 Los resultados se representan en la tabla siguiente y además en las figuras 4 y 5.

Mutación	% vs. Tipo silvestre	Desviación estándar
HcA wt	100,0	10,4
HcAB	249,2	19,1
HcAC	393,4	57,9
HcAE	22,0	5,3
HcAT	210,2	22,5

30 El intercambio del dominio H_{CC} de BoNT/A con respecto al de otros serotipos, en particular la neurotoxina B de *C. botulinum* y neurotoxina C de *C. botulinum* produjo un incremento del enlace con las neuronas. Se observó además que el intercambio del dominio de H_{CC} del fragmento H_C de BoNT/A con respecto al dominio correspondiente del tétano también produjo un incremento de la afinidad a neuronas. Los cambios de afinidad se aplican también al intercambio del dominio de H_{CC} en toda la BoNT/A. La figura 5 muestra que el incremento de la afinidad tiene en el híbrido scAtAAB el efecto en el mismo grado de un incremento de la neurotoxicidad. Si se usa, en lugar del dominio H_{CC} el fragmento H_C completo de scAtAAB, entonces se observan los resultados correspondientes. Se observó en particular que al intercambiar el dominio H_{CC} o el fragmento H_C de BoNT/A con el del de BoNT/B se registró una

35 mejoría de la neurotoxicidad en aproximadamente un 350%.

Determinación de la unión de muteínas BoNT al gangliósido GT1b

40 El gangliósido GT1b [NAcNeuα3Galβ3NAcGalβ4 (NAcNeuα8NAcNeuα3)Galβ4F1cβ] (Sigma-Aldrich) se disuelve en metanol y se aplica a placas de microtitulación de poliestireno de 96 cubetas altamente afinas (Corning; 1 µg GT1b en 100 µl/cubeta) o en el caso del ensayo de competencia con ¹²⁵I-BoNT en placas de tiras individuales CS (Greiner Bio-ohne; 0.1 µg de GT1b en 100 µl/cubeta). El solvente se evaporó a temperatura ambiente y las cubetas se lavaron tres veces con un tampón de unión (10 mM de Tris-HCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 0.5% BSA, pH 7.2). Los sitios de unión no específicos se bloquearon a continuación mediante incubación durante dos horas en PBS/Tween [140 mM de NaCl, 7 mM KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 0.05 % (V/V) Tween 20, pH 7.2]

45 complementado con 3% (p/v) de BSA. Los ensayos de unión se realizaron en un tampón de unión (100 µl/cubeta) durante 2 horas a temperatura ambiente ya sea con cantidades incrementales del tipo silvestre o cantidades

