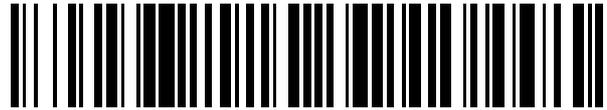


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 303**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2010 E 10765465 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 2491384**

54 Título: **Sistema para la determinación de una neurotoxina tipo A no procesada y parcialmente procesada**

30 Prioridad:

21.10.2009 EP 09173612
21.10.2009 US 279453 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TAYLOR, HAROLD V.;
EISELE, KARL-HEINZ y
BRÜNN, CORNELIA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 449 303 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

Sistema para la determinación de una neurotoxina tipo A no procesada y parcialmente procesada

5 La presente invención se relaciona con herramientas para el control de calidad y de seguridad durante la producción de neurotoxinas. En particular, se relaciona con un método para la determinación de la cantidad de polipéptido de la neurotoxina A (BoNT/A) parcialmente procesado y/o no procesado en una solución que comprende BoNT/A procesado y parcialmente procesado y/o no procesado que comprende las etapas de poner en contacto una muestra de dicha solución con un anticuerpo de captura que se enlaza específicamente con BoNT/A parcialmente procesado y sin procesar bajo condiciones que permiten el enlazamiento de dicho anticuerpo con dicho BoNT/A parcialmente procesado y sin procesar, por medio de lo cual se forma un complejo, y determinar la cantidad del complejo formado, por medio de lo cual la cantidad del complejo es indicativa de la cantidad de BoNT/A parcialmente procesado y/o sin procesar en dicha solución. Además, la presente invención contempla un dispositivo y un kit para llevar a cabo dicho método.

15 *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani* producen neurotoxinas muy potentes, es decir, toxinas botulínicas (BoNT) y toxinas tetánicas (TeNT), respetivamente. Estas neurotoxinas Clostridiales se enlazan específicamente con las células neuronales e interrumpen la liberación del neurotransmisor. Cada toxina se sintetiza como una proteína de cadena simple inactiva sin procesar de 150 kDa aproximadamente. El procesamiento postraduccional involucra la formación de puentes de disulfuro, y proteólisis limitada (de corte) por la(s) proteasa(s) bacteriana(s). Las neurotoxinas activas consisten de dos cadenas, una cadena liviana con terminal N de aproximadamente 50 kDa y una cadena pesada con terminal C de aproximadamente 100 kDa, que se unen a través de un enlace de disulfuro. Las neurotoxinas estructural y funcionalmente consisten de tres dominios, es decir, la cadena liviana catalítica, la mitad del terminal N de la cadena pesada que abarca el dominio de translocación y la mitad del terminal C de la cadena pesada que contiene el(los) sitio(s) de enlazamiento del receptor, véase Krieglstein 1990, Eur J Biochem 188, 39; Krieglstein 1991, Eur J Biochem 202, 41; Krieglstein 1994, J Protein Chem 13, 49. Las neurotoxinas botulínicas se sintetizan como complejos moleculares que comprenden la proteína de la neurotoxina de 150 kDa y proteínas complejantes no tóxicas asociadas. Los tamaños de los complejos difieren con base en la cadena Clostridial y los distintos serotipos de la neurotoxina con intervalos desde 300 kDa, por arriba de 500 kDa, hasta 900 kDa. Las proteínas complejantes no tóxicas en estos complejos estabilizan la neurotoxina y la protegen contra la degradación, véase Silberstein 2004, Pain Practice 4, S19 - S26.

20 La *Clostridium botulinum* secreta siete serotipos antigénicamente diferentes de neurotoxinas designadas desde A hasta G. Todos los serotipos junto con la TeNT relacionada secretada por *Clostridium tetani*, son endoproteasas con Zn^{+2} que bloquean la exocitosis sináptica por escisión de las proteínas SNARE, véase Couesnon, 2006, Microbiology, 152, 759. Las CNT provocan parálisis muscular flácida observada en botulismo y tétanos, véase Fischer 2007, PNAS 104, 10447.

35 A pesar de sus efectos tóxicos, el complejo de la toxina botulínica ha sido usado como un agente terapéutico en un gran número de enfermedades. El serotipo A de la toxina botulínica (BoNT/A) se aprobó para uso en humanos en los Estados Unidos de América en 1989 para el tratamiento del estrabismo, blefaroespasma y otros trastornos y, por lo tanto, es de particular importancia. Se encuentra comercialmente disponible como la preparación de la proteína de BoNT/A, por ejemplo, bajo la marca registrada de BOTOX (Allergan Inc.) o bajo la marca registrada DYSPORT (Ipsen Ltd.). Una preparación de BoNT/A mejorada que está libre de proteínas complejantes se encuentra comercialmente disponible bajo la marca registrada XEOMIN (Merz Pharmaceuticals GmbH). Para aplicaciones terapéuticas, la preparación se inyecta directamente dentro del músculo que va a ser tratado. A pH fisiológico, la toxina se libera del complejo de la proteína y tiene lugar el efecto farmacológico deseado. El efecto de la toxina botulínica solo es temporal, por lo cual puede requerirse la administración repetida de la toxina botulínica para mantener el efecto terapéutico.

45 Las neurotoxinas Clostridiales debilitan la contracción del músculo y son una terapia efectiva para el estrabismo, la distonía focal, incluida la distonía cervical, y el blefaroespasma esencial benigno. También han mostrado alivio en espasmos hemifaciales, y espasticidad focal, y además, de ser efectivas en una gran variedad de otras indicaciones, tales como trastornos gastrointestinales, hiperhidrosis, y corrección cosmética de arrugas, véase Jost 2007, Drugs 67, 669.

50 Durante el proceso de producción de las neurotoxinas Clostridiales, es de particular importancia la determinación cualitativa y cuantitativa así como el control de calidad del polipéptido de la neurotoxina activa. Actualmente las preparaciones de neurotoxina disponibles contienen diferentes cantidades de precursores proteolíticamente no procesados y/o de polipéptidos de la neurotoxina parcialmente procesados además de las neurotoxinas activas (procesadas o maduras) deseadas. El precursor proteolíticamente no procesado o los polipéptidos de la neurotoxina parcialmente procesados difieren de los polipéptidos maduros de la neurotoxina (activos, procesados) solo en unos pocos aminoácidos. Por lo tanto, estos pueden diferenciarse cuantitativamente difícilmente con base en sus propiedades químicas y físicas. Por otra parte, la porción del precursor proteolíticamente no procesado y/o de los

polipéptidos de la neurotoxina parcialmente procesados del contenido total de la proteína aún puede ser significativa en tales preparaciones, es decir, es relevante para la actividad específica de la preparación.

5 Se conocen bien en la técnica los ensayos para la determinación del contenido total de la neurotoxina en una preparación. Estos ensayos se basan en Inmuno-PCR o ELISA tipo Sándwich (Lindstrom 2006, Clin Microbiol. Rev. 19(2): 298 - 314; Volland 2008, J. Immunol Methods 330(1-2): 120 - 129). Sin embargo, como se expuso anteriormente, el contenido de neurotoxinas indeseadas parcialmente procesadas o sin procesar no puede determinarse por medio de la aplicación de estas técnicas para analizar el contenido total de la neurotoxina.

10 Por consiguiente, los medios y los métodos para determinar el contenido de las moléculas de neurotoxina no procesadas o parcialmente procesadas y, en particular, las moléculas de BoNT/A, en una preparación aún no se encuentran disponibles pero sin embargo son altamente deseables.

La presente invención, por lo tanto, se relaciona con un método para la determinación de la cantidad de polipéptido de la neurotoxina A (BoNT/A) no procesado y/o parcialmente procesado en una solución que contiene BoNT/A procesado y parcialmente procesado y / o no procesado que comprende las etapas de:

15 i) poner en contacto una muestra de dicha solución con un anticuerpo de captura que se enlaza específicamente con el BoNT/A no procesado y/o parcialmente procesado bajo condiciones que permiten el enlazamiento de dicho anticuerpo con dicho BoNT/A parcialmente procesado y no procesado, por medio del cual se forma un complejo, y

ii) determinar la cantidad del complejo formado en la etapa i), por lo cual la cantidad del complejo es indicativa de la cantidad de BoNT/A parcialmente procesado y / o no procesado en dicha solución,

en donde el anticuerpo de captura se puede obtener por un método que comprende:

20 a) poner en contacto un antisuero policlonal de un animal que ha sido inmunizado por medio de un inmunógeno peptídico que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 (TKSLDKGYNKA) con los siguientes péptidos de captura SLD, LDK, y YNK bajo condiciones que permiten la formación de los complejos de captura que contienen anticuerpos no específicos comprendidos por el antisuero policlonal y los péptidos de captura;

25 b) remover los complejos de captura del antisuero policlonal;

c) poner en contacto el antisuero policlonal con un péptido que comprende o que consiste esencialmente de la SEQ ID NO: 1 bajo condiciones que permitan la formación de un complejo que comprende el péptido mencionado anteriormente y un anticuerpo se enlaza específicamente con el polipéptido de la neurotoxina no procesado o parcialmente procesado.

30 d) remover el complejo formado en la etapa c) del antisuero; y

e) liberar el anticuerpo que se enlaza específicamente con el polipéptido de la neurotoxina no procesado o parcialmente procesado de dicho complejo.

