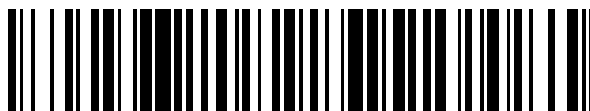


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 060**

51 Int. Cl.:

C07K 14/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2011 E 11743526 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2603518**

54 Título: **Fabricación selectiva de polipéptidos de neurotoxina recombinantes**

30 Prioridad:

11.08.2010 US 401334 P
11.08.2010 EP 10172526

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.08.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GREIN, SWEN;
HÖLSCHER, KERSTIN;
STÖVEKEN, TIM y
EISELE, KARL-HEINZ

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 544 060 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

Fabricación selectiva de polipéptidos de neurotoxina recombinantes

- 5 La presente invención se refiere a polipéptidos de neurotoxina recombinantes y la fabricación de los mismos. Específicamente, se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido de neurotoxina que comprende una cadena ligera, un enlazador y una cadena pesada, en donde el enlazador es un enlazador modificado que comprende una secuencia heteróloga de aminoácidos que confiere al menos una propiedad fisicoquímica al polipéptido que permite la separación de polipéptidos de neurotoxina parcialmente procesados y/o sin procesar de polipéptidos de neurotoxina procesados, estando dicha secuencia heteróloga de aminoácidos flanqueada en el terminal N y el terminal C por un sitio de reconocimiento y escisión de la proteasa. También son abarcados por la presente invención vectores y células anfitrionas que comprenden el polinucleótido de la invención, así como polipéptidos codificados por dicho polinucleótido y métodos para la fabricación de polipéptidos de neurotoxina procesados. La neurotoxina de la invención es neurotoxina botulínica.
- 10
- 15 Clostridium botulinum y Clostridium tetani producen neurotoxinas muy potentes, es decir toxinas botulínicas (BoNT) y toxina del tétanos (TeNT), respectivamente. Estas neurotoxinas Clostridiales se unen específicamente a las células neuronales e interrumpen la liberación de neurotransmisores. Cada toxina se sintetiza como una proteína inactiva de cadena sencilla de aproximadamente 150 kDa. El procesamiento postraduccional implica la formación de puentes disulfuro, y proteólisis limitada (corte) por la(s) proteasa(s) bacteriana(s). Una neurotoxina activa bicatenaria consiste en dos cadenas, una cadena ligera en el terminal N de aproximadamente 50 kDa y una cadena pesada de aproximadamente 100 kDa unidas por un enlace disulfuro. Las neurotoxinas consisten estructuralmente de tres dominios, es decir, la cadena ligera catalítica, la cadena pesada que comprende el dominio de translocación (mitad del terminal N) y el dominio de enlazamiento al receptor (mitad del terminal C), véase Krieglstein 1990, Eur J Biochem 188, 39; Krieglstein 1991, Eur J Biochem 202, 41; Krieglstein 1994, J Protein Chem 13, 49.
- 20
- 25 La bacteria Clostridium botulinum segrega siete serotipos antigénicamente distintos designados de A hasta G de la neurotoxina botulínica (BoNT). Todos los serotipos junto con la neurotoxina relacionada del tétanos (TeNT) secretados por la bacteria Clostridium tetani, son endoproteasas que contienen Zn^{2+} que bloquean la exocitosis sináptica mediante la escisión de proteínas SNARE. Las CNT causan la parálisis muscular flácida observada en el botulismo y el tétanos; véase Fischer 2007, PNAS 104, 10447.
- 30
- 35 A pesar de sus efectos tóxicos, el complejo de toxina botulínica ha sido utilizado como un agente terapéutico en un gran número de enfermedades. La toxina botulínica serotipo A fue aprobada para uso humano en los Estados Unidos en 1989 para el tratamiento de estrabismo, blefaroespasmos, y otros trastornos. Está disponible comercialmente como una preparación de proteína de la toxina botulínica A, por ejemplo, bajo el nombre comercial BOTOX® (Allergan Inc.) y bajo el nombre comercial DYSPORT (Ipsen Ltd.). Para aplicación terapéutica, se inyecta el complejo directamente en el músculo a tratar. A pH fisiológico, la toxina se libera del complejo de proteína y tiene lugar el efecto farmacológico deseado. Una preparación mejorada de BoNT/A que se libera de las proteínas complejantes está disponible bajo el nombre comercial XEOMIN (Merz Pharmaceuticals GmbH). El efecto de la toxina botulínica es sólo temporal, razón por la cual puede requerirse de una administración repetida de la toxina botulínica para mantener un efecto terapéutico.
- 40
- 45 Las neurotoxinas Clostridiales debilitan la fuerza muscular voluntaria y son eficaces en el tratamiento de estrabismo, distonía focal, incluyendo distonía cervical y blefaroespasmos esenciales benignos. Se ha demostrado además que alivian el espasmo hemifacial, y la espasticidad focal, y además, son eficaces en una amplia gama de otras indicaciones, tales como trastornos gastrointestinales, hiperhidrosis y corrección cosmética de arrugas; véase Jost 2007, Drugs 67, 669.
- 50
- 55 Para la fabricación de las neurotoxinas Clostridiales, ya sea aisladas de las bacterias Clostridiales de tipo silvestre que las originan, o de otras especies de células anfitrionas tales como E. coli, la purificación de la neurotoxina a partir de los lisados de células anfitrionas después de la fermentación es de particular importancia. En el proceso de producción clásico a partir de *Clostridium botulinum*, usualmente se aplican diferentes etapas de precipitación y extracción seguido por una etapa de concentración y otras etapas cromatográficas distintas con el fin de obtener neurotoxina purificada, véase DasGupta 1984, Toxicon 22, 415; Sathyamoorthy 1985, J Biol Chemistry 260, 10461. Del mismo modo, en un proceso de producción recombinante a partir de otras células anfitrionas tales como E. coli, se usan diversas etapas de procesamiento tales como ruptura de células, clarificación del lisado, y múltiples etapas de purificación cromatográfica para el aislamiento de la neurotoxina.
- 60
- En la actualidad, todas las preparaciones de neurotoxina disponibles comprenden, además de la neurotoxina de doble cadena activa (procesada) deseada, un precursor proteolíticamente sin procesar y/o un polipéptido de

neurotoxina parcialmente procesado. El precursor proteolíticamente sin procesar o el polipéptido parcialmente procesado difieren del polipéptido de neurotoxina de doble cadena activo (procesado) en sólo unos pocos aminoácidos. Por lo tanto, difícilmente pueden distinguirse con base en sus propiedades químicas y físicas. Por otro lado, la proporción de precursor proteolíticamente y/o de polipéptido de neurotoxina parcialmente procesado de la proporción de proteína total sigue siendo significativa en estas preparaciones. Dicha cantidad de precursor sin procesar y/o neurotoxina parcialmente procesada es inherente a los sistemas de producción biológicos, que no son completamente controlables. Por lo tanto, la cantidad de precursor proteolíticamente sin procesar no deseada y/o de polipéptido de neurotoxina parcialmente procesado en preparaciones de neurotoxina está predefinida y, en la actualidad, bastante difícil de reducir.

El procesamiento de neurotoxinas se consigue también mediante la incubación del polipéptido precursor con un lisado de *E. coli* que contiene una actividad de proteasa provocada por una proteasa desconocida de *E. coli* que es capaz de escindir los polipéptidos de neurotoxina de manera que se obtienen polipéptidos maduros de doble cadena (véase el documento WO2006/076902).