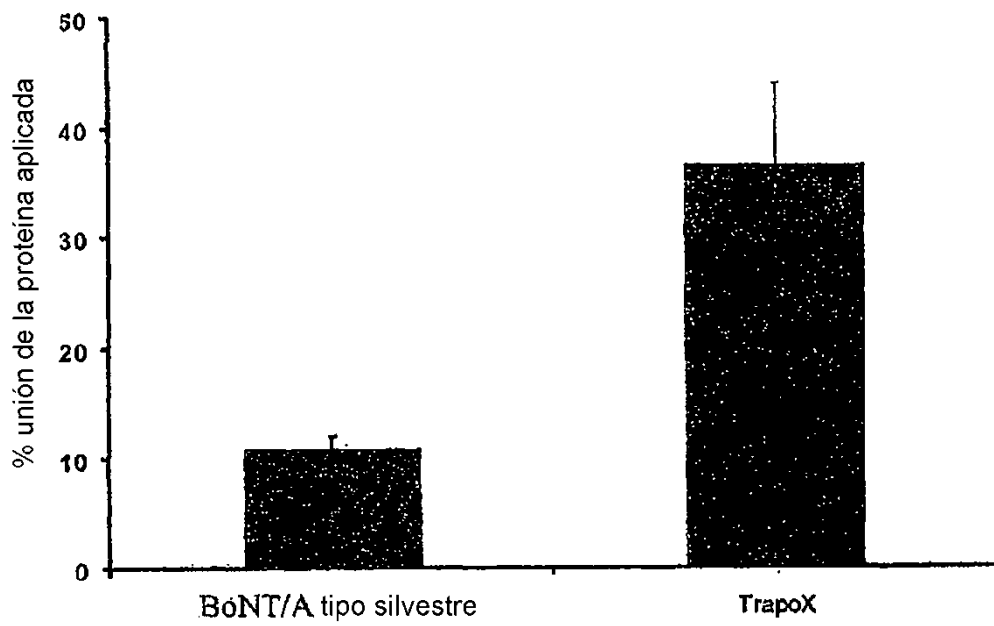
determinadas de los mutantes. La proteína sin unir es eliminada mediante 3 etapas de lavado, cada vez con 250 μ l tampón de BS/Tween. Los fragmentos de H_C unidos son detectados mediante incubación con Strep Tactin conjugado con fosfatasa alcalina (ST-AP. OBA GmbH) en tampón de unión durante 2 horas a temperatura ambiente según las instrucciones del fabricante; p-nitrofenilfosfato (1 mg/ml en 100 mM de glicina, 1 mM de MgCl₂, 1 mM de ZnCl₂, pH 10.4) que sirve en último término como sustrato para la fosfatasa alcalina. La reacción de desfosforilación se detiene mediante adición de solución de 3 M de NaOH y se mide la extinción a 405 nm usando un aparato de selección de microtitulación Spectra Count (Packard). Los ensayos de competencia son realizados durante 2 horas a temperatura ambiente en 100 μ l de tampón de unión con 700000 cpm/cubeta [¹²⁵I]-BoNT, cantidades variables de BoNT nativo o fragmentos de H_C recombinantes. Después de la incubación y la eliminación de los sobrenadantes, se lavan las cubetas tres veces con tampón de PBS/Tween, se secan y se separan. La cantidad de BoNT unida con marca radioactiva es determinada a continuación con un contador γ automático (Wallac 1480 Wizard 3).