35 El método de la presente invención puede servirse de la automatización ya sea totalmente o al menos en parte. Esta automatización puede incluir dispositivos robóticos así como también sistemas informáticos que tengan implementado un algoritmo adecuado para la determinación de la cantidad de dicho BoNT/A parcialmente procesado y/o no procesado en dicha solución. Además, el método de la invención puede comprender etapas adicionales llevadas a cabo previamente, después o entre las etapas i) y ii). Tales etapas adicionales, en un aspecto, pueden incluir las etapas de tratamiento previo de la muestra, etapas de lavado o purificación así como también etapas de minería de datos. En un aspecto, dichas etapas adicionales incluyen aquellas a que se hace referencia en los

40 Ejemplos acompañantes más adelante.

El término "polipéptido de la neurotoxina A (BoNT/A) no procesado y/o parcialmente procesado" como se usa en la presente invención se refiere a los polipéptidos del serotipo A de la neurotoxina que aún no están maduros, es decir, que no han sido procesados en el polipéptido bicatenario maduro a partir del precursor monocatenario o que ha sido simplemente parcialmente procesado. El BoNT/A es uno de los siete serotipos de las neurotoxinas botulínicas. Se produce como una molécula precursora monocatenaria que es proteolíticamente procesada después de la traducción. La molécula monocatenaria comprende una cadena liviana en el terminal N, un péptido de enlace, y una

45 cadena pesada en el terminal C. Durante el procesamiento proteolítico de la molécula monocatenaria, el péptido de enlace se corta para que se genera una molécula bicatenaria madura que comprende la cadena pesada y liviana pero que carece del péptido de enlace. El péptido de enlace, por consiguiente, está flanqueado por dos sitios de escisión de la proteasa. Por lo tanto, durante el proceso de activación proteolítica, se formarán moléculas

50

parcialmente procesadas. Estas moléculas parcialmente procesadas se escinden simplemente en uno de los sitios de flanqueo de escisión de la proteasa a fin de que el péptido de enlace esté aun enlazado ya sea a la cadena liviana o la pesada. Tales moléculas son llamadas polipéptidos de BoNT/A parcialmente procesados para los propósitos de la presente invención.

5 Como resultado del procesamiento apropiado, se obtiene "BoNT/A procesado". Dicho polipéptido de BoNT/A procesado exhibe las propiedades biológicas características de una neurotoxina, a saber, (a) enlazamiento del receptor, (b) internalización, (c) translocación de la cadena liviana a través de la membrana endosomal en el citosol, y/o d) escisión endoproteolítica de las proteínas involucradas en la fusión sináptica de la membrana de la vesícula. Por lo tanto, el polipéptido de BoNT/A procesado algunas veces se denomina en la presente invención como polipéptido activo o maduro de la neurotoxina. La actividad biológica, en un aspecto, resulta de todas las propiedades biológicas mencionadas anteriormente. Los ensayos *in vivo* para evaluar la actividad biológica incluyen el ensayo de LD50 de ratón y el ensayo de hemidiafragma de ratón *ex vivo* como se describe por Pearce 1994, Toxicol Appl Pharmacol 128: 69 - 77 y Dressler 2005, Mov Disord 20: 1617 - 1619. La actividad biológica se expresa comúnmente en Unidades Ratón (MU). Como se usa en la presente invención 1 MU es la cantidad de componente neurotóxico, que mata el 50% de una población específica de ratones después de una inyección intraperitoneal, es decir, la LD50 intraperitoneal de ratón.

En un aspecto, la BoNT/A se obtiene de la cepa Hall del *Clostridium botulinum* y, en un aspecto adicional, tiene una estructura (es decir, una secuencia de aminoácidos) como se revela en Beecher 1997, J Protein Chem 16: 701 - 712 o Krieglstein 1994, J Protein Chem 13: 49 - 57. Además, los aminoácidos y las secuencias de ácido nucleico que codifican la BoNT/A se encontrarán bajo los números de acceso del GenBank ABD65472.1 o GI:89258592 o se muestran en las SEQ ID NOs: 2 o 3, respectivamente. Los sitios de escisión de la proteasa que flanquea el péptido de enlace están, en un aspecto, entre los aminoácidos K438/T439 y K448/A449. En consecuencia, el péptido de enlace consiste esencialmente del aminoácido T439 al aminoácido K448.

Sin embargo, el método de la presente invención también abarca las variantes de BoNT/A mencionada anteriormente. Dichas variantes, en un aspecto, son polipéptidos de neurotoxina que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una adición, sustitución y/o supresión de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de BoNT/A como se muestra en la SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 3. Aun en otro aspecto, las neurotoxinas variantes comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos 40% idéntica a la secuencia de aminoácidos de BoNT/A como se muestra en la SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 3. Las secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente muestran la secuencia de aminoácidos del polipéptido de BoNT/A sin procesar. Las secuencias de los polipéptidos correspondientes de la neurotoxina parcialmente procesados o sin procesar pueden deducirse de dichas secuencias por medio de la información sobre los sitios de escisión y el péptido de enlace proporcionado en alguna parte en la presente invención. En otro aspecto de la invención, el polipéptido de BoNT/A variante tiene una secuencia de aminoácidos que es una secuencia al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la secuencia del aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3. Idéntica, como se utiliza en la presente invención se refiere a la identidad de secuencia de las secuencias de aminoácido en donde las secuencias se alinean a fin de obtener el mayor número de coincidencias. Esto puede lograrse por medio del uso de técnicas o métodos publicados, codificados en programas informáticos tal como, por ejemplo, BLASTP, BLASTN, FASTA, Altschul 1990, J Mol Biol 215, 403. Los valores de identidad en porcentaje, en un aspecto, se calculan sobre toda la secuencia de aminoácidos. Una serie de programas basados en una variedad de algoritmos está disponible para la persona cualificada en la técnica para la comparación de secuencias diferentes. En este contexto, los algoritmos de Needleman y Wunsch o de Smith y Waterman proporcionan resultados particularmente confiables. Para realizar las alineaciones de las secuencias, se deben utilizar el programa PileUp (1987, J Mol Evolution 25, 351; Higgins 1989 CABIOS 5, 151) o los programas Gap y BestFit (Needleman 1970, J Mol Biol 48: 443; Smith 1981, Adv Appl Math 2, 482), que hacen parte del paquete de programas informáticos de GCG (Genetics Computer Group 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EUA 53711). Se deben determinar los valores de identidad de secuencia citados anteriormente en porcentaje (%), en un aspecto de la invención, utilizando el programa GAP sobre toda la región de la secuencia con los siguientes parámetros: peso del hueco: 50, peso del tramo: 3, coincidencias en promedio: 10.000 y falta de coincidencia en promedio: 0,000, que, a menos que se indique otra cosa, siempre se utilizan como parámetros estándar para los alineamientos de las secuencias.

Se entenderá que las variantes mencionadas anteriormente deben, en un aspecto de la invención, retener, al menos uno, y, en un aspecto todas las propiedades biológicas de BoNT/A. Se prevé en un aspecto adicional que los polipéptidos variante de BoNT/A parcialmente procesados y sin procesar puede enlazarse específicamente con el anticuerpo para ser aplicados en el método de la invención. En un aspecto, esto puede lograrse por la presencia de una secuencia del péptido que comprende la SEQ ID NO: 1 en el péptido de enlace.

En un aspecto adicional, las variantes de BoNT/A pueden ser neurotoxinas que tienen propiedades biológicas mejoradas o alteradas, por ejemplo, pueden incluir sitios de escisión que se mejoran para el reconocimiento enzimático o pueden mejorarse para el enlazamiento al receptor o cualquier otra propiedad especificada anteriormente.

- 5 En general, es concebible modificar el método de la presente invención ya que el concepto fundamental recae en la presencia de al menos un sitio de escisión entre la cadena liviana y pesada del péptido de la neurotoxina aunque la naturaleza de los sitios de escisión y la secuencia del aminoácido particular entre ellos no importa mientras el anticuerpo que se aplica en el método sea capaz de reconocer específicamente los polipéptidos de la neurotoxina parcialmente procesado o no procesado. Por consiguiente, otro aspecto es aplicar neurotoxinas variantes en donde se han reemplazado los sitios de reconocimiento de la proteasa y/o el péptido de enlace entre la cadena pesada y liviana. Se entenderá que el anticuerpo que se aplica en este aspecto aún debe enlazarse específicamente con el péptido de enlace o un epítipo del mismo.

- 15 Aun en otro aspecto, el péptido de enlace de BoNT/A que comprende la SEQ ID NO: 1 puede introducirse, por ejemplo, por medio de técnicas de recombinación de ácido nucleico, en el enlazador de otros serotipos de neurotoxina y la cantidad de polipéptidos no procesados y parcialmente procesados de dichos otros serotipos de neurotoxina se puede determinar en una muestra por medio de la aplicación del método de la presente invención.

El término "cantidad" como se usa en el método de la presente invención abarca la cantidad absoluta de un polipéptido, la cantidad relativa o la concentración de dicho polipéptido así como cualquier valor o parámetro que se correlacione con la misma o pueda derivarse de la misma.

- 20 El término "solución" como se usa en la presente invención se refiere a cualquier sistema disolvente que contiene polipéptidos maduros de BoNT/A y los precursores del polipéptido de BoNT/A parcialmente procesado y/o no procesado. El sistema disolvente comprende además un solvente. Los solventes abarcados, en diferentes aspectos de la invención, son agua, sistemas amortiguadores acuosos, solventes orgánicos, y líquidos iónicos. En un aspecto de la invención, este es un sistema disolvente acuoso. Adicionalmente, el sistema disolvente, además del polipéptido maduro de BoNT/A y el polipéptido precursor parcialmente procesado o no procesado y el disolvente pueden comprender también moléculas adicionales, incluyendo otros polipéptidos bacterianos. En un aspecto, la solución que se aplica en el método de la presente invención será un cultivo celular bacteriano o una preparación parcialmente purificada o purificada obtenida de tal cultivo celular bacteriano.