El documento WO2004/024909 divulga una neurotoxina botulínica que es capaz de activación y eliminación simultánea de una etiqueta de purificación.

El documento WO2010/124998, que pertenece al estado del arte según el Art. 54 (3), divulga una neurotoxina botulínica que contiene una secuencia enlazadora flanqueada por sitios de proteasa entre las cadenas ligera y pesada.

Los medios y métodos para una fabricación más eficiente de neurotoxinas mediante la reducción de la cantidad de polipéptidos de neurotoxina sin procesar y/o parcialmente procesados y por lo tanto mejorando la calidad de las preparaciones de neurotoxinas son altamente deseables, pero aún no se encuentran disponibles.

Por lo tanto, el problema técnico que subyace en la presente invención puede verse como la provisión de medios y métodos para mejorar la fabricación de polipéptidos de neurotoxina mediante el cumplimiento de las necesidades anteriormente mencionadas. El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y en el presente documento a continuación.

La presente invención se refiere, por lo tanto, a un polinucleótido que codifica un polipéptido de neurotoxina que comprende una cadena ligera, un enlazador y una cadena pesada, en donde el enlazador es un enlazador modificado que comprende una secuencia heteróloga de aminoácidos que confiere al menos una propiedad fisicoquímica al polipéptido que permite la separación de polipéptidos de neurotoxina parcialmente procesados y/o sin procesar de polipéptidos de neurotoxina procesados, estando dicha secuencia heteróloga de aminoácidos flanqueada en el terminal N y el terminal C por un sitio de reconocimiento y escisión de proteasa.

El término "polinucleótido" como se usa aquí se refiere a moléculas de ADN monocatenarias o bicatenarias, así como a moléculas de ARN. Abarcados por dicho término están ADN genómico, ADNc, ARNhn, ARNm, así como todos los derivados de origen natural o artificialmente modificados de tales especies moleculares. El polinucleótido puede ser, en un aspecto, una molécula lineal o circular. Por otra parte, además de las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido de neurotoxina antes mencionado, una polinucleótido de la presente invención puede comprender secuencias adicionales requeridas para una transcripción y/o traducción apropiada tales como secuencias 5'-UTR o 3'-UTR. El polinucleótido de la presente invención codifica un polipéptido de neurotoxina que comprende un enlazador modificado. El polipéptido de neurotoxina y, en particular, su cadena ligera y su cadena pesada se pueden derivar de un de los serotipos antigénicamente diferentes de neurotoxinas botulínicas, es decir, BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G o neurotoxina tetánica (TeNT). En un aspecto, dicha cadena ligera y dicha cadena pesada del polipéptido de neurotoxina son la cadena ligera y pesada de una neurotoxina seleccionada de entre el grupo que consiste en: BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G o TeNT. En otro aspecto, dicho polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico como se muestra en la SEQ ID NO: 1 (BoNT/A), SEQ ID NO: 3 (BoNT/B), SEQ ID NO: 5 (BoNT/C1), SEQ ID NO: 7 (BoNT/D), SEQ ID NO: 9 (BoNT/E), SEQ ID NO: 11 (BoNT/F), SEQ ID NO: 13 (BoNT/G) o SEQ ID NO: 15 (TeNT) que ha sido modificado en el enlazador como se especifica aquí. Por otra parte, también se incluye en un aspecto un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 (BoNT/A), SEQ ID NO: 4 (BoNT/B), SEQ ID NO: 6 (BoNT/C1), SEQ ID NO: 8 (BoNT/D), SEQ ID NO: 10 (BoNT/E), SEQ ID NO: 12 (BoNT/F), SEQ ID NO: 14 (BoNT/G) o SEQ ID NO: 16 (TeNT) que ha sido modificado en el enlazador como se especifica aquí.

La invención se limita a la neurotoxina botulínica como la toxina. Las realizaciones relacionadas con la neurotoxina tetánica se describen únicamente a manera de ilustración.

En otro aspecto, dicho polinucleótido es una variante de los polinucleótidos mencionados anteriormente que comprende una o más sustituciones, supresiones y/o adiciones de nucleótidos que en aún otro aspecto puede resultar en un polipéptido que tiene una o más sustituciones, supresiones y/o adiciones de aminoácidos. Además, una variante de polinucleótido de la invención comprenderá en otro aspecto una variante de una secuencia de ácido nucleico que es 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 de ácido nucleico como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 o una variante de una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que es 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 de aminoácido como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, o 16. El término "idéntico" como se usa en el presente documento se refiere a la identidad de secuencia caracterizada por la determinación del número de aminoácidos idénticos entre dos secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos en donde las secuencias se alinean de modo que se obtiene la mayor correspondencia posible. Eso puede calcularse utilizando técnicas o métodos publicados o codificados en programas de ordenador tales como, por ejemplo, BLASTP, BLASTN o FASTA (Altschul 1990, J Mol Biol 215, 403). Los valores de porcentaje de identidad, en un aspecto, se calculan sobre la secuencia completa de aminoácidos. Una serie de programas basados en una variedad de algoritmos están disponibles para una persona calificada para comparar diferentes secuencias. En este contexto, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman producen resultados particularmente confiables. Para llevar a cabo las alineaciones de secuencias, se puede utilizar el programa PileUp (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 son parte del paquete de software GCG (Genetics Computer Group 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU. 53711). Los valores de identidad de secuencia citados anteriormente en porcentaje (%) se deben determinar, en otro aspecto de la invención, utilizando el programa GAP sobre toda la región de la secuencia con los siguientes parámetros: Peso de la brecha: 50, Peso del tramo: 3, Coincidencias promedio: 10,000 y Falta de coincidencia en promedio: 0,000, que, a menos que se especifique lo contrario, se deben usar siempre como parámetros estándar para las alineaciones de secuencias. En un aspecto, cada una de las variantes de polinucleótidos antes mencionadas codifican un polipéptido que conserva una o más y, en otro aspecto, todas las propiedades biológicas del respectivo polipéptido de neurotoxina, es decir, la BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G o neurotoxina tetánica (TeNT). Aquellos versados en la técnica se darán cuenta que la actividad biológica completa se mantiene sólo después de la activación proteolítica, aunque es concebible que el precursor sin procesar pueda ejercer algunas funciones biológicas o ser parcialmente activo. "Propiedades biológicas" como se utiliza aquí se refiere a (a) la unión al receptor, (b) la internalización, (c) la translocación a través de la membrana endosomal en el citosol, y/o (d) la escisión endoproteolítica de proteínas implicadas en la fusión a la membrana de la vesícula sináptica. Los ensayos in vivo para la evaluación de la actividad biológica incluyen el ensayo LD50 de ratón y el ensayo de hemidiafragma de ratón ex vivo de ratón según lo descrito por Pearce y colaboradores (Pearce 1994, Toxicol Appl Pharmacol 128: 69-77) y Dressler y colaboradores (Dressler 2005, Mov Disord 20: 1617-1619, Keller 2006, Neuroscience 139: 629-637). La actividad biológica se expresa comúnmente en Unidades Ratón (MU). Tal como se usa en el presente documento, 1 MU es la cantidad de componente neurotóxico, que mata 50% de una población especificada de ratones después de la inyección intraperitoneal, es decir, el ratón ip LD50. En un aspecto adicional, la polinucleótidos pueden codificar variantes de polinucleótidos pueden codificar neurotoxinas que tienen propiedades biológicas alteradas o mejoradas, por ejemplo, pueden comprender sitios de escisión que se mejoran para el reconocimiento de la enzima o pueden ser mejorados para la unión del receptor o cualquier otra propiedad especificada anteriormente.