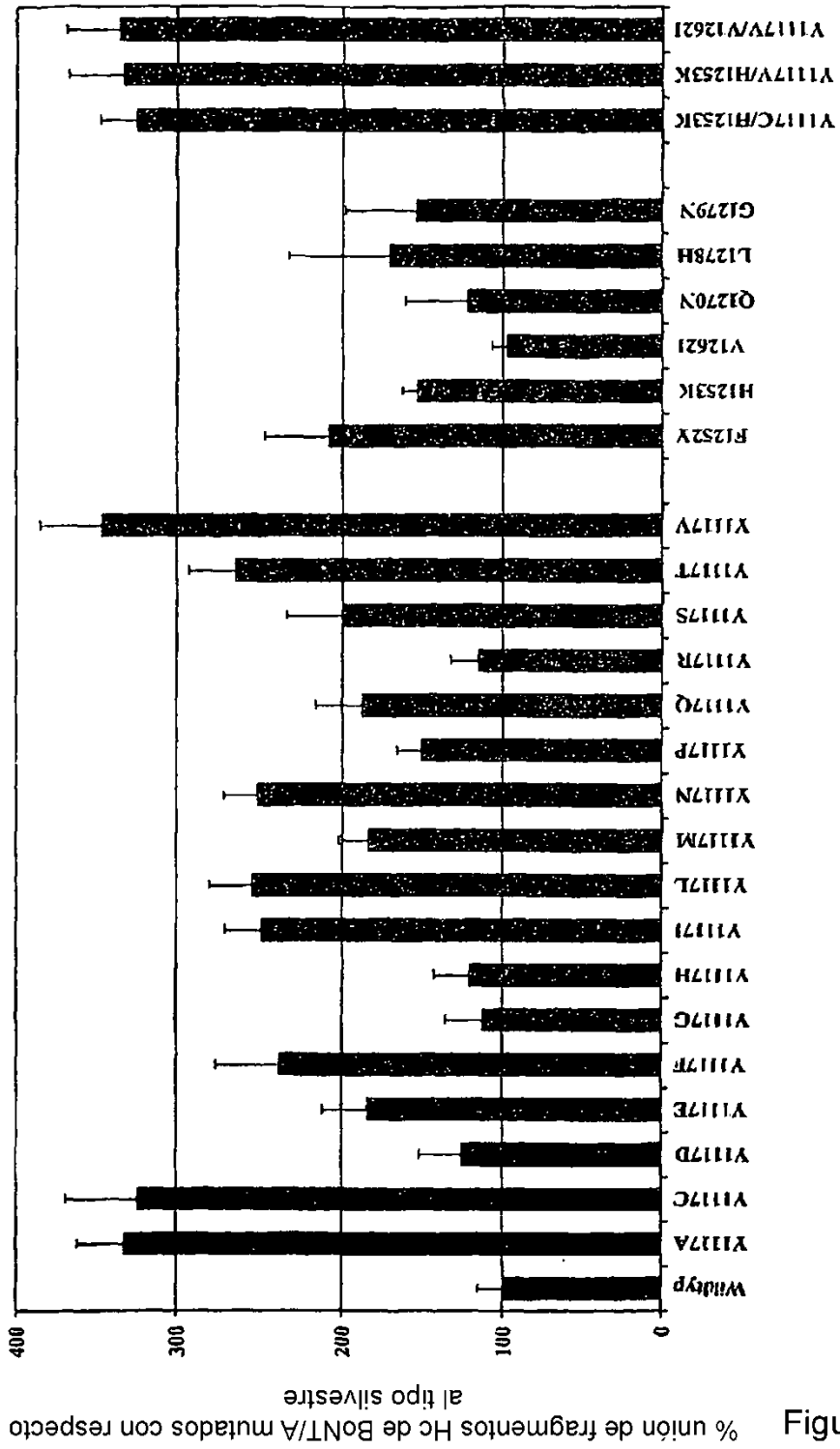
REIVINDICACIONES

1. Proteína transportadora, obtenible mediante la modificación de la cadena pesada de la neurotoxina formada por *Clostridium botulinum*, en la que la neurotoxina es la neurotoxina Botulinum tipo A (BoNT/A) y en la que la proteína transportadora se une con las neuronas con una afinidad mayor que la neurotoxina nativa, siendo determinada la actividad de unión en el ensayo en sinaptosomas, y siendo por lo menos un aminoácido en las posiciones 1117, 1252, 1253, 1270, 1278 a 1279 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina Botulinum tipo A eliminado o sustituido por un aminoácido, que existe en estado natural o que no es de origen natural.
2. Proteína transportadora, obtenible mediante la modificación de la cadena pesada de la neurotoxina tipo A de *Clostridium botulinum* (BoNT/A), en la que la proteína transportadora se une con las neuronas con una afinidad mayor que la neurotoxina nativa, siendo determinada la actividad de unión en el ensayo en sinaptosomas, y siendo reemplazados los aminoácidos 1092 a 1296 de la neurotoxina tipo A de *Clostridium botulinum*, que contienen los dominios de unión a los gangliósidos, por las secuencias siguientes:
- proteína de neurotoxina tipo B de *Clostridium botulinum*, aminoácidos 1079 a 1291, o
proteína de neurotoxina tipo C₁ de *Clostridium botulinum*, aminoácidos 1093 a 1291, o
dominio Hcc de la proteína de neurotoxina de *Clostridium tetani*.
3. Proteína transportadora, obtenible mediante la modificación de la cadena pesada de la neurotoxina tipo A de *Clostridium botulinum* (BoNT/A), en la que la proteína transportadora se une con las neuronas con una afinidad mayor que la neurotoxina nativa, siendo determinada la actividad de unión en el ensayo sobre sinaptosomas, y siendo reemplazado el fragmento Hc de BoNT/A completo (aminoácidos 867 a 1296) por el fragmento Hc de BoNT/B (aminoácidos 866 a 1291).
4. Proteína transportadora según la reivindicación 1, 2 o 3, en la que la proteína transportadora se une específicamente con las neuronas y es captada por las células mediante endocitosis.
5. Proteína transportadora según la reivindicación 1, 2 o 3, en la que la proteína transportadora se une específicamente con los gangliósidos complejos de las neuronas motores colinérgicas, que se ubican en la membrana de plasma, preferentemente con GT1b.