- 30 El término "muestra" como se usa en la presente invención se refiere a una porción de dicha solución que será investigada por medio del método de la invención. Se entenderá que la muestra también incluirá BoNT/A y los precursores de BoNT/A parcialmente procesados y/o no procesados. En un aspecto del método de la invención, dicha muestra tiene un volumen predefinido y/o un contenido proteínico total predefinido. En un aspecto adicional, la muestra puede comprender estándares moleculares suministrados en forma exógena.

- 35 Poner en contacto una muestra de la solución con el anticuerpo de captura como se usa de acuerdo con el método de la invención se refiere a poner en proximidad física los polipéptidos de BoNT/A no procesados y/o parcialmente procesados mencionados anteriormente contenidos en la muestra y el anticuerpo de captura a fin de permitir la interacción física y/o química. Las condiciones adecuadas para permitir la interacción específica son, en principio, bien conocidas por una persona con experiencia en la técnica. Dichas condiciones dependerán de los anticuerpos y la solución que se aplicará en el método de la presente invención y pueden ser adaptadas por personas con experiencia ordinaria sin más. Además, un tiempo que sea suficiente para permitir la interacción también puede ser determinado por el trabajador con experiencia sin más. Se entenderá que dicho tiempo dependerá de factores exógenos bajo los cuales se realiza el método tales como temperatura, composición del solvente, valor del pH, etc. Además, se entienden llevar a cabo las etapas individuales de poner en contacto citadas en el método de la presente invención, se pueden llevar a cabo las etapas de lavado a fin de obtener condiciones adecuadas para el contacto. Por ejemplo, después de la formación de un complejo en la etapa i), la solución restante debe eliminarse antes de la aplicación del agente de detección para dicho complejo.

- 50 En un aspecto del método de la presente invención, un detergente está presente durante la etapa i). Por consiguiente, se prevé que antes o durante la etapa i) se añade un detergente a la muestra. Los detergentes adecuados incluyen detergentes iónicos y no iónicos. En un aspecto, el detergente es un detergente no iónico, y, aun en otro aspecto, Tween 20.

En un aspecto del método de la presente invención, dicho detergente está presente en una concentración en el intervalo de 0,01% (v/v). En otro aspecto, dicha concentración está en el intervalo de 0,2% (v/v) a 0,8% (v/v) o en el intervalo de 0,3% (v/v) a 0,6% (v/v), y, aun en otro aspecto, la concentración es de 0,5% (v/v).

- 55 En un aspecto adicional del método de la presente invención, dichas condiciones en la etapa i) comprenden la presencia de una solución salina amortiguada con fosfato o amortiguada con tris. En un aspecto, dicha solución

salina comprende NaCl en una concentración en el intervalo de 150 a 350 mM. Aun en otro aspecto, la concentración está en el intervalo de 200 a 300 mM, y, aun en otro aspecto, la concentración es 250 mM.

El término “determinación de la cantidad” como se usa en la presente invención se refiere a la medición de la cantidad absoluta, la cantidad relativa o concentración en una forma cuantitativa o semicuantitativa. La medición se hará con base en las propiedades químicas, físicas o biológicas del complejo formado en la etapa i). Dicha cantidad de dicho complejo puede determinarse directa o indirectamente. En un aspecto, se aplicará un agente de detección, el cual interactúa con los complejos formados. El agente de detección comprenderá o generará una etiqueta detectable que se correlaciona con la cantidad de los complejos detectados y, de esta forma, permite determinar la cantidad de los mismos. En un aspecto, dicho agente de detección se enlaza con el anticuerpo de captura o BoNT/A no procesado o parcialmente procesado presente en los complejos. Por consiguiente, en un aspecto adicional, el agente de detección es un anticuerpo, péptido de enlazamiento (por ejemplo, un receptor de BoNT/A o una parte del mismo), aptámero o compuesto molecular pequeño que se enlaza ya sea con el anticuerpo de captura o con BoNT/A parcialmente procesado o no procesado o ambos cuando está presente en el complejo formado en la etapa i).

Un agente de detección, en un aspecto, comprende una etiqueta detectable. En un aspecto, un marcador detectable tiene propiedades fluorescentes o quimioluminiscentes y, de esta forma, permite una detección directa del agente de detección. Los marcadores fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, Rojo Texas, Fluoresceína, y los colorantes Alexa (por ejemplo, Alexa 568). Aun en otro aspecto, el marcador puede ser un marcador radioactivo. Los marcadores radioactivos típicos incluyen ^{35}S , ^{125}I , ^{32}P , ^{33}P y similares. Aun en otro aspecto, el agente de detección puede comprender una actividad enzimática que es capaz de generar una señal detectable, por ejemplo, por conversión de un sustrato. Típicamente, tal enzima puede ser una peroxidasa (por ejemplo, peroxidasa de rábano), luciferasa de luciérnaga o fosfatasa alcalina. Los marcadores del tipo mencionado anteriormente pueden acoplarse directamente (de forma covalente o no covalente) con el agente de detección. Además de dicha marcación directa, el agente de detección puede marcarse indirectamente en otro aspecto del método de la invención. Dicha marcación indirecta involucra en enlazamiento (covalente o no covalente) de un agente que se enlaza específicamente con el agente de detección y que porta un marcador detectable. Tal agente puede ser, por ejemplo, un anticuerpo secundario (orden superior) que se enlaza específicamente con el agente de detección. El anticuerpo secundario en tal caso se acoplará con un marcador detectable. Se entenderá que pueden utilizarse además otros anticuerpos de orden superior para la detección de los complejos de detección. Los anticuerpos de orden superior frecuentemente se usan para incrementar la señal. Los anticuerpos adecuados de orden superior también pueden incluir sistemas de marcación comercialmente disponibles tales como el sistema estreptavidina - biotina (Vector Laboratories, Inc.), el sistema LSAB^{MR} 2 y LSAB^{MR} + de Dako (marcado con estreptavidina - biotina), o el sistema PAP de Dako (peroxidasa - antiperoxidasa).

Se entenderá que la cantidad de marcador detectable comprendida o generada por el agente de detección se correlaciona directamente con la cantidad de los complejos. La cantidad de los complejos de nuevo se correlaciona con la cantidad de especies moleculares que se van a determinar, es decir, con las moléculas de neurotoxina no procesadas y/o parcialmente procesadas presentes en la muestra. Se entenderá, además, que la muestra es una porción representativa de la solución. Por consiguiente, la cantidad de los polipéptidos de BoNT/A no procesados y/o parcialmente procesados determinada para la muestra es indicativa de la cantidad presente en la solución.

La determinación de la cantidad de los polipéptidos de neurotoxina sin procesar o parcialmente procesados, en un aspecto, también requieren la calibración del método por medio de soluciones estándar con cantidades predefinidas de dichos polipéptidos. El personal capacitado en el arte sabrá cómo realizar una calibración. En un aspecto, se llevan a cabo diferentes determinaciones mediante la aplicación del método de la presente invención para muestras de dos o más de las soluciones estándar mencionadas anteriormente que difieren en la cantidad predefinida de neurotoxinas no procesadas y/o parcialmente procesadas.

Por consiguiente, en un aspecto del método de la presente invención, dicha etapa ii) comprende la comparación de la cantidad determinada del complejo con una referencia. En un aspecto, la referencia es una curva de calibración derivada de dos o más soluciones estándar como se describió anteriormente. Como resultado de la comparación, las cantidades determinadas del complejo pueden asignarse a cantidades predefinidas de polipéptidos de BoNT/A no procesados y/o parcialmente procesados.

Los polipéptidos de BoNT/A no procesados se pueden obtener de un mutante de *Clostridium botulinum* que expresa precursores del polipéptido de BoNT/A que son mutados en los sitios de escisión por la proteasa. Tales mutantes pueden ser generados por medio de técnicas estándar de biología molecular bien conocidas en la técnica. Además, la BoNT/A sin procesar puede obtenerse al expresar dicha BoNT/A en forma recombinante en *E. coli* o en otras bacterias que carezcan de una proteasa capaz de activar la BoNT/A por medio de escisión proteolítica. En otro aspecto, las células bacterianas de *Clostridium botulinum* u otros sistemas de expresión pueden ser mutados a fin de cribar los mutantes que tengan actividad de proteasa significativamente reducida o incluso sin ella, y, de esta forma, únicamente produzcan neurotoxinas sin procesar.

El método de la presente invención requiere un anticuerpo de captura el cual se enlace específicamente con los polipéptidos de BoNT/A no procesados y/o parcialmente procesados. Tal anticuerpo, en un aspecto, puede ser obtenido por un método mencionado anteriormente que comprende las etapas a) hasta e) referidas anteriormente. Los términos usados en este contexto se explican adicionalmente a continuación.