Los polipéptidos de neurotoxina a que se refiere la presente invención comprenden una cadena ligera en el terminal N, un enlazador intermedio y una cadena pesada en el terminal C. Las neurotoxinas se traducen como moléculas precursoras de una sola cadena y son proteolíticamente escindidas en una forma de doble cadena madura durante el procesamiento. La escisión proteolítica se produce en el enlazador de tal manera que el enlazador es o bien escindido una vez o removido después de la escisión en los terminales N y C del enlazador. Dependiendo de la eficacia del procesamiento, además del constructo de cadena única no escindida, también se pueden generar polipéptidos de neurotoxina parcialmente procesados, es decir, polipéptidos de neurotoxina que retienen el enlazador ya sea en la cadena ligera o en la pesada, debido a escisión inadecuada. El enlazador endógeno de los polipéptidos de neurotoxina se modifica de acuerdo con la presente invención de manera que contenga una secuencia heteróloga de aminoácidos (es decir, no endógena) que se une con alta afinidad a una matriz de purificación, siendo dicha secuencia heteróloga de aminoácidos flanqueada en el terminal N y C por un sitio de reconocimiento y escisión de proteasa. Dicha modificación, en un aspecto, puede ser una modificación de aminoácidos individuales en el enlazador endógeno produciendo el enlazador modificado. Alternativamente y en otro aspecto, dicha modificación puede ser el reemplazo del enlazador endógeno por un enlazador heterólogo. Las técnicas adecuadas para llevar a cabo tales modificaciones al enlazador son bien conocidas en la técnica e incluyen técnicas de mutagénesis, así como la clonación estándar y técnicas basadas en PCR.

El término "secuencia heteróloga de aminoácidos que confiere al menos una propiedad fisicoquímica al polipéptido que permite la separación de los polipéptidos de neurotoxina parcialmente procesados o no procesados de

polipéptidos de neurotoxina procesados" se refiere a una secuencia de aminoácidos que no se presenta naturalmente en el enlazador (es decir, heterólogo) de la neurotoxina que va a ser modificada y que confiere al menos una propiedad fisicoquímica a la especie molecular neurotoxina que contiene dicho enlazador, es decir, la neurotoxina sin procesar y/o parcialmente procesada. Dicha propiedad fisicoquímica, en un aspecto, será una afinidad alterada por una matriz de purificación tal como se define en otra parte en este documento en forma detallada o puede ser una propiedad física alterada tal como el peso molecular que permite la separación física eficiente.

En un aspecto del polinucleótido de la presente invención, dicha secuencia heteróloga de aminoácidos es una secuencia heteróloga de aminoácidos que se une con alta afinidad a una matriz de purificación.

El término "secuencia heteróloga de aminoácidos que se une con alta afinidad a una matriz de purificación" se refiere a una secuencia de aminoácidos que no lo hace de manera endógena (es decir, se produce de forma natural) en el enlazador. Dicha secuencia de aminoácidos conferirá alta afinidad de enlazamiento a una matriz de purificación. Dependiendo de la matriz de purificación que se utilice, esto se puede lograr ya sea por aminoácidos individuales que están presentes en la secuencia y que son capaces de interactuar físicamente o químicamente con componentes de la matriz o tramos de la secuencia peptídica o estructuras tridimensionales formadas de este modo que son capaces de interactuar con la matriz. El último caso de enlazamiento de alta afinidad también incluye una unión basada en las interacciones proteína-proteína. Las interacciones adecuadas proteína-proteína de alta afinidad que se pueden aplicar en este contexto son interacciones anticuerpo-epítipo. Por ejemplo, la matriz de purificación puede contener un anticuerpo que reconoce específicamente y se une con alta afinidad a un epítipo compuesto por la secuencia heteróloga de aminoácidos. Además, se pueden aplicar interacciones receptor-ligando u otras interacciones proteína-proteína de alta afinidad. Por ejemplo, la matriz de purificación puede estar acoplada a biotina y la secuencia heteróloga de aminoácidos pueden comprender estreptavidina o avidina o etiquetas derivadas de los mismos. Otras secuencias heterólogas de aminoácidos que se utilizan en aspectos particulares de la presente invención están especificadas en otra parte en el presente documento. Una "matriz de purificación" como se entiende aquí se refiere a una estructura tridimensional o disposición espacial capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos antes mencionada del enlazador modificado. Matrices bien conocidas comprenden polipéptidos, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, polietilenglicol (PEG), dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros, y magnetita. Una matriz sólida es, en un aspecto de la invención, una matriz de polisacárido seleccionada de entre el grupo que consiste en: Sefarosa, Sefadex, Superdex; agarosa, Sefacel, microcelulosa, y perlas de alginato. En otro aspecto, dicha matriz sólida puede consistir en perlas de vidrio, y/o matrices de polipéptido.

En un aspecto adicional del polinucleótido de la invención, dicha secuencia heteróloga de aminoácidos aumenta el peso molecular del polipéptido de neurotoxina de tal manera que los polipéptidos de neurotoxina parcialmente procesados y/o sin procesar pueden separarse físicamente del polipéptido de neurotoxina procesado.

Dicha secuencia heteróloga de aminoácidos que está comprendida en este aspecto por el enlazador aumentará el peso molecular del enlazador que contiene especies moleculares de neurotoxina de tal manera que dicho enlazador que contiene especies moleculares pueden separarse de la neurotoxina procesada, es decir, las especies moleculares que no contienen al enlazador modificado, por procesos de separación físicos. Dichos procesos, en un aspecto, incluyen cromatografía de exclusión por tamaño, ultrafiltración, tecnologías preparativas de electroforesis en gel, o tecnologías basadas en centrifugación. Los aminoácidos que se pueden introducir en el enlazador modificado para aumentar el peso molecular incluyen esencialmente todos los aminoácidos disponibles de origen natural o aminoácidos artificiales que pueden ser introducidos a través de enlaces peptídicos en el esqueleto peptídico. Por otra parte, en un aspecto, los aminoácidos pueden ser modificados químicamente con el fin de mejorar o facilitar la separación física. En tal caso, las fracciones que contribuyen a un alto peso molecular puede ser acopladas a los aminoácidos. En otro aspecto, un tramo mayor de aminoácidos no modificados, puede ser suficiente para aumentar el peso molecular del enlazador modificado hasta un punto que permita la separación física.

Se entenderá que, en un aspecto, el enlazador modificado comprende (i) una secuencia heteróloga de aminoácidos que se une con alta afinidad a una matriz de purificación y (ii) una secuencia heteróloga de aminoácidos que aumenta el peso molecular del polipéptido de neurotoxina de tal manera que los polipéptidos de neurotoxina parcialmente procesados y/o no procesados pueden ser separados físicamente del polipéptido de neurotoxina procesado.