6. Proteína transportadora según una de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la proteína transportadora posee una afinidad por lo menos un 15% mayor que la neurotoxina nativa, preferentemente por lo menos un 50%, de manera particularmente preferida por lo menos un 80 %, particularmente por lo menos un 90%.
7. Proteína transportadora según la reivindicación 1, en la que el aminoácido en la posición 1117 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina Botulinum tipo A es eliminado o sustituido por un aminoácido, que existe en estado natural o que no es de origen natural.
8. Proteína transportadora según la reivindicación 7, en la que el aminoácido sustituido es alanina, cisteína, glutamato, fenilalanina, isoleucina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, serina, treonina o valina.
9. Proteína transportadora según la reivindicación 7, en la que el aminoácido sustituido es alanina, cisteína o valina.
10. Proteína transportadora según la reivindicación 1, en la que el aminoácido de las secuencias de proteínas de la neurotoxina Botulinum tipo A es sustituido en la posición 1252 por tirosina o por lisina en la posición 1253.
11. Proteína transportadora según la reivindicación 1, en la que dos o tres aminoácidos, seleccionados de entre las posiciones 1117, 1252, 1253, 1270, 1278 a 1279 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina Botulinum tipo A son eliminados o sustituidos, preferentemente las posiciones 1117/1252, 1117/1253, 1117/1278, 1117/1279, 1117/1252/1253, de manera particularmente preferida Y1117A/F1252Y, Y1117A/H1253K, Y1117A/1278H, Y1117A/G1279N, Y1117C/F1252Y, Y1117C/H1253K, Y1117C/L1278H, Y1117C/G1279N, Y1117V/F1252Y, Y1117V/H1253K, Y1117V/L1278H, Y1117V/G1279N, Y1117A/F1252Y/H1253K, Y1117C/F1252Y/H1253K e Y1117V/F1252/H1253K.
12. Composición, que contiene una proteína transportadora según una de las reivindicaciones 1 a 11, y por lo menos una molécula que interviene, comprendiendo la molécula que interviene una molécula orgánica pequeña, un péptido o una proteína.
13. Composición según la reivindicación 12, en la que la molécula que interviene se une de manera covalente mediante un enlace de péptido, un enlace de éster, un enlace de éter, un enlace de sulfuro, un enlace de bisulfuro o un enlace carbono-carbono.
14. Composición según la reivindicación 12, en la que la molécula orgánica pequeña es un virustático, citostático, antibiótico o una inmunoglobina.