5 El término "anticuerpo" como se usa en la presente invención abarca un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo de humano, humanizado, primatizado o quimerizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo sintético, derivados química o enzimáticamente modificados, un fragmento de cualquiera de dichos anticuerpos o aptámeros que consisten de ácidos nucleicos que se presentan naturalmente y/o químicamente modificados. Los fragmentos de dichos anticuerpos incluyen fragmentos F(ab')₂, F(ab), Fv o scFv o
10 derivados química o enzimáticamente modificados de cualquiera de estos fragmentos. El anticuerpo de la presente invención se enlazará específicamente con el epítipo que consiste del péptido mencionado anteriormente si dicho péptido está compuesto por el polipéptido de neurotoxina parcialmente procesado o no procesado.

El término "enlaza específicamente" significa que el anticuerpo de la presente invención no reacciona de forma cruzada en un grado significativo con otros epítipos ya sea sobre dichos polipéptidos de neurotoxina parcialmente
15 procesados o no procesados, o sobre otros polipéptidos en general. En un aspecto de la invención, el anticuerpo de la presente invención no reacciona de forma cruzada con dicho polipéptido de neurotoxina activo completamente procesado. La especificidad del epítipo es una característica importante del anticuerpo de la presente invención. La especificidad del anticuerpo con respecto a la neurotoxina parcialmente procesada o no procesada frente a la neurotoxina procesada será, en un aspecto, al menos del 95%, al menos del 96%, al menos del 97%, al menos del
20 98%, al menos del 99%. El enlazamiento específico puede probarse por medio de diferentes técnicas bien conocidas que incluyen, por ejemplo, estudios de competición o análisis de transferencias tipo Western de SDS PAGE. Otra característica importante es la sensibilidad del anticuerpo. La sensibilidad es, en un aspecto de la invención, tal que al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% de la neurotoxina procesada compuesta por una muestra, está enlazada. La sensibilidad puede probarse por medio de técnicas bien conocidas. Aquellas personas capacitadas en la técnica serán capaces de determinar las condiciones operativas y óptimas del ensayo para cada determinación empleando experimentación de rutina. Las técnicas convencionales para estudios de enlazamiento incluyen radioinmunoanálisis, ELISA, diálisis de equilibrio, microcalorimetría isotérmica, análisis BIACORE®, resonancia de plasmones superficiales (SPR), u otros métodos de adsorción superficial. Las propiedades de enlazamiento tales como sensibilidad de un anticuerpo de la presente invención pueden, en principio, ser
25 determinadas por estudios de enlazamiento utilizando un antígeno inmovilizado (el ligando) presente sobre una superficie de un sensor. El anticuerpo que va a ser analizado (el analito) será proporcionado en la fase móvil, es decir, en una solución. En algunos casos, el antígeno se une directamente a la superficie a través del enlace con otra molécula inmovilizada que se denomina como la molécula de captura. Cuando se inyecta el anticuerpo en un pulso discreto a través de la superficie con los antígenos inmovilizados, esencialmente puede subdividirse en tres
30 fases: (i) Asociación del anticuerpo con el antígeno durante la inyección de la muestra; (ii) Equilibrio o estado estacionario durante la inyección de la muestra, donde la velocidad de enlazamiento del anticuerpo se equilibra por medio de la disociación del complejo anticuerpo-antígeno; (iii) Disociación del anticuerpo de la superficie durante el flujo del amortiguador. Se entenderá que puede llevarse a cabo alternativamente un análisis con anticuerpos inmovilizados que son investigados y una solución que contiene antígeno como la fase móvil. Las fases de asociación y disociación proporcionan información de la cinética de la interacción analito - ligando (k_a y k_d , las velocidades de formación y disociación del complejo, $k_d / k_a = K_D$). La fase de equilibrio proporciona información sobre la afinidad de la interacción analito - ligando (K_D). En un aspecto de la invención, el anticuerpo de la presente invención tiene un K_D menor de 0,5 μM y, en un aspecto, menor de 0,05 μM y, en otro aspecto, menor de 0,02 μM .

45 El anticuerpo que se aplicará en el método de la invención, en un aspecto, permite la detección del polipéptido de neurotoxina parcialmente procesado y/o no procesado con una alta sensibilidad y especificidad, en un aspecto con un límite de detección de < 1000 pg/mL, < 300 pg/mL, < 100 pg/mL, en un aspecto de 50 a 80 pg/mL, y aun en otro aspecto 69 pg/mL. En un aspecto adicional, el límite de detección puede ser incluso < 30 pg/mL, < 10 pg/mL, < 3 pg/mL, y, en un aspecto alrededor de o < 1 pg/mL.

50 El anticuerpo a que se hace referencia en la presente invención puede fabricarse utilizando métodos que se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse por medio de técnicas originalmente descritas en Köhler 1975, Nature 256, 495 y Galfré 1981, Meth Enzymol 73, 3. Dichas técnicas comprenden la fusión de células de mieloma de ratón con células del bazo derivadas de mamíferos inmunizados. Los anticuerpos además pueden mejorarse por medio de técnicas bien conocidas en el arte. Por ejemplo, por resonancia de plasmones superficiales como se
55 emplea en el sistema BIOCORE® que puede utilizarse para incrementar la eficiencia de anticuerpos de fago que se enlazan con el epítipo mencionado anteriormente dentro del polipéptido de neurotoxina proteolíticamente no procesado, véase Schier 1996, Human Antibodies Hybridomas 7, 97; Malmberg 1995, J. Immunol Methods 183, 7.

El término "inmunógeno peptídico" como se uso anteriormente se refiere a un oligopéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 que se proporciona en una forma tal que permita provocar una respuesta inmune en un animal no humano.

5 En un aspecto, dicho péptido que tiene la SEQ ID NO: 1 se acopla con una proteína portadora a través de cualquier enlazador o procedimiento de enlazamiento conocidos en la técnica.

10 En otro aspecto, dicho inmunógeno comprende además KLH. En un aspecto adicional, dicho KLH se enlaza con el péptido que tiene la SEQ ID NO: 1 por medio del enlazador éster de N-[gama-maleimidobutiriloxi]succinamida (GMBS). Aun en un aspecto adicional, dicho KLH se enlaza por medio de una cisteína y, en un aspecto una cisteína del terminal C, con el péptido que tiene la SEQ ID NO: 1 por medio del enlazador GMBS. Se conoce bien en el arte cómo enlazar el KLH con un péptido por medio de una molécula enlazadora tal como GMBS o se describe en los Ejemplos acompañantes a continuación.

15 En otro aspecto, se puede usar ovoalbúmina como un inmunógeno. Dicha ovoalbúmina se enlazará de forma cruzada por medio del enlazador sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) con un residuo de cisteína, en un aspecto, con un residuo de cisteína del terminal C. En este aspecto, se prevé el uso de un pentapéptido que consiste de aminoácidos X a Y de la SEQ ID NO: 1 al cual se añade la cisteína anteriormente mencionada en el terminal C.

20 En otro aspecto el animal no humano es un mamífero, en un aspecto una rata, ratón, conejo, oveja o cabra. Antes de llevar a cabo el método de la invención, un animal no humano que es la fuente del antisuero policlonal será inmunizado utilizando el inmunógeno peptídico mencionado anteriormente. Cómo inmunizar un animal no humano se conoce bien en la técnica y se describe en los Ejemplos acompañantes, más adelante. Como resultado de dicha inmunización, el animal no humano producirá anticuerpos policlonales contra el inmunógeno peptídico.

25 Se puede obtener un antisuero policlonal a partir del animal no humano por medio de diferentes técnicas. En un aspecto se obtiene de la sangre, suero, o plasma por medio de técnicas estándares bien conocidas en el arte y se describe en los Ejemplos acompañantes, más adelante. El término "antisuero policlonal", por lo tanto, incluye sueros purificados y parcialmente purificados de dicho animal. Tal antisuero policlonal es el material de partida para el método mencionado anteriormente. Además de los uno o más anticuerpos deseados que se enlazan específicamente con un polipéptido de BoNT/A no procesado y parcialmente procesado, el antisuero policlonal puede comprender anticuerpos adicionales que no se enlazan específicamente con un polipéptido de BoNT/A no procesado y parcialmente procesado.

30 Estos anticuerpos de reactividad cruzada no deseados se separan de los anticuerpos específicos deseados al poner en contacto dicho antisuero policlonal con los polipéptidos de captura SLD, LDK y YNK bajo condiciones que permiten la formación de complejos de captura que contienen anticuerpos no específicos compuestos por el antisuero policlonal y los péptidos de captura y la remoción de los complejos de captura del antisuero policlonal a fin de obtener un antisuero policlonal parcialmente purificado. Los péptidos de captura mencionados anteriormente pueden aplicarse en el método, en un aspecto, en forma de sus derivados divulgados en los Ejemplos acompañantes, más adelante.

40 Dicho antisuero policlonal parcialmente purificado posteriormente se pone en contacto con un péptido que tiene también una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, dicho péptido se inmoviliza sobre un portador como se describe en detalle en otra parte en la presente invención. Como resultado de dicho contacto, se forma un complejo del péptido y los anticuerpos específicos que posteriormente puede ser removido del suero policlonal restante. Los anticuerpos específicos pueden ser liberados entonces del complejo removido. Las técnicas adecuadas para la liberación de los anticuerpos de dicho complejo se describen en otra parte en la presente invención.