Dicha secuencia heteróloga de aminoácidos deberá ser flanqueada en el terminal N y C por un sitio de reconocimiento y escisión de la proteasa. La presente invención prevé que el enlazador será removido completamente después de se ha completado el procesamiento. Esto se puede lograr mediante la introducción de dos sitios de reconocimiento y escisión de la proteasa que flanquean al extremo del terminal N y C de la secuencia

del enlazador. Tras la escisión de los sitios de escisión, se liberará un péptido con la secuencia del enlazador y la cadena ligera y pesada dimerizadas del polipéptido de neurotoxina permanecen como el polipéptido de neurotoxina maduro de doble cadena. En un aspecto, se prevé introducir en el extremo del terminal N y C de los sitios de reconocimiento y escisión de la secuencia del enlazador para la misma proteasa. En otro aspecto, se prevé introducir en el extremo del terminal N y C de los sitios de reconocimiento y escisión de la secuencia del enlazador para diferentes proteasas. Dependiendo de la proteasa que se va a utilizar de acuerdo con la presente invención, el sitio de reconocimiento de la proteasa puede diferir del sitio de escisión o puede ser idéntico al mismo. Por otra parte, se puede usar una proteasa exógena en un aspecto de acuerdo con la presente invención. Alternativamente, una actividad proteasa endógena que está presente en el enlazador u otras partes del polipéptido de neurotoxina, tal como la actividad proteasa de la neurotoxina, codificada por el polinucleótido de la invención, puede ser utilizada en otro aspecto de la invención. El último sistema de escisión de la proteasa autocatalítica para un único sitio de escisión ha sido descrito en más detalle en la patente de los Estados Unidos No. 7.556.817 que se incorpora aquí por referencia. En un aspecto, dicho sitio de reconocimiento y escisión de la proteasa se selecciona de entre el grupo que consiste en: el sitio de reconocimiento y escisión de la proteasa de cadena ligera de la neurotoxina de SNAP 25, el sitio de reconocimiento y escisión de una proteasa de *E. coli*, el sitio de reconocimiento y escisión de la trombina, el sitio de reconocimiento y escisión del Factor X, el sitio de reconocimiento y escisión de la tripsina, el sitio de reconocimiento y escisión de la enteroquinasa, el sitio de reconocimiento y escisión de la proteasa TEV, el sitio de reconocimiento y escisión de HRV 3c y el sitio de reconocimiento y escisión de la proteasa PreScission.

Convenientemente, se ha encontrado de acuerdo con la presente invención que un polipéptido de neurotoxina con un enlazador modificado como se especificó anteriormente puede ser purificado de manera más eficiente debido a la presencia de secuencias heterólogas de aminoácidos que confieren propiedades fisicoquímicas alteradas al enlazador que contiene polipéptidos que permite una purificación eficiente y confiable, tal como el enlazamiento por afinidad a una matriz o el aumento de peso molecular que permite mejorar la separación física. Por otra parte, se puede aumentar la solubilidad en función del tamaño y/o la hidrofobicidad del enlazador. Además, se pueden introducir otras propiedades que son adecuadas para la fabricación de polipéptidos de neurotoxina en el enlazador, tales como marcadores detectables, por ejemplo, proteínas fluorescentes. Estas propiedades persisten sólo durante el procesamiento ya que se removerán de la respectiva secuencia de aminoácidos como resultado de las etapas de procesamiento de los polipéptidos de neurotoxina maduros.

En un aspecto del polinucleótido de la presente invención, dicha secuencia heteróloga de aminoácidos que se une con alta afinidad a una matriz de purificación comprende una etiqueta de purificación.

El término "etiqueta de purificación" se refiere a una secuencia de aminoácidos que permite la purificación del polinucleótido que la contiene. Esto se puede lograr en un aspecto debido a la presencia de aminoácidos individuales, secuencias de péptidos o estructuras tridimensionales de péptidos que son capaces de interactuar física o químicamente con la matriz de purificación. Las etiquetas adecuadas incluyen etiquetas de afinidad y etiquetas de epítopos. En este contexto, es bien sabido que ciertos aminoácidos son capaces de formar complejos con matrices definidas que se usan para la purificación, tales como histidinas que son capaces de interactuar fisicoquímicamente con iones metálicos tales como níquel o cobalto embebidos en una matriz adecuada, tal como Sefarosa o agarosa. Se pueden encontrar otras secuencias de péptidos o estructuras tridimensionales en proteínas de enlazamiento a quitina (CBP), proteínas de enlazamiento a maltosa (MBP) o de glutatión S-transferasas (GST). En un aspecto adicional, se puede utilizar la interacción proteína-proteína basada en sistemas de etiqueta de purificación/matriz de purificación tal como los sistemas de estreptavidina/biotina, que son también bien conocidos en la técnica. En aún otro aspecto, la etiqueta puede conferir una propiedad fisicoquímica al polipéptido que la contiene que permite la purificación, tal como la fluorescencia. Etiquetas adecuadas en este contexto incluyen las proteínas fluorescentes bien conocidas, tales como la proteína fluorescente verde (GFP), la proteína fluorescente azul (BFP) u otras. Además de estas etiquetas que tienen una afinidad inherente por algunas matrices, se puede aplicar etiquetas de epítipo en otro aspecto. Tales etiquetas de epítipo consisten de tramos cortos de aminoácidos que constituyen un epítipo de péptido que puede ser reconocido específicamente por un anticuerpo. Las etiquetas de epítipo también son bien conocidas en la técnica e incluyen etiquetas FLAG, etiquetas de MYC, o etiquetas de HA. Por lo tanto, en un aspecto, la etiqueta de purificación se selecciona de entre el grupo que consiste en: etiqueta de His, etiqueta de Myc, etiqueta FLAG, etiqueta de estreptavidina, etiqueta de MBP, etiqueta de NusA, etiqueta de GST, estreptavidina y avidina.

En otro aspecto del polinucleótido de la invención, dicha secuencia heteróloga de aminoácidos que se une con alta afinidad a una matriz de purificación comprende (i) al menos un dominio de aminoácidos que confiere alta afinidad de enlazamiento a la matriz de purificación y (ii) al menos un dominio de aminoácidos que evita la interferencia de la secuencia heteróloga de aminoácido con la formación de enlaces disulfuro adecuados entre la cadena ligera y pesada.

En un aspecto, dicho al menos un dominio que confiere alta afinidad de enlazamiento con la matriz de purificación comprende una etiqueta de purificación como se describe en otra parte en este documento. En un aspecto adicional, dicho al menos un dominio de aminoácidos permite y/o facilita la formación de enlaces disulfuro apropiados entre la cadena pesada y la cadena ligera y/o previene la interferencia de la secuencia heteróloga de aminoácidos con la formación de enlaces disulfuro adecuados entre la cadena ligera y pesada. En un aspecto, dicho dominio forma una estructura tridimensional en donde los aminoácidos del terminal C y el terminal N de la secuencia heteróloga de aminoácidos están en proximidad física. Como resultado de la proximidad física de los aminoácidos del terminal N y el terminal C que, en un aspecto, está en el intervalo de proximidad de los átomos de azufre de un enlace disulfuro, es decir, alrededor de 2,0 Angstrom, la parte restante del enlazador sobresaldrá de la cadena ligera y pesada de la molécula de neurotoxina. En consecuencia, las propiedades que se le atribuyen por el enlazador como la alta afinidad de enlazamiento o una mayor solubilidad de la molécula, no están en proximidad física y, por lo tanto, no interfieren con la formación intramolecular apropiada del enlace disulfuro entre la cadena ligera y pesada. Además, en un aspecto el enlazador que sobresale también impide estéricamente la formación del enlace disulfuro intermolecular entre moléculas de neurotoxina separadas. En un aspecto, dicha estructura tridimensional, que pone los residuos de cisteína que forman el puente disulfuro intramolecular entre la cadena pesada y ligera muy cerca entre sí, es una espiral enrollada en forma antiparalela o una estructura de lámina beta antiparalela. En un aspecto, dicha bobina en espiral antiparalela se deriva de ferritina 1FHA, la variante de la glicoproteína de superficie 1VSG, el receptor 1LIGb Asp, el centro de reacción fotosintética de 1PRCm, el citocromo C' de 2CCY, el citocromo b562 de 256B, la lisozima T4 de 3LZM, la colicina 1COL1a, el centro de reacción fotosintética de 1PRC1, la citrato sintasa 2CTS, la proteína Rop 1ROP, la hormona del crecimiento humano 3HHR o la apolipoproteína A3 1 LPE. Cómo generar tales estructuras es bien conocido en la técnica y se describe, por ejemplo, en Gernert 1995, Protein Science 4 (11): 2252-22560 o Hadley 2008, Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU. 15: 105(2): 530-5; ambos se incorporan aquí por referencia.