15. Composición según la reivindicación 12, en la que la proteína comprende una proteasa.
- 5 16. Composición según la reivindicación 15, en la que la proteasa comprende una proteína de neurotoxina de un *Clostridium botulinum* del tipo A, B, C₁, D, E, F y G.
17. Composición según la reivindicación 15, en la que la proteasa contiene un fragmento activo proteolíticamente, que es derivado de la proteína de *Clostridium botulinum* del tipo A, B, C₁, D, E, F y G.
- 10 18. Composición según la reivindicación 17, caracterizada porque la proteasa contiene la secuencia His-Glu-Leu-Xaa-His-(Xaa)₃₃₋₃₅-Glu-(Xaa)₈₄₋₉₀-Glu-(Xaa)₁₁-Arg-Xaa-Xaa-Tyr, pudiendo ser Xaa cualquier aminoácido, y separando la proteasa unos sustratos específicos dentro de la neurona motor colinérgica.
- 15 19. Composición según la reivindicación 18, en la que los sustratos son seleccionados de entre las proteínas, que están involucradas en la liberación de los neurotransmisores en los nervios periféricos, y las proteínas que son aptas para producir reacciones catalíticas dentro de la neurona.
- 20 20. Composición según la reivindicación 19, en la que la proteasa y la proteína transportadora están enlazadas de forma covalente por una secuencia de aminoácidos, que es reconocida y separada específicamente por una endopeptidasa.
- 25 21. Composición según la reivindicación 20, en la que después de la separación mediante la endopeptidasa un puente de bisulfuro conecta la proteasa y la proteína transportadora entre sí, que, a su vez, produce la generación de una holotoxina activa.
- 30 22. Composición farmacéutica, que contiene la proteína transportadora según una de las reivindicaciones 1 a 11 o la composición según una de las reivindicaciones 12 a 21, así como opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, un diluyente y/o un aditivo.
- 35 23. Composición farmacéutica según la reivindicación 22 para el tratamiento de una disfunción o enfermedad para la cual está indicada una terapia con neurotoxina Botulinus.
- 40 24. Composición farmacéutica según la reivindicación 23, en la que la disfunción o enfermedad es una de entre las siguientes: espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica, espasticidades, distonías, migraña, dolores, enfermedades de la columna cervical o lumbar, estrabismo, hipersalivación y enfermedades depresivas.
- 45 25. Composición cosmética, que contiene la proteína transportadora según una de las reivindicaciones 1 a 11 o la composición según una de las reivindicaciones 12 a 21, así como opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, un diluyente y/o un aditivo.
- 50 26. Uso de una composición cosmética según la reivindicación 25 como producto cosmético, en el que las indicaciones cosméticas son hiperhidrosis y arrugas faciales muy pronunciadas.
- 55 27. Procedimiento para la producción de una proteína transportadora según una de las reivindicaciones 1 a 11 o de una composición según una de las reivindicaciones 12 a 21 mediante recombinación según los procedimientos conocidos.
28. Célula huésped, que contiene un vector de expresión recombinante y el vector de expresión codifica una proteína transportadora según una de las reivindicaciones 1 a 11 o una composición según una de las reivindicaciones 12 a 33.
29. Célula huésped según la reivindicación 28, en la que la célula huésped puede ser una célula de *Escherichia coli*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* o *Bacillus megaterium*.
30. Vector de expresión, en el que el vector comprende un ácido nucleico, que codifica una proteína transportadora según una de las reivindicaciones 1 a 11 o una composición según una de las reivindicaciones 12 a 21.