45 En un aspecto, las etapas a) hasta e) del método para obtener el anticuerpo se llevan a cabo por medio de cromatografía de afinidad. La cromatografía de afinidad como se usa en la presente invención, se refiere a una técnica para separar moléculas en una fase móvil con base en sus diferentes afinidades por una fase estacionaria usada en la cromatografía. En un aspecto, dicha técnica se refiere a la absorción selectiva y la recuperación posterior de un compuesto de un ligando inmovilizado. En otro aspecto, dicha técnica se diseña para la purificación altamente específica y eficiente de proteínas y compuestos relacionados utilizando ligandos selectivos apropiados sobre matrices en forma de cuentas y porosas para el enlazamiento de los compuestos objetivos, que después pueden recuperarse bajo condiciones suaves. Dicha técnica se basa en una interacción altamente específica tal como aquella entre el antígeno y el anticuerpo, la enzima y el sustrato, o el receptor y el ligando. En otro aspecto, dicha cromatografía de afinidad se lleva a cabo como cromatografía en columna. La cromatografía de afinidad como se caracterizó en detalle anteriormente es en un aspecto, cromatografía inmunoabsorbente y cromatografía por interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de fase inversa, y en otro aspecto, la cromatografía de inmunoafinidad

55 que aplica el agente de enlazamiento que es incluso en un aspecto adicional, el anticuerpo de la presente invención.

Una fase estacionaria como la mencionada en la presente invención, en un aspecto consiste del agente mencionado anteriormente como una matriz sólida. Dicho agente en un aspecto, se enlaza con un portador polipeptídico acoplado a una matriz sólida, y en otro aspecto, se enlaza a una Proteína A acoplada a una matriz sólida.

5 Para llevar a cabo el método de la invención, el anticuerpo de captura se puede acoplar en forma covalente o no covalente con un soporte sólido. Los materiales para tales soportes sólidos se conocen bien en la técnica e incluyen, entre otros, matrices de polisacárido comercialmente disponibles seleccionadas del grupo que consiste de: sefarosa, sefadex; agarosa, sefacel, microcelulosa, y perlas de alginato, matrices de polipéptido, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas metálicas coloidales, vidrio, chips plásticos y/o de silicio, y superficies, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracitos, pozos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico. En un aspecto de la invención, dicho soporte sólido se elabora de poliestireno irradiado con rayos gama. Dependiendo de las aplicaciones pretendidas, el soporte sólido puede estar compuesto por o tener la forma de viales separados. Alternativamente, el soporte sólido puede estar compuesto por o tener la forma de placas de pozos múltiples. Dependiendo del soporte sólido, puede ser necesario llevar a cabo etapas de bloqueo antes de la aplicación del soporte sólido en el método de la presente invención a fin de bloquear los sitios de enlazamiento libres del soporte sólido para péptidos y proteínas.

20 Ventajosamente, el método de la presente invención permite la determinación específica de las moléculas precursoras de BoNT/A, es decir, BoNT/A de cadena simple no procesada y/o BoNT/A parcialmente procesada. Estas moléculas precursoras son contaminantes generalmente indeseables en las preparaciones de BoNT/A que se aplicarán para propósitos terapéuticos o cosméticos. Por consiguiente, se reduce su contenido hasta una cantidad mínima. El método de la presente invención permite establecer un control de calidad eficiente y un manejo seguro del producto para la fabricación de las preparaciones de BoNT/A. Además, la eficacia de las etapas de purificación y/o procesamiento puede monitorearse cuando se fabrican las preparaciones de BoNT/A. En los estudios subyacentes de la invención, surgió un suero policlonal contra una neurotoxina botulínica de tipo A no procesada (BoNT/A), utilizando el péptido enlazador acoplado a KLH como inmunógeno (péptido antienlazador de scBoNT/A-suero) en cabras. Aun después de la purificación por afinidad, el suero mostró reactividad cruzada hacia BoNT/A procesada en un análisis de transferencia tipo Western de SDS PAGE. Se demostró que la reactividad cruzada depende del reconocimiento de tripéptidos (SLD, LDK y YNK), lo cual ocurre en el péptido enlazador, así como, en las cadenas livianas y pesadas de BoNT/A procesada. Se purificó un segundo lote del inmunosuero de cabra por medio de cromatografía de afinidad en dos etapas, removiendo los anticuerpos de tripéptidos con reactividad cruzada. El segundo péptido antienlazador de scBoNT/A - suero no mostró reactividad cruzada contra la BoNT/A procesada en una transferencia tipo Western.

En un aspecto, el método de la presente invención que comprende las etapas generales mencionadas anteriormente comprende además las siguientes etapas específicas:

- 35 1) Inmovilización sobre un soporte sólido (por ejemplo, una placa de pozos múltiples), los anticuerpos de captura obtenidos por el método mencionado anteriormente;
- 2) Remover por lavado los anticuerpos de captura no inmovilizados;
- 3) El bloqueo de los sitios de enlazamiento de péptido/proteína sobre un soporte sólido por medio de la aplicación de un amortiguador de bloqueo adecuado (véanse los Ejemplos más adelante);
- 4) Remover el amortiguador de bloqueo por lavado;
- 40 5) Aplicar muestras de las soluciones que se van a analizar o de soluciones estándar utilizadas para calibración bajo condiciones que permitan la formación del complejo de captura;
- 6) Remover por lavado el material de la muestra no enlazado;
- 7) Aplicar un agente de detección (por ejemplo, un primer y, opcionalmente, un anticuerpo de detección de orden superior que se acople directa o indirectamente a una enzima tal como peroxidasa) bajo condiciones que permitan la formación de un complejo de detección;
- 45 8) Remover por lavado el agente de detección no enlazado;
- 9) Determinar la señal de detección producida por el agente de detección (por ejemplo, por medio de la aplicación de un sustrato cromogénico al complejo de detección y medir la conversión del sustrato por medio de la determinación de la densidad óptica).

Se entenderá, sin embargo, que el método de la invención también puede implementarse por medio de cualquier otras etapas específicas que pudieran derivarse de lo anterior.

La presente invención también contempla un dispositivo para la determinación de la cantidad del polipéptido de neurotoxina A (BoNT/A) no procesado y/o parcialmente procesado en una solución que comprende polipéptidos de BoNT/A procesados y parcialmente procesados y/o no procesados que comprende:

i) una unidad de análisis que comprende un anticuerpo de captura como se especificó anteriormente en donde la unidad de análisis permite poner en contacto una muestra de dicha solución con dicho anticuerpo de captura, y

ii) una unidad de evaluación que comprende un sistema lector para determinar la cantidad de complejo formada en la unidad de análisis y un sistema para el procesamiento de los datos que permite el cálculo de la cantidad de los polipéptidos de BoNT/A parcialmente procesados y/o no procesados en dicha solución con base en la cantidad determinada del complejo.

El término "dispositivo" como se usa en la presente invención se relaciona con un sistema que comprende al menos el arreglo de una unidad de análisis mencionado anteriormente y una unidad de evaluación operativamente relacionadas entre sí para permitir la determinación. En un aspecto, la disposición puede ser un soporte sólido con anticuerpos de captura inmovilizados como se mencionó anteriormente que puede presentarse sobre un soporte sólido como se especificó anteriormente, por ejemplo, en forma de un vial, a fin de permitir el contacto de una muestra de la solución y el anticuerpo de captura. Además, el dispositivo puede comprender, en un aspecto, un sistema de lectura para la determinación de la cantidad de los complejos de detección. Dependiendo del tipo de agente de detección que se utilizará, tal sistema comprenderá un detector para las señales generadas. Además, la unidad también puede comprender, en un aspecto, un algoritmo informático para procesar los datos obtenidos por el sistema lector. Dicho algoritmo permite el cálculo de la cantidad de los polipéptidos deseados. En un aspecto, esto se logra mediante la comparación de las señales medidas con los estándares de calibración a fin de determinar las cantidades de los polipéptidos presentes en una solución o una muestra de los mismos.

Además, la presente invención abarca un kit para la determinación de la cantidad de polipéptido de la neurotoxina A parcialmente procesado y/o no procesado (BoNT/A) en una solución que comprende los polipéptidos de BoNT/A parcialmente procesados y/o no procesados que comprende un anticuerpo de captura como se especificó anteriormente.

El término "kit" como se usa en la presente invención se refiere a una colección del anticuerpo de captura mencionado anteriormente y, en un aspecto, un agente de detección y/o uno o más estándares de calibración como se expone en otra parte en la presente invención. Dichos componentes del kit puede o no estar empacados juntos. Los componentes del kit pueden estar compuestos por viales separados (es decir, como un kit de partes separadas) o se proporcionan en un solo vial. Además, se entiende que el kit de la presente invención se utiliza para llevar a cabo los métodos mencionados aquí anteriormente. En un aspecto, se prevé que todos los componentes se suministran en una forma lista para usar para llevar a cabo los métodos mencionados anteriormente. En un aspecto adicional, el kit contiene instrucciones para llevar a cabo dichos métodos. Las instrucciones pueden proporcionarse como un manual del usuario en forma impresa o electrónica. Por ejemplo, el manual puede incluir instrucciones para interpretar los resultados obtenidos cuando se llevan a cabo los métodos antes mencionados utilizando el kit de la presente invención.

En un aspecto del kit de la invención, dicho kit comprende además al menos un agente de detección para determinar la cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo de captura y los polipéptidos de BoNT/A no procesados y/o parcialmente procesados.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación del inmunógeno y los anticuerpos

Generación de los inmunógenos

1. Péptido enlazador - Inmunógeno I: El péptido con la secuencia NH₂-TKSLDKGYNK-Cys-COOH fue generado por un proveedor externo y luego se acopló por medio del GMBS enlazador al portador - proteína KLH.