En otro aspecto del polinucleótido de la invención, dicha secuencia heteróloga de aminoácidos comprende además al menos una secuencia detectable del aminoácido marcador.

En un aspecto, dicha secuencia detectable del aminoácido marcador se selecciona del grupo que consiste en: una secuencia de aminoácidos de una proteína fluorescente, una secuencia de aminoácidos de una enzima capaz de generar una señal detectable, y una secuencia de aminoácidos de una etiqueta detectable. En un aspecto, la proteína fluorescente es GFP o BFP. En otro aspecto, la enzima capaz de generar una señal detectable se selecciona de entre beta galactosidasa (GAL4), luciferasa de luciérnaga, o cloranfenicol transferasa (CAT). En aún otro aspecto, la etiqueta detectable es una etiqueta de epítipo tal como aquellas especificadas en esta en otro lugar en la memoria descriptiva (NusA-Tag).

En otro aspecto, el enlazador modificado comprende además secuencias de ácido nucleico que codifican dominios de polipéptido que confieren propiedades al polipéptido que mejoran la purificación o permiten o mejoran la solubilidad. Tales dominios de polipéptido, en un aspecto, pueden ser etiquetas de purificación adicionales como se indica en otra parte en el presente documento y que permiten una mejor purificación a través del enlazamiento de afinidad. Además, los dominios de polipéptido pueden permitir o facilitar la solubilidad debido a la presencia de residuos de aminoácidos hidrófilos. Los dominios adecuados son bien conocidos en la técnica.

Se debe entender que las definiciones y explicaciones de los términos hechas anteriormente se aplican, haciendo los cambios necesarios, a todos los aspectos descritos en esta memoria descriptiva que se presentan a continuación excepto que se indique otra cosa.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende el polinucleótido de la presente invención.

El término "vector", preferiblemente, abarca un fago, plásmido, vectores virales o retrovirales, así como cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales bacterianos o de levadura. Además, el término también se refiere a constructos objetivo que permiten la integración al azar o dirigida al sitio del constructo objetivo en el ADN genómico. Tales constructos objetivo, preferiblemente, comprenden ADN de longitud suficiente ya sea para recombinación homóloga o heteróloga como se describe en detalle a continuación. El vector que comprende los polinucleótidos de la presente invención, en un aspecto, comprende además marcadores seleccionables para propagación y/o selección en un anfitrión. El vector puede ser incorporado en una célula anfitriona mediante diversas técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede introducir un vector plásmido en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio o un precipitado de cloruro de rubidio, o en un complejo con un lípido cargado o en agrupaciones basadas en carbono, tales como los fullerenos. Alternativamente, un vector plásmido puede ser introducido mediante técnicas de choque térmico o electroporación. En caso de que el vector sea un virus, puede ser empaquetado in vitro usando una línea celular adecuada de empaquetamiento antes de la aplicación a las células anfitrionas. Los vectores retrovirales pueden ser de replicación competente o de replicación defectuosa. En este último caso, la propagación viral generalmente ocurrirá solamente en una anfitriona/células de complemento.

Además, en un aspecto de la invención, el polinucleótido está operativamente enlazado a secuencias de control de expresión que permiten la expresión en células anfitrionas procariotas o eucariotas o fracciones aisladas de la misma en dicho vector. La expresión del polinucleótido comprende la transcripción del polinucleótido en un ARNm que puede ser traducido. Los elementos reguladores que aseguran la expresión en células anfitrionas son bien conocidos en la técnica. En un aspecto, comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de señales de transcripción y/o de poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir reforzadores transcripcionales así como de la traducción. Posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células anfitrionas procariotas comprenden, por ejemplo, al promotor lac, al promotor trp o al promotor tac en *E. coli*, y ejemplos para los elementos reguladores que permiten la expresión en células anfitrionas eucariotas son el promotor de AOX1 o el promotor de GAL1 en levadura o el promotor del CMV, del SV40, o del RSV (virus del sarcoma de Rous), el reforzador de CMV, el reforzador de SV40 o un intrón de globina en células de mamífero y de otros animales. Otros sistemas de expresión previstos por la invención deben permitir la expresión en células de insecto, tales como los sistemas basados en el promotor de polihedrina.

Por otra parte, las secuencias inducibles de control de expresión se pueden utilizar en un vector de expresión abarcado por la presente invención. Tales vectores inducibles pueden comprender secuencias operadoras tet o lac o secuencias inducibles por choque térmico u otros factores ambientales. Las secuencias adecuadas de control de la expresión son bien conocidas en la técnica. Además de los elementos que son responsables por el inicio de la transcripción, tales elementos reguladores pueden comprender también señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio de SV40-poli-A o el sitio de tk-poli-A sitio, secuencia abajo del polinucleótido. En este contexto, se conocen en el arte vectores de expresión adecuados tales como el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pBluescript (Stratagene), pCDM8, pRc/CMV, pcADN1, pcADN3 (Invitrogen) o pSPORT41 (Invitrogen) o vectores derivados de baculovirus. Preferiblemente, dicho vector es un vector de expresión y un vector de transferencia o de orientación del gen. Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vacuna, virus adeno-asociados, virus del herpes, o virus del papiloma bovino, se puede usar para el suministro de los polinucleótidos o del vector de la invención en la población de células objetivo. Los métodos que son bien conocidos para aquellos expertos en la técnica pueden usarse para construir vectores virales recombinantes; véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y. y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994).

La presente invención se refiere además a una célula anfitriona que comprende el polinucleótido o el vector de la presente invención.

El término "célula anfitriona" como se usa en el presente documento abarca células anfitrionas procariotas y eucariotas. En un aspecto la célula anfitriona es una célula bacteriana y, en otro aspecto, una célula bacteriana Firmicutes. En un aspecto, dicha célula anfitriona bacteriana es una célula anfitriona de *E. coli*. En otro aspecto, es una célula anfitriona de Clostridium. En un aspecto adicional, dicha célula anfitriona de Clostridium es una célula anfitriona de Clostridium botulinum, incluso en un aspecto adicional, una célula de uno de los siete serotipos diferentes anteriormente mencionados de Clostridium botulinum. En aún otro aspecto, la célula anfitriona bacteriana es una célula anfitriona de Clostridium tetani. En un aspecto adicional, la célula anfitriona es una célula anfitriona de Bacillus y en un aspecto particular, una célula anfitriona de Bacillus megaterium. Una célula anfitriona eucariota, en un aspecto, es una célula de una línea celular animal adecuada para la producción de proteínas tóxicas o una célula anfitriona fúngica tal como una célula anfitriona de levadura. Una célula anfitriona como la mencionada aquí, por lo tanto, abarca en un aspecto células de levadura, de mamíferos, vegetales o de insectos, ya sea como células primarias o como líneas celulares.