Figura 1





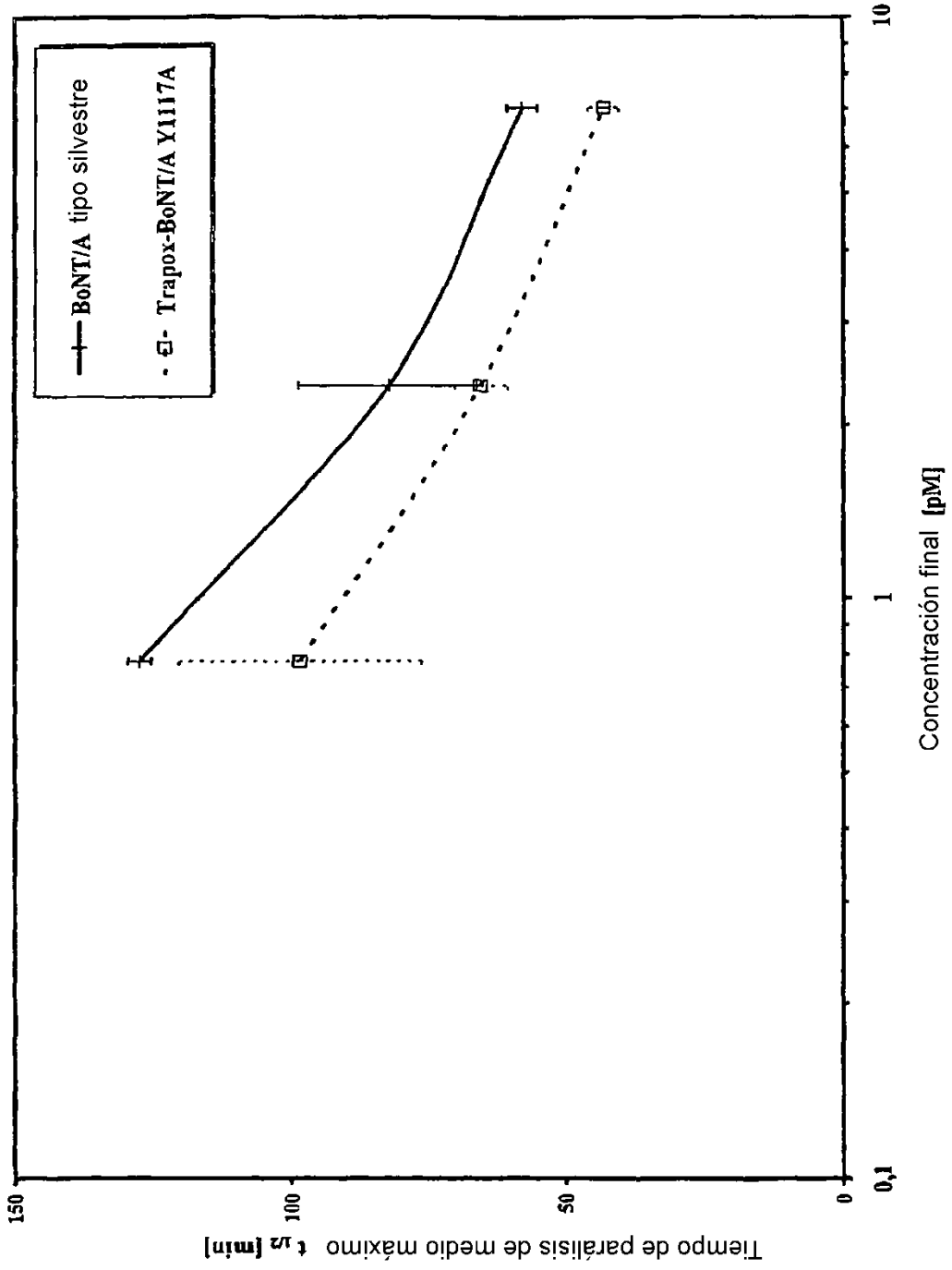


Figura 3