2. Péptido enlazador - Inmunógeno II: a) activación de la ovoalbúmina; se disolvieron en 2,18 mg de sulfo-DMSO sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato en 50 µL de DMSO. Posteriormente, se agregaron 2,5 mL de solución de ovoalbúmina que contenía 7,5 mg/mL de ovoalbúmina (amortiguador: fosfato de sodio 5 mM; NaCl al 0,9%) y se incubó la solución durante 1 h a temperatura ambiente con rotación. Se realizó un cambio de amortiguador utilizando columnas PD10, se eluyó la ovoalbúmina activada en 3,5 mL de amortiguador que contenía

fosfato de sodio 10 mM; NaCl al 0,9%. b) acoplamiento del polipéptido con la ovoalbúmina; se disolvieron 8 mg del péptido Ac-DKGYN-Cys-COOH en 250 µL de H₂O y 2,5 µL de TCEP·HCl 500 mM (clorhidrato de tris[2-carboxietil]fosfina y posteriormente se neutralizó con NaOH 1 mM. Finalmente, se agregó la ovoalbúmina activada y se incubó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4,4 horas con rotación. Por medio de la adición de una solución de cisteína 10 mM se bloquearon el resto de grupos reactivos por medio de incubación durante 1 h con rotación. Se realizó una diálisis utilizando fosfato de sodio 10 mM; NaCl al 0,9%.

Inmunización

Se obtuvieron los antisueros por medio de inmunización.

1) Suero I de antipéptido enlazador de scBoNT/A: Se utilizó como inmunógeno el péptido enlazador - Inmunógeno I que se acopló por medio del GMBS enlazador con el portador - proteína KLH. Se inmunizaron dos cabras por medio de inyección subcutánea del péptido enlazador - Inmunógeno I, cada uno inicialmente con 300 µg de péptido enlazador - Inmunógeno I disueltos en adyuvante de Freud y finalmente se inmunizó durante cuatro veces a un ritmo de cada 2 semanas con 100 µg de péptido enlazador - Inmunógeno I en adyuvante de Freud incompleto. Se recolectaron antisueros después de 49, 63, 77 y 84 días. Se llevó a cabo una cromatografía de afinidad utilizando el suero recolectado de la sangría final el día 84.

2) Suero II de antipéptido enlazador de scBoNT/A: Se utilizó como inmunógeno el péptido enlazador - Inmunógeno II que se acopló por medio del SMCC de enlace con proteína portadora de ovoalbúmina. Dos conejos se inmunizaron por inyección intradérmica del péptido de enlace - Inmunógeno II, cada uno inicialmente con 300 µg de péptido enlazador - Inmunógeno II en adyuvante de Freud y finalmente se inmunizó por cinco veces a un ritmo de cada 2 semanas con 150 µg de péptido enlazador - Inmunógeno II en Montanide ISA 206. Se llevó a cabo una cromatografía de afinidad utilizando el suero recolectado de la sangría el día 60 o 110, respectivamente.

Cromatografía de afinidad en dos etapas de los sueros

1. Generación de la matriz: Se generaron dos diferentes matrices de yodoacetilo de ultra enlace que contenían diferentes péptidos para la cromatografía de afinidad en dos etapas.

Por una parte, se presentaron los péptidos de reactividad cruzada SLD, LDK Y YNK en forma de los siguientes péptidos AC-ELDKYN-Cys-COOH (SEQ ID NO: 4), NH₂-NISLDL-Cys-COOH (SEQ ID NO: 5) y NH₂-YXNKF-Cys-COOH (SEQ ID NO: 6) y se acoplaron con la matriz utilizando la descripción general que se presenta a continuación. Por otra parte, se acopló el péptido enlazador (SEQ ID NO: 1) a la matriz utilizando la descripción general que se presenta a continuación en forma del siguiente derivado: Ac- TKSLDKGYNKA-Cys-COOH.

Descripción general:

Amortiguador de Acoplamiento: Tris 50 mM, EDTA-Na 5 mM, pH 8,5. Se prepara un volumen de amortiguador igual a 20 veces el volumen del gel de yodoacilo UltraLink® que se utilizará.

L-Cisteína HCl; solución de lavado: cloruro de sodio 1 mM (NaCl).

Columna de flujo por gravedad al vacío o de centrifugación que puede taparse tanto en la parte superior como en la inferior.

Preparación de la muestra de péptido o de proteína

Disolución del péptido con amortiguador de acoplamiento

Acoplamiento con el gel de yodoacilo UltraLink®:

1. Con la tapa inferior en su sitio sobre una columna con flujo por gravedad, agregar la cantidad deseada de la suspensión del gel de yodoacilo UltraLink®, permitiendo que se asiente el gel durante 15 minutos.

2. Drenar el líquido de la columna empacada y lavar / equilibrar el gel de yodoacilo UltraLink® con 5 volúmenes de lecho de gel del amortiguador de acoplamiento añadiendo el amortiguador a la parte superior del lecho de gel permitiendo que drene a través de la columna. No permitir que el lecho del gel corra seco.

3. Volver a colocar la tapa inferior y agregar la muestra que contiene el sulfhidrilo. Se puede aplicar aproximadamente 1 mL de la solución de la muestra por mL de gel de yodoacilo UltraLink®.

4. Volver a colocar la tapa superior y mezclar la columna a temperatura ambiente durante 15 minutos.
5. Dejar reposar la columna en posición vertical e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos sin mezclar.
6. Posteriormente remover las tapas superior e inferior de la columna y permitir que drene la solución.
7. Lavar la columna con tres volúmenes del lecho de gel del amortiguador de acoplamiento.

5 Bloqueo de los sitios de enlazamiento no específicos en el gel.

1. Volver a colocar la tapa inferior en la columna.
2. Preparar una solución de clorhidrato de L-Cisteína 50 mM en el amortiguador de acoplamiento y agregar 1 mL de esta solución a la columna por cada mililitro de gel.

10 3. Volver a colocar la tapa superior y mezclar durante 15 minutos a temperatura ambiente, después incubar la reacción sin mezclar durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente.

2. Cromatografía de afinidad en dos etapas: se separan primero de la sangre los sueros que se van a purificar. Se aplica el suero crudo a la primera columna que contiene los tripéptidos de reacción cruzada. Se enlazan los anticuerpos de reacción cruzada con los tripéptidos y de esta forma se separan del suero crudo. Se aplica el flujo a través de esta primera columna a la segunda columna que contiene el péptido enlazador enlazado. Los anticuerpos específicos del péptido enlazador se enlazan al péptido enlazador y de esta forma se separan del suero crudo que se encuentra en el segundo flujo a través de la segunda columna. Se remueven los anticuerpos antipéptido enlazador de scBoNT/A de baja afinidad de la columna por medio de un lavado de alta rigurosidad con amortiguador de PBS (NaCl 0,5 M). Posteriormente, se eluyen y concentran los anticuerpos del antipéptido enlazador de scBoNT/A de alta afinidad enlazado. Este concentrado corresponde al suero de antipéptido enlazador de scBoNT/A utilizado.

Ejemplo 2. Ensayo y verificación de la especificidad del anticuerpo

Reactivos ELISA:

Amortiguador de recubrimiento: Tris 0,005 M - 1 M; NaCl al 0,9%, preferentemente Tris 0,01 M - 0,2 M; NaCl al 0,9%, pH = 8,5.

25 Anticuerpo de captura: suero de antipéptido enlazador scBoNT/A.

Amortiguador de bloqueo y diluyente del anticuerpo: BSA al 0,5% - 5% en fosfato de sodio 0,01 M; NaCl al 0,9%, pH = 7,4.

30 Amortiguador de la muestra: BSA al 0,5% - 5% en fosfato de sodio 0,005 M - 1 M; NaCl al 0,1 - 0,5 M; Tween 20 al 0,01% - 1%, preferentemente BSA al 1% - 3% en fosfato de sodio 0,005 - 0,1 M; NaCl 0,15 M - 0,4 M; Tween 20 al 0,05% - 0,5%, pH = 7,4.

Amortiguador de lavado: fosfato de sodio 0,01 M; NaCl al 0,9%; Tween 20 al 0,05%, pH = 7,4.

Anticuerpo de detección: anticuerpo monoclonal contra BoNT/A.

Anticuerpo secundario: un anticuerpo IgG de anti-ratón policlonal (H&L) conjugado con peroxidasa.

Sustrato: TMB, comercialmente disponible.

35 2. Reactivos para transferencia tipo Western:

Desnaturalización del amortiguador de la muestra, comercialmente disponible.

Gel SDS, comercialmente disponible.

Amortiguador de corrida MES (SDS PAGE): comercialmente disponible.

ES 2 449 303 T3

Membrana de PVDF: comercialmente disponible.

Amortiguador de transferencia (transferencia tipo Western): comercialmente disponible.

Muestra: Neurotoxina botulínica tipo A con BoNT/A bicatenaria y scBoNT/A.

Anticuerpo primario: suero de antipéptido de enlazamiento scBoNT/A

- 5 Anticuerpo secundario: anticuerpo IgG anti-cabra policlonal de burro (H&L) conjugado con fosfatasa alcalina.

Bloqueo y amortiguador diluyente del anticuerpo: BSA al 0,5% - 5% en Tris 0,01 M - 0,1 M; NaCl al 0,9 %; Tween 20 al 0,05% - 5%, pH = 7,4.

Amortiguador de lavado: Tris 0,01 M - 0,1 M; NaCl al 0,9%; Tween 20 al 0,05% - 5%, pH = 7,4.

Amortiguador Tris: Tris 0,025 M, pH = 8,0.

- 10 Sustrato: BCIP / NBT, comercialmente disponible.

- 15 a) Especificidad del antisuero con relación a BoNT/B y a BoNT/E: Para determinar la especificidad de los antisueros con relación a BoNT/B y a BoNT/E, se analizó la velocidad de recuperación de las sustancias en ELISA. Se incuban las placas de microtitulación con 100 μ L / pozo del amortiguador de recubrimiento que contiene 0,5 μ g de suero de antipéptido enlazador de scBoNT/A / ml durante 16 h a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron tres veces con amortiguador de lavado. Se añaden 200 μ L / pozo de la solución de bloqueo a las placas de microtitulación y se incuban durante 1 h a temperatura ambiente. Se usa el antígeno scBoNT/A (dilución en serie en el amortiguador de la muestra; concentración en pg/ml) como estándar de calibración, se incuban las placas de microtitulación con 100 μ L / pozo del estándar de calibración. Se diluyen respectivamente BoNT/B o BoNT/E en el amortiguador de la muestra y se aplican a la placa de microtitulación en un volumen de 100 μ L / pozo. Ambas sustancias se aplican en exceso, se utiliza una dilución de 200 ng/mL. Se incuban las muestras y los estándares durante 2 horas a 37 °C. Se lavan las placas de microtitulación tres veces con amortiguador de lavado. Se añaden 100 μ L del amortiguador de detección / pozo y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente. Después se lavan las placas de microtitulación tres veces con amortiguador de lavado. Posteriormente, se lleva a cabo la incubación con 100 μ L / pozo de anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se lavan tres veces las placas de microtitulación con amortiguador de lavado.

- 20 La reacción de detección se inicia por medio de la adición de 100 μ L del sustrato / pozo. Después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, se detiene la reacción por medio de la adición 50 μ L de H₂SO₄ 2 M / pozo y se determina la absorbancia a 450 nm. Para la determinación de la especificidad se calculan las concentraciones de BoNT/B y BoNT/E por medio de estandarización. Al calcular la velocidad de recuperación, se puede determinar la especificidad de los antipéptidos enlazadores scBoNT/A para los estereotipos B y E. Entre menor velocidad de recuperación, menor la reactividad cruzada y mejor la especificidad del suero con relación a scBoNT/A.

- 30 b) Especificidad del anti-péptido enlazador scBoNT/A con relación a BoNT/A bicatenaria: para la determinación de la especificidad del antisuero con relación a BoNT/A bicatenaria activado se lleva a cabo una detección inmunohistológica por medio de una transferencia tipo Western. Se separa una muestra NT (scBoNT/A al menos 50 ng, BoNT/A bicatenaria dependiendo de la muestra usada) bajo condiciones reductoras por medio de SDS-PAGE de acuerdo con su peso molecular en scBoNT/A, LC y HC (BoNT/A bicatenaria). Se transfieren luego las proteínas sobre una membrana de PVDF. Se bloquea la membrana con 20 ml del amortiguador de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se remueve el amortiguador de bloqueo y se añaden 20 mL de la solución del anticuerpo primario que contiene 0,005 μ g / ml de suero de antipéptido enlazador de scBoNT/A. Se incuba el anticuerpo primario durante la noche a 4 °C. Se remueve la solución que contiene el anticuerpo y se lava la membrana tres veces durante 30 minutos con 20 ml de amortiguador de lavado a 37 °C. Posteriormente, se incuba la membrana durante 3 h a temperatura ambiente con 20 ml del anticuerpo secundario con una concentración de 0,4 μ g / mL. Se remueve la solución de anticuerpo secundario y se lava la membrana tres veces durante 30 minutos con 20 mL del amortiguador de lavado, a 37 °C. Adicionalmente, se lava la membrana una vez con 20 mL de un amortiguador Tris 25 mM durante 5 minutos a temperatura ambiente.

- 45 La reacción de detección se lleva a cabo por medio de la adición del sustrato. Se incuba el sustrato durante 15 minutos y se detiene la reacción de coloración por medio de la adición de agua. Se determina la especificidad por medio de la tinción de la banda de scBoNT/A en 150 kDa. Se determinó la especificidad del antipéptido enlazador solo cuando se detectó únicamente la banda específica en 150 kDa pero no la banda específica para BoNT/A bicatenaria en 100 kDa (HC) y 50 kDa (LC).

ES 2 449 303 T3

Se determinaron los contenidos de scBoNT/A de diferentes cargas utilizando las condiciones de ELISA mencionadas anteriormente y se compararon con los contenidos determinados por SDS PAGE. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla: scBoNT/A determinada por SDS PAGE contra ELISA

Muestra no.	scBoNT/A (%) por SDS PAGE	scBoNT/A (%) por ELISA
1	9,5	11,97
2	0,4	0,64
3	0,8	0,68
4	3,5	3,97
5	0,8	0,13
6	2,1	1,36
7	1,1	1,12
8	1,5	1,33
9	2,0	1,88

5

Listado de secuencias

<110> Merz Pharma GmbH & Co. KGaA

<120> Sistema para la determinación de una neurotoxina tipo A no procesada y parcialmente procesada

<130> MP66449PC

10 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Clostridium botulinum

<400> 1

Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys Ala
1 5 10

<210> 2

<211> 1296

20 <212> PRT

ES 2 449 303 T3

<213> Clostridium botulinum

<400> 2

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
 1 5 10 15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
 20 25 30

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
 35 40 45

Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
 50 55 60

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
 65 70 75 80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu
 85 90 95

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
 100 105 110

Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
 115 120 125

Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
 130 135 140

ES 2 449 303 T3

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
 145 150 155 160

Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
 165 170 175

Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
 180 185 190

Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
 195 200 205

Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
 210 215 220

Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
 225 230 235 240

Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
 245 250 255

Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
 260 265 270

Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
 275 280 285

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
 290 295 300

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
 305 310 315 320

Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
 325 330 335

Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
 340 345 350

Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
 355 360 365

Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
 370 375 380

Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
 385 390 395 400

ES 2 449 303 T3

Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
 405 410 415
 Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
 420 425 430
 Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys
 435 440 445
 Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
 450 455 460
 Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
 465 470 475 480
 Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
 485 490 495
 Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
 500 505 510
 Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
 515 520 525
 Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
 530 535 540
 Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
 545 550 555 560
 His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu
 565 570 575
 Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
 580 585 590
 Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
 595 600 605
 Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
 610 615 620
 Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
 625 630 635 640
 Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
 645 650 655

Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
660 665 670

Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
675 680 685

Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
690 695 700

Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
705 710 715 720

Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
725 730 735

Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
740 745 750

Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
755 760 765

Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
770 775 780

Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
785 790 795 800

Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
805 810 815

Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
820 825 830

Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
835 840 845

Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
850 855 860

Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
865 870 875 880

Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
885 890 895

Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn
900 905 910

Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu

Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn
 1175 1180 1185

Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu
 1190 1195 1200

Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser
 1205 1210 1215

Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn
 1220 1225 1230

Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly
 1235 1240 1245

Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala
 1250 1255 1260

Ser Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu
 1265 1270 1275

Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu
 1280 1285 1290

Arg Pro Leu
 1295

<210> 3

<211> 3891

5 <212> ADN

<213> Clostridium botulinum

<400> 3

ES 2 449 303 T3

atgccatttg ttaataaaca atttaattat aaagatcctg taaatgggtg tgatattgct	60
tatataaaaa ttccaaatgc aggacaaatg caaccagtaa aagcttttaa aattcataat	120
aaaatatggg ttattccaga aagagataca ttacaaaatc ctgaagaagg agatttaaat	180
ccaccaccag aagcaaaaca agttccagtt tcatattatg attcaacata ttaagtaca	240
gataatgaaa aagataatta tttaaagga gttacaaaat tatttgagag aatttattca	300
actgatcttg gaagaatggt gttaacatca atagtaaggg gaataccatt ttggggtgga	360
agtacaatag atacagaatt aaaagttatt gatactaatt gtattaatgt gatacaacca	420
gatgtagtt atagatcaga agaacttaat ctagtaataa taggaccctc agctgatatt	480
atacagtttg aatgtaaaag ctttgacat gaagttttga atcttacgag aaatggttat	540
ggctctactc aatacattag atttagccca gattttacat ttggttttga ggagtcactt	600
gaagttgata caaatcctct tttaggtgca ggcaaatttg ctacagatcc agcagtaaca	660

ttagcacatg aacttataca tgctggacat agatttatatg gaatagcaat taatccaaat	720
agggttttta aagtaaatac taatgcctat tatgaaatga gtgggttaga agtaagcttt	780
gaggaactta gaacatttgg gggacatgat gcaaagttta tagatagttt acaggaaaaac	840
gaatttcgtc tatattatta taataagttt aaagatatag caagtacact taataaagct	900
aatcaatag taggtactac tgcttcatta cagtatatga aaaatgtttt taaagagaaa	960
tatctcctat ctgaagatac atctggaaaa ttttcggtag ataaattaa atttgataag	1020
ttatacaaaa tgттаacaga gatttacaca gaggataatt ttgttaagtt ttttaaagta	1080
cttaacagaa aaacatattt gaattttgat aaagccgtat ttaagataaa tatagtacct	1140
aaggtaaatt acacaatata tgatggattt aatttaagaa atacaaattt agcagcaaac	1200
tttaatggtc aaaatacaga aattaataat atgaatttta ctaaactaaa aaattttact	1260
ggattgtttg aattttataa gttgctatgt gtaagagggg taataacttc taaaactaaa	1320
tcattagata aaggatacaa taaggcatta aatgatttat gtatcaaagt taataattgg	1380
gacttgtttt ttagtccttc agaagataat tttactaatg atctaaataa aggagaagaa	1440
attacatctg atactaatat agaagcagca gaagaaaata ttagtttaga tttaatacaa	1500
caatattatt taacctttaa ttttgataat gaacctgaaa atatttcaat agaaaatctt	1560
tcaagtgaca ttataggcca attagaactt atgcctaata tagaaagatt tcctaattgga	1620
aaaaagtatg agttagataa atatactatg ttccattatc ttcgtgctca agaatttgaa	1680
catggtaaat ctaggattgc ttttaacaaat tctgttaacg aagcattatt aatcctagt	1740
cgtgtttata catttttttc ttcagactat gtaaagaaag ttaataaagc tacggaggca	1800
gctatgtttt taggctgggt agaacaatta gtatatgatt ttaccgatga aactagcgaa	1860
gtaagtacta cggataaaat tgcggatata actataatta ttccatataat aggacctgct	1920
ttaaataatag gtaatatgtt atataaagat gattttgtag gtgctttaat attttcagga	1980
gctgttatto tgttagaatt tataccagag attgcaatac ctgtattagg tacttttgca	2040
cttgatcat atattgcgaa taaggttcta accgttcaaa caatagataa tgctttaagt	2100
aaaagaaatg aaaaatggga tgaggctctat aaatatatag taacaaattg gttagcaaaag	2160
gtaatacac agattgatct aataagaaaa aaaatgaaag aagctttaga aatcaagca	2220
gaagcaacaa aggctataat aaactatcag tataatcaat atactgagga agagaaaaat	2280
aatattaatt ttaattattga tgatttaagt tcgaaactta atgagtctat aaataaagct	2340
atgattaata taataaaatt tttgaatcaa tgctctgttt catatttaat gaattctatg	2400
atcccttatg gtgttaaacg gttagaagat tttgatgcta gtcttaaaga tgcattatta	2460
aagtatatat atgataatag aggaacttta attgggtcaag tagatagatt aaaagataaa	2520
gttaataata cacttagtac agatatacct tttcagcttt ccaaatcgt agataatcaa	2580

ES 2 449 303 T3

```

agattattat ctacatttac tgaatatatt aagaatatta ttaatacttc tatattgaat 2640
ttaagatatg aaagtaatca tttaatagac ttatctaggt atgcatcaaa aataaatatt 2700
ggtagtaaag taaatthttga tccaatagat aaaaatcaaa ttcaattatt taatthtagaa 2760
agtagtaaaa ttgaggtaat tttaaaaaat gctattgtat ataatagtat gtatgaaaat 2820
tttagtacta gctthttggat aagaattcct aagtattthta acagtataag tctaaataat 2880
gaatatacaa taataaattg tatggaaaat aattcaggat ggaaagtatc acttaattat 2940
ggtgaaataa tctggactth acaggatact caggaaataa aacaaagagt agthththtaaa 3000
tacagtcaaa tgattaatat atcagattat ataaacagat ggathththgt aactatcact 3060
aataatagat taaataactc taaaatttht ataatggaa gattaataga tcaaaaacca 3120
atthcaaat taggtaatat tcatgctagt aataatataa tghtthaaatt agatgththgt 3180
agagatacac atagatatat ttggataaaa taththtaatc thththgataa ggaaththaat 3240
gaaaaagaaa tcaaagattt atatgataat caatcaaat caggthththt aaaagacttht 3300
tggggtgatt atthacaata tgataaacca tactatatgt taaattthata tgatccaaat 3360
aaatatgtcg atgtaataa tgtaggtatt agaggtthata tgtatctthaa agggcctaga 3420
ggtagcgtaa tgactacaaa cathththta aattcaagtt tgtatagggg gacaaaattt 3480
attataaaaa aatatgcttc tggaataaaa gataatattg ttagaaataa tgatcgtgta 3540
tataththaatg tagtagththaa aataaaagaa tataggtthag ctactthaatgc atcacaggca 3600
ggcgtagaaa aaatacthaag tgcattagaa atacctgatg taggaaatct aagtcaagta 3660
gtagththaatga agtcaaaaaa tgatcaagga ataacaaata aatgcaaaat gaathththcaa 3720
gataaththaatg ggaaththgatat aggcctthata ggathththcatc agththththaaataa tatagcthaaa 3780
ctagththagcaa gththththggta ththththagacaa atagaaagat ctagthththggac ththththggththgc 3840
tcatgggththaat ththththctgt agatgththgga tgggththgagaaa ggcctactgta a 3891

```

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Tripéptido para purificación por afinidad 1

<400> 4

ES 2 449 303 T3

Glu Leu Asp Lys Tyr Asn Cys
1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Tripéptido para purificación por afinidad 2

<400> 5

Asn Ile Ser Leu Asp Leu Cys
1 5

10 <210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Tripéptido para purificación por afinidad 3

<400> 6

Tyr Tyr Asn Lys Phe Cys
1 5

<210> 7

<211> 12

20 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> inmunógeno peptídico enlazador

<400> 7

Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys Ala Cys
1 5 10

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para la determinación de la cantidad de polipéptido de la neurotoxina A parcialmente procesado y/o no procesado (BoNT/A) en una solución que comprende BoNT/A procesado y / o parcialmente procesado que comprende las etapas de:
- 5 i) poner en contacto una muestra de dicha solución con un anticuerpo de captura que se enlaza específicamente con el BoNT/A no procesado y/o parcialmente procesado bajo condiciones que permiten el enlazamiento de dicho anticuerpo con dicho BoNT/A parcialmente procesado y no procesado, por medio del cual se forma un complejo, y
- ii) determinar la cantidad del complejo formado en la etapa i), por lo cual la cantidad del complejo es indicativa de la cantidad de BoNT/A parcialmente procesado y / o no procesado en dicha solución,
- 10 en donde el anticuerpo de captura se puede obtener por un método que comprende:
- a) poner en contacto un antisuero policlonal de un animal que ha sido inmunizado por medio de un inmunógeno peptídico que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 con los siguientes péptidos de captura SLD, LDK, e YNK bajo condiciones que permiten la formación de los complejos de captura que contienen anticuerpos no específicos comprendidos por el antisuero policlonal y los péptidos de captura;
- 15 b) remover los complejos de captura del antisuero policlonal;
- c) poner en contacto el antisuero policlonal con un péptido que comprende o que consiste esencialmente de la SEQ ID NO: 1 bajo condiciones que permitan la formación de un complejo que comprende el péptido mencionado anteriormente y un anticuerpo se enlaza específicamente con el polipéptido de la neurotoxina no procesado o parcialmente procesado.
- 20 d) remover el complejo formado en la etapa c) del antisuero; y
- e) liberar el anticuerpo que se enlaza específicamente con el polipéptido de la neurotoxina no procesado o parcialmente procesado de dicho complejo.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho inmunógeno comprende además KLH.
3. El método de la reivindicación 2, en donde dicho KLH se enlaza con el péptido que tiene la SEQ ID NO: 1 a través del enlazador de éster de N-[gama-maleimidobutiriloxi]succinamida (GMBS).
- 25 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichas condiciones en la etapa i) incluyen la presencia de un detergente.
5. El método de la reivindicación 4, en donde dicho detergente es Tween 20.
6. El método de la reivindicación 4 o 5, en donde dicho detergente está presente en una concentración en el intervalo de 0,01% (v/v) a 10% (v/v).
- 30 7. El método de la reivindicación 6, en donde dicha concentración está en el intervalo de 0,2% (v/v) a 0,8% (v/v) o en el intervalo de 0,3% (v/v) a 0,6% (v/v).
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichas condiciones en la etapa i) incluyen la presencia de una solución salina amortiguada con fosfato o amortiguada con tris.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en donde dicha solución comprende NaCl con una concentración en el intervalo de 150 a 350 mM.
10. El método de la reivindicación 9, en donde dicha concentración está en el intervalo de 200 a 300 nM.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha etapa ii) comprende comparar la cantidad del complejo con una referencia por medio de lo cual se pueden asignar las cantidades determinadas de complejo a cantidades predefinidas del polipéptido de BoNT/A sin procesar.
- 40

12. Un dispositivo para la determinación de la cantidad del polipéptido de la neurotoxina A (BoNT/A) parcialmente procesado y/o no procesado en una solución que comprende polipéptidos de BoNT/A parcialmente procesados y/o no procesados, que comprende:
- 5 i) una unidad de análisis que comprende un anticuerpo de captura como se especificó en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la unidad de análisis permite poner en contacto una muestra de dicha solución con dicho anticuerpo de captura, y
- 10 ii) una unidad de evaluación que comprende un sistema lector para determinar la cantidad de complejo formada en la unidad de análisis y un sistema para el procesamiento de los datos que permite el cálculo de la cantidad de los polipéptidos de BoNT/A parcialmente procesados y/o no procesados en dicha solución con base en la cantidad determinada del complejo.
13. Un kit para la determinación de la cantidad de polipéptido de la neurotoxina A (BoNT/A) parcialmente procesado y/o no procesado en una solución que comprende polipéptidos de BoNT/A parcialmente procesados y/o no procesados, que comprende un anticuerpo de captura como se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 14. El kit de la reivindicación 13, en donde dicho kit comprende además al menos un agente de detección para determinar la cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo de captura y polipéptidos de BoNT/A parcialmente procesados y/o no procesados.