La presente invención también se refiere a un polipéptido codificado por el polinucleótido de la presente invención.

El término "polipéptido" tal como se utiliza aquí abarca polipéptidos aislados o esencialmente purificados que están esencialmente libres de otros polipéptidos, incluyendo las proteínas complejantes (HA70, HA17, HA33, o NTNH (NBP)) de la célula anfitriona o preparaciones de polipéptido que comprenden además otras proteínas. Por otra parte, el término incluye polipéptidos químicamente modificados. Tales modificaciones pueden ser modificaciones artificiales o modificaciones de origen natural. Como se mencionó anteriormente, el polipéptido de la presente invención tendrá las propiedades biológicas de los polipéptidos de neurotoxina mencionados anteriormente. El polipéptido de la invención, en un aspecto, puede ser fabricado por un método de fabricación de un polipéptido como se describe en otra parte en este documento en más detalle. En un aspecto de la invención, también se prevé una preparación de polipéptido que comprende un complejo del polipéptido de neurotoxina y sus proteínas complejantes mencionadas anteriormente.

Además, la presente invención abarca un método para la fabricación de un polipéptido de neurotoxina procesado que comprende las etapas de:

5 a) poner en contacto el polipéptido de neurotoxina sin procesar de la presente invención con una matriz de purificación bajo las condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir el enlazamiento de dicho polipéptido de neurotoxina sin procesar a la matriz de purificación;

10 b) poner en contacto el polipéptido de neurotoxina no procesado enlazado a la matriz de purificación con una proteasa que es capaz de escindir el polipéptido de neurotoxina en los sitios de reconocimiento y escisión de la proteasa dando como resultado polipéptidos de neurotoxina procesados y parcialmente procesados y/o no procesados; y

c) remover el polipéptido de neurotoxina procesado liberado de la matriz de purificación.

15 Se entenderá que los métodos para fabricación de polipéptidos de neurotoxina especificados en el presente documento pueden comprender etapas adicionales, tales como etapas relacionados con la síntesis de las neurotoxinas, etapas de lavado o etapas relativas a la formulación de los polipéptidos de neurotoxina purificados en las preparaciones de neurotoxina que pueden ser aplicadas como composiciones farmacéuticas o cosméticas, respectivamente.

20 El término "poner en contacto" tal como se utiliza aquí, se refiere a poner en contacto al menos dos compuestos diferentes en proximidad física para permitir la interacción física y/o química de dichos compuestos. En el método anteriormente mencionado, la neurotoxina sin procesar de acuerdo con la presente invención, es decir, polipéptidos de neurotoxina que comprenden un enlazador modificado como se especificó anteriormente, se pone en contacto con una matriz de purificación durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir el enlazamiento de dicha neurotoxina sin procesar a la matriz. Dicho tiempo y condiciones dependerán del tipo de enlazamiento que se logra entre el enlazador y la matriz. La persona capacitada en la técnica es bien consciente de qué condiciones deben aplicarse para una combinación dada de matriz de purificación y el enlazador. La puesta en contacto puede llevarse a cabo por medio de cromatografía o por lotes. Tras el enlazamiento de la neurotoxina sin procesar, se pueden llevar a cabo etapas de lavado con el fin de remover (recuperar) la neurotoxina sin procesar no enlazada y otras proteínas de la célula anfitriona.

35 Posteriormente, el polipéptido de neurotoxina sin procesar enlazado a la matriz de purificación se pone en contacto con una proteasa que es capaz de escindir el polipéptido de neurotoxina en los sitios de reconocimiento y escisión de la proteasa y durante el tiempo y las condiciones que permitan la actividad proteasa. La proteasa en este contexto puede proporcionarse como una preparación de una enzima purificada o como un lisado celular de una célula que expresa dicha proteasa en forma endógena o exógena. Como resultado de la actividad proteasa, los polipéptidos de neurotoxina con el enlazador modificado serán escindidos en polipéptidos de neurotoxina procesados y parcialmente procesados. Algunos polipéptidos de neurotoxina pueden incluso mantenerse en forma no escindida como polipéptidos de neurotoxina sin procesar. Las condiciones adecuadas para el tratamiento con proteasa antes mencionadas dependen de la proteasa que se va a utilizar y pueden ser adaptadas por el experto en la materia sin más preámbulos.

45 Los polipéptidos de neurotoxina procesados tras la escisión perderán sus enlazadores modificados que son responsables por el enlazamiento a la matriz de purificación y son, por lo tanto, liberados de la matriz. Por el contrario, los polipéptidos de neurotoxina parcialmente procesados o sin procesar permanecen enlazados a la matriz de purificación debido a la presencia de los enlazadores modificados en dichas moléculas. Los polipéptidos de neurotoxina maduros, procesados, pueden ser removidos de la matriz de purificación por lavado con un regulador apropiado o agua.

50 En un aspecto particular del método mencionado anteriormente, el enlazador del polipéptido de neurotoxina comprende una etiqueta de epítipo tal como se especifica en otra parte en este documento y la matriz de purificación contiene un anticuerpo que se enlaza específicamente con dicha etiqueta de epítipo. En un aspecto, dicha matriz de purificación se aplica por cromatografía de afinidad en columna de la siguiente manera. Se aplica una solución que comprende el polipéptido de neurotoxina sin procesar de acuerdo con la invención a la columna. La solución se mantiene en la columna durante un tiempo y bajo las condiciones que permiten el enlazamiento específico de las etiquetas de epítipo en los enlazadores modificadas de los polipéptidos de neurotoxina sin procesar a la matriz de purificación. Posteriormente, se remueve el exceso de polipéptido de neurotoxina sin procesar mediante etapas de lavado. Después de dichas etapas de lavado, se aplica una solución que comprende una proteasa capaz de reconocer y escindir los sitios de reconocimiento y escisión que flanquean al enlazador modificado. El polipéptido de neurotoxina sin procesar enlazado a la matriz de purificación se incubaba con la proteasa

para permitir la escisión proteolítica en ambos sitios de escisión. Como consecuencia de dicha reacción de escisión, se libera polipéptido de neurotoxina procesado, maduro, de la matriz de purificación, mientras que el polipéptido de neurotoxina sin procesar o parcialmente procesado permanece enlazado a la matriz de purificación debido a su asociación con el enlazador. La neurotoxina procesada liberada puede ser luego eluida de la columna.

5 En otro aspecto particular del método mencionado anteriormente, el enlazador del polipéptido de neurotoxina comprende una etiqueta de poli-histidina, tal como una etiqueta de hexa-His, como se especifica en otra parte en este documento y la matriz de purificación representa una Sefarosa que contiene níquel, cobalto, cobre y zinc u otro medio de cromatografía. En un aspecto, dicha matriz de purificación se aplica para cromatografía de afinidad en
10 columna de la siguiente manera. Se aplica una solución que comprende el polipéptido de neurotoxina sin procesar de acuerdo con la invención a la columna. La solución se mantiene en la columna durante un tiempo y bajo condiciones que permitan el enlazamiento específico de la etiqueta hexa-His en los enlazadores modificados de los polipéptidos de neurotoxina sin procesar con los iones níquel o cobalto en la matriz de purificación. Posteriormente,
15 se remueven el exceso de polipéptidos de neurotoxina sin procesar y la proteína de las células anfitrionas especialmente contaminantes mediante etapas de lavado. Después de dichas etapas de lavado, se aplica una solución que comprende una proteasa capaz de reconocer y escindir los sitios de reconocimiento y escisión que flanquean al enlazador modificado. El polipéptido de neurotoxina sin procesar enlazado a la matriz de purificación se incuba con el proteasa para permitir la escisión proteolítica en ambos sitios de escisión. Como consecuencia de dicha reacción de escisión, se libera el polipéptido de neurotoxina procesado, maduro, de la matriz de purificación,
20 mientras que el polipéptido de neurotoxina sin procesar o parcialmente procesado permanece enlazado a la matriz de purificación debido a su asociación con el enlazador. La neurotoxina procesada liberada puede ser luego eluida de la columna.

25 Además, la presente invención se refiere a un método para la fabricación de un polipéptido de neurotoxina procesado que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto un polipéptido de neurotoxina de la presente invención con una proteasa que es capaz de escindir el polipéptido de neurotoxina en los sitios de reconocimiento y escisión de la proteasa;
- 30 b) poner en contacto el polipéptido de neurotoxina procesado, sin procesar y/o parcialmente procesado obtenido en la etapa a) con una matriz de purificación bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir el enlazamiento de dicho polipéptido de neurotoxina sin procesar y/o parcialmente procesado a la matriz de purificación; y
- 35 c) remover el polipéptido de neurotoxina procesado, liberado, de la matriz de purificación.

40 En un aspecto del método mencionado anteriormente, la etapa a) se lleva a cabo en una célula anfitriona que expresa el polinucleótido de la invención y una proteasa que es capaz de escindir el polipéptido de neurotoxina en los sitios de reconocimiento y escisión de la proteasa. En un aspecto, dicha proteasa se puede expresar de forma endógena en dicha célula anfitriona. En otro aspecto, dicha proteasa se expresa a partir de un constructo de expresión que ha sido introducido en dicha célula anfitriona. En un aspecto, la célula anfitriona es un lisado de célula anfitriona o una célula anfitriona como se menciona en el presente documento en otra parte.

45 Además, la invención contempla un método para la fabricación de un polipéptido de neurotoxina procesado que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto un polipéptido de neurotoxina de la presente invención con una proteasa que es capaz de escindir el polipéptido de neurotoxina en los sitios de reconocimiento y escisión de la proteasa;
- 50 b) someter el polipéptido de neurotoxina procesado, sin procesar y/o parcialmente procesado obtenido en la etapa a) a condiciones físicas durante un tiempo suficiente para permitir la separación física de los polipéptidos de neurotoxina parcialmente procesados o sin procesar de los polipéptidos de neurotoxina procesados; y
- c) remover el polipéptido de neurotoxina procesado después de dicha separación física.

55 El término "someter" tal como se utiliza aquí se refiere a la aplicación de las condiciones físicas al polipéptido de neurotoxina procesado, sin procesar y/o parcialmente procesado. Dependiendo de las condiciones físicas que se aplican para la separación, la persona capacitada en la técnica sabe cómo llevar a cabo dicho sometimiento. En un aspecto, someter comprende realizar cromatografía de exclusión, cuyos principios se definen aquí adicionalmente

en otra parte en este documento. En otro aspecto, el sometimiento comprende filtración, por ejemplo, ultrafiltración. En otro aspecto, comprende someter la centrifugación, por ejemplo, ultracentrifugación. En aún otro aspecto, el sometimiento comprende electroforesis en gel, en un aspecto, en una escala preparativa. Después de separar físicamente la especie molecular de la neurotoxina presente después de la escisión en las moléculas de polipéptido de neurotoxina completamente procesadas y las moléculas de neurotoxina no procesadas y/o parcialmente procesadas, dichos polipéptidos de neurotoxina procesados se pueden remover mediante medidas adecuadas bien conocidas en la técnica. Si en un aspecto se aplica cromatografía de exclusión por tamaño para la separación física, se pueden obtener los polipéptidos de neurotoxina procesados a partir de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño mediante la recolección del eluato en diferentes fracciones. Los polipéptidos de neurotoxina procesados y los no procesados y/o parcialmente procesados estarán presentes en diferentes fracciones en tal caso.

En otro aspecto de los métodos de la invención, la fabricación del polipéptido de neurotoxina comprende etapas adicionales de purificación. En un aspecto, dichas etapas de purificación adicionales comprenden cromatografía de exclusión por tamaño.

Por cromatografía de exclusión por tamaño, como se usa en la presente invención, se separan las partículas con base en su tamaño, es decir, en su volumen hidrodinámico. Una fase móvil es o ya sea una solución acuosa usada para transportar la muestra (cromatografía de filtración en gel), o un solvente orgánico (cromatografía de permeación en gel). Una fase estacionaria es ya sea un medio de gel (poliacrilamida, dextrano o agarosa) y un filtro a baja presión, o medio de sílice, o de poliestireno entrecruzado a una presión más alta. En aún otro aspecto, dicha cromatografía de exclusión por tamaño se realiza como una cromatografía en columna. En un aspecto adicional del método de la presente invención, dicha cromatografía de exclusión por tamaño se realiza usando tamices moleculares con diferentes tamaños de poro tales como carbón activado, gel de sílice, zeolita.

El método de la presente invención, en otro aspecto, comprende además cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico tal como se utiliza en la presente invención separa moléculas con base en las diferencias entre la carga total de las proteínas y los compuestos relacionados. Se utiliza para la purificación de la proteína, para la purificación de oligonucleótidos, péptidos u otras moléculas cargadas. Dichas moléculas pueden estar presentes en la solución que se va a aplicar al método de la purificación como contaminaciones. La proteína o el compuesto relacionado de interés, en el presente caso la Neurotoxina, debe tener una carga opuesta a aquella del grupo funcional enlazado a la resina para el enlazamiento. Debido a que esta interacción es iónica, el enlazamiento debe tener lugar bajo condiciones iónicas bajas. La elución se logra mediante el aumento de la fuerza iónica para romper la interacción iónica, o cambiando el pH de la proteína. En un aspecto del método de la invención, dicha cromatografía de intercambio se realiza como cromatografía en columna. La cromatografía de intercambio iónico como se usa en la presente invención es en un aspecto adicional realizado por cromatografía catiónica y/o aniónica. En cromatografía de intercambio aniónico como se utiliza aquí la carga superficial de los solutos (proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, endotoxinas) que se enlazan será una carga negativa neta, para así conseguir el enlazamiento de una proteína específica debe estar cerca o por encima del pI de esa proteína. Las resinas de intercambio aniónico comúnmente utilizados son resinas Q (Sefarosa Q), una amina cuaternaria; y una resina DEAE (DiEtilAminoEtano). Generalmente, una resina de intercambio iónico es una matriz insoluble de perlas pequeñas que tienen una superficie cargada, utilizada como una zeolita artificial. Se pueden distinguir diferentes tipos de resinas con base en sus grupos funcionales incluyendo resinas fuertemente ácidas (grupos de ácido sulfónico, por ejemplo, sulfonato de poliestireno sódico o poliAMPS), resinas fuertemente básicas, (grupos amino cuaternarios, por ejemplo, grupos trimetilamonio, por ejemplo, poliAPTAC), resinas débilmente ácidas (en su mayoría, grupos ácidos carboxílicos), resinas débilmente básicas (grupos amino primarios, secundarios y/o terciarios, por ejemplo, polietilén amina). Existen también tipos especializados de resinas que se pueden distinguir también incluyendo resinas quelantes (ácido iminodiacético, tiourea). En cromatografía de intercambio catiónico como se usa aquí, la carga superficial de los solutos (proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, endotoxinas) que se enlazan serán cargas positivas netas, por lo que para conseguir el enlazamiento de una proteína específica se debe estar cerca o por debajo del pI de esa proteína. Las resinas de intercambio catiónico comúnmente usadas son resinas S, derivadas de sulfato; y resinas CM, iones derivados de carboxilato.

Otras técnicas de purificación que pueden ser utilizadas en etapas adicionales de purificación de acuerdo con el método de la presente invención incluyen cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía multimodal (por ejemplo, Capto MMC o Capto Adhere), cromatografía de afinidad (por ejemplo, Sefarosa azul) y/o matrices de hidroxapatita.

En un aspecto del método de la presente invención, dicha cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo antes y/o después de poner en contacto el polipéptido de neurotoxina procesado, sin procesar y/o parcialmente procesado con la matriz de purificación. En otro aspecto del método de la invención, dicha cromatografía de intercambio iónico

como se usa aquí se lleva a cabo antes de poner en contacto el polipéptido de neurotoxina procesado, sin procesar y/o parcialmente procesado con la matriz de purificación. Debido a esta medición, el riesgo de reactividad cruzada potencial o de enlazamiento inespecífico durante la cromatografía de afinidad puede ser además evitada y reducida.

5 El método de la presente invención permite la fabricación de polipéptido de neurotoxina activo procesado esencialmente libre del polipéptido precursor sin procesar o parcialmente procesado y, por lo tanto, la obtención de mayores cantidades del polipéptido de neurotoxina activo procesado. Tales polipéptidos de neurotoxina pueden ser utilizados para la formulación de medicamentos o composiciones cosméticas. Esencialmente libre en este contexto significa que la neurotoxina sin procesar y/o parcialmente procesada está por debajo de un cierto umbral, en un aspecto, menor al 2,5%, menor al 1%, menor al 0,5% o menor al 0,1% de la neurotoxina total contenida en una muestra dada.

10 Por lo tanto, la presente invención también se relaciona con un método para la fabricación de un medicamento que comprende las etapas del método mencionado anteriormente y la etapa adicional de formulación del polipéptido de neurotoxina proteolíticamente procesado como medicamento.

15 El término "medicamento" como se usa aquí, se refiere, en un aspecto, a una composición farmacéutica que contiene al polipéptido de neurotoxina biológicamente activo (procesado proteolíticamente) como un compuesto farmacéutico activo, en donde la composición farmacéutica se puede utilizar para terapia humana o no humana de diversas enfermedades o trastornos en una dosis terapéuticamente efectiva.

20 Una composición farmacéutica como la utilizada aquí comprende al polipéptido Neurotoxina biológicamente activo (procesado proteolíticamente), y en un aspecto, uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. La neurotoxina activa puede estar presente en forma líquida o liofilizada. En un aspecto, dicho compuesto puede estar presente junto con glicerol, estabilizadores de proteína (por ejemplo, albúmina de suero humana (HAS)) o sin estabilizadores de proteína.

25 La composición farmacéutica es, en un aspecto, administrada en forma tópica. La administración de un fármaco usado convencionalmente se realiza en forma intramuscular, subcutánea (cerca a las glándulas). Sin embargo, dependiendo de la naturaleza y del modo de acción de un compuesto, se puede administrar la composición farmacéutica también mediante otras rutas.

30 El compuesto, es decir, el polipéptido de neurotoxina biológicamente activo (procesado proteolíticamente) es el ingrediente activo de la composición, y es en un aspecto administrado en formas de dosificación convencionales preparadas mediante la combinación del fármaco con portadores farmacéuticos estándar de acuerdo con procedimientos convencionales. Estos procedimientos pueden implicar mezcla, granulación, y compresión, o disolución de los ingredientes según sea conveniente para la preparación deseada. Se apreciará que la forma y el carácter del portador o diluyente farmacéuticamente aceptable están dictados por la cantidad de ingrediente activo con la cual se combinan, la ruta de administración y otras variables bien conocidas.

35 El (los) portador(es) debe(n) ser aceptable(s) en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor de los mismos. El portador farmacéutico empleado puede incluir un sólido, un gel, o una líquido. Los ejemplos de portadores sólidos son lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Ejemplos de portadores líquidos son una solución salina regulada con fosfato, jarabe, aceite, agua, emulsiones, diversos tipos de agentes humectantes, y similares. En forma similar, el portador o diluyente puede incluir material de retardo bien conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solos o con una cera. Dichos portadores adecuados comprenden aquellos mencionados anteriormente y otros bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania.

40 El (los) diluyente(s) es/son seleccionados para no afectar la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica pueden incluir también otros portadores, adyuvantes, o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

45 Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a una cantidad del compuesto que se utiliza en una composición farmacéutica que previene, mejora o trata los síntomas que acompañan a una enfermedad o condición mencionada en esta memoria descriptiva. La eficacia terapéutica y toxicidad del compuesto se puede determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales experimentales, por ejemplo, ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población) y LD50 (la dosis letal para 50% de la población). La

relación de dosis entre los efectos terapéutico y tóxico es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación LD50 / ED50.

5 El régimen de dosificación se determinará por el médico tratante y otros factores clínicos. Como es bien conocido en las artes médicas, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, la superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se administra, el sexo, el tiempo y la ruta de administración, el estado general de salud, y otros medicamentos que se administran de forma concurrente. El progreso se puede monitorear mediante las evaluaciones periódicas.

10 Las composiciones y las formulaciones farmacéuticas mencionadas aquí se administran al menos una vez con el fin de tratar o aliviar o prevenir una enfermedad o condición mencionada en esta memoria descriptiva. Sin embargo, dichas composiciones farmacéuticas se pueden administrar más de una vez.

15 Las composiciones farmacéuticas específicas se preparan en una manera bien conocida en el arte farmacéutico y comprenden al menos un compuesto activo mencionado en este documento anteriormente en mezcla o bien asociados con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Para la elaboración de esas composiciones farmacéuticas específicas, el compuesto se mezclará(n) el(los) compuesto(s) activo(s) normalmente con un portador o el diluyente. Las formulaciones resultantes se deben adaptar al modo de administración. Las recomendaciones de dosificación se deben indicar en los prescriptores o las instrucciones para los usuarios con el fin de anticipar los ajustes de las dosis dependiendo del receptor considerado.

25 El medicamento puede en un aspecto adicional de la invención comprender fármacos además del péptido neurotoxina biológicamente activo (procesado proteolíticamente) que se añaden a la composición farmacéutica durante su formulación. Finalmente, se entiende que la formulación de una composición farmacéutica tiene lugar bajo condiciones estandarizadas de BPM o similares con el fin de asegurar la calidad, la seguridad farmacéutica, y la efectividad del medicamento.

30 La presente descripción, en general, contempla una composición que comprende al polipéptido de neurotoxina proteolíticamente procesado que puede ser obtenido por el método de la presente invención.

35 El término "composición" se refiere a cualquier composición formulada en forma sólida, líquida, o en aerosol (o gaseosa). Dicha composición comprende al compuesto opcionalmente junto con compuestos auxiliares adecuados, tales como diluyentes o portadores u otros ingredientes. En este contexto, se distingue