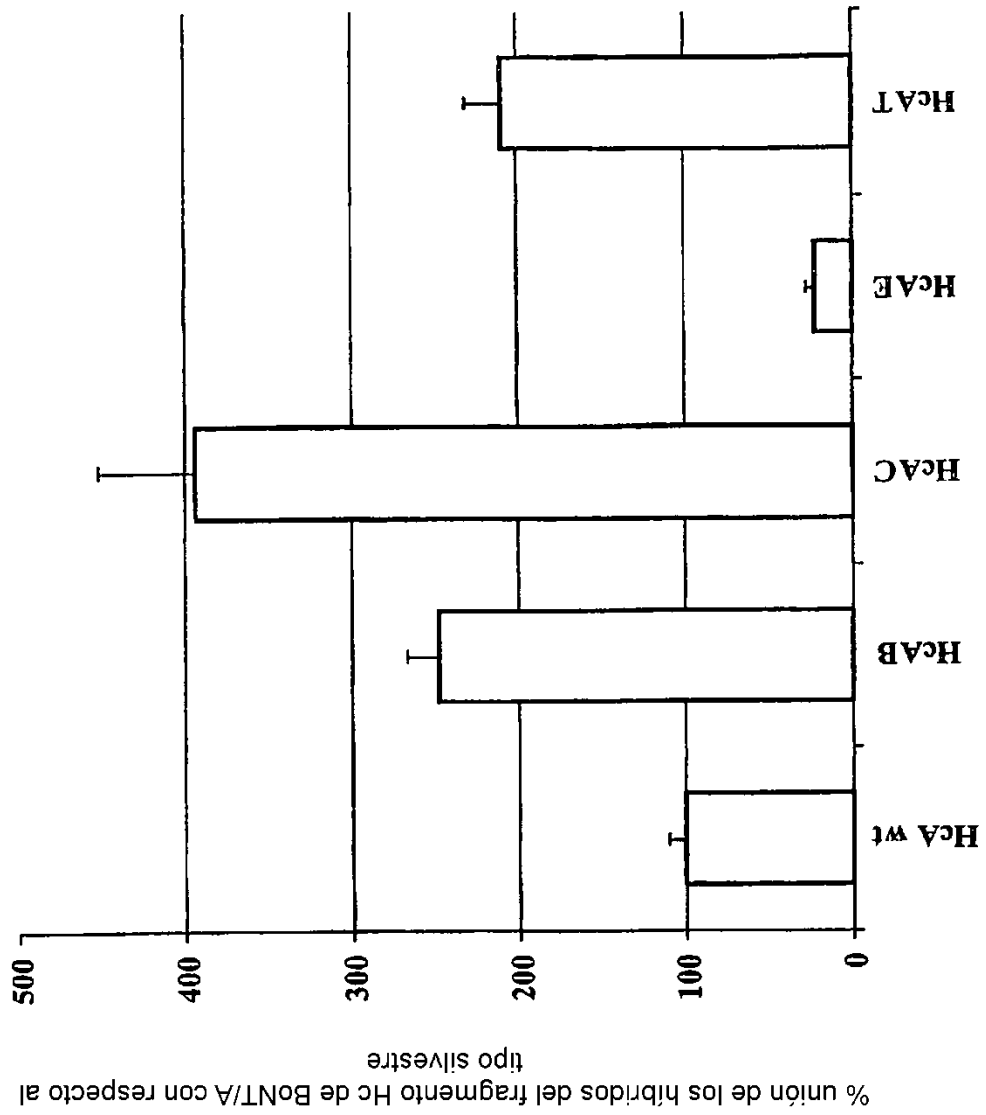


Figura 4

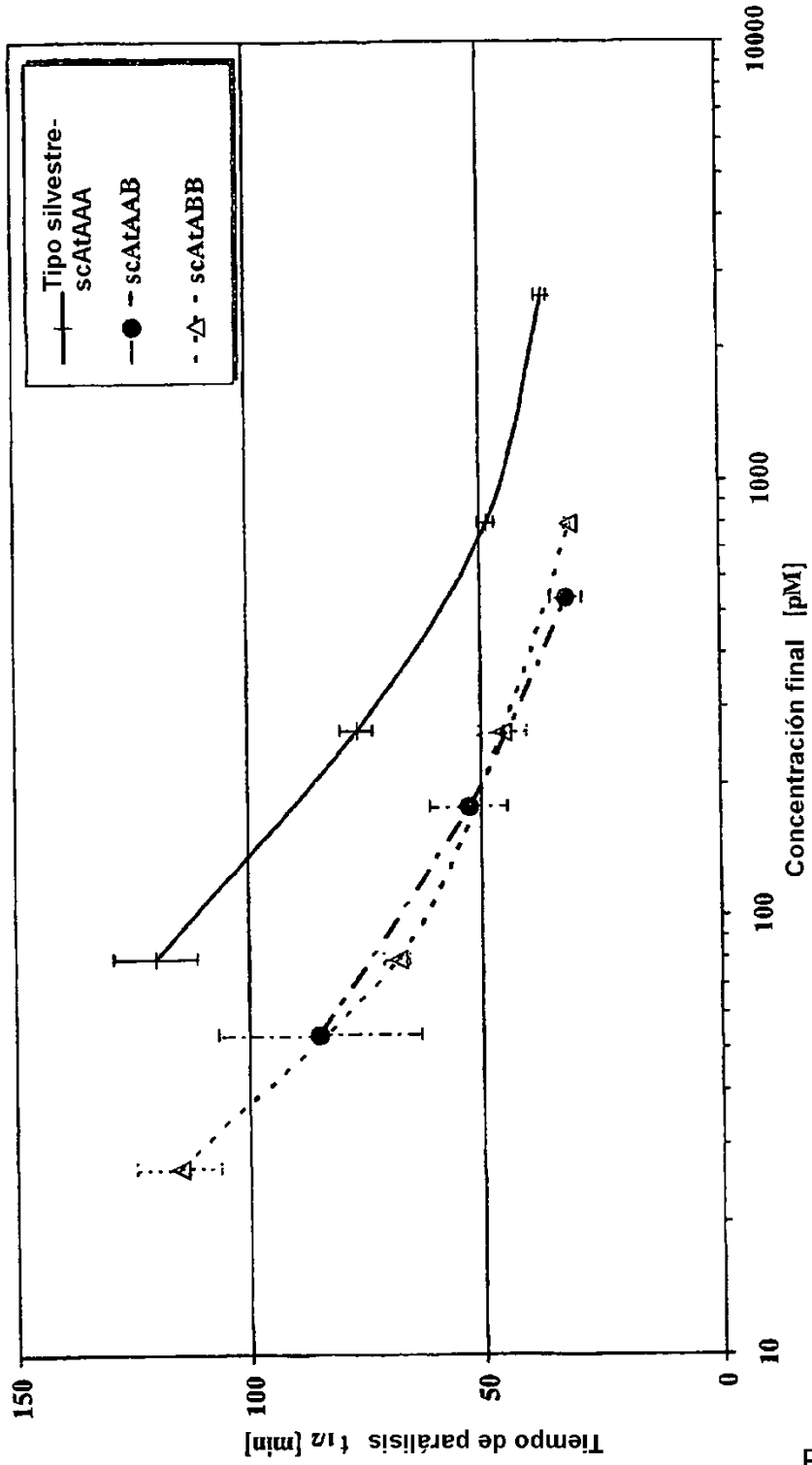


Figura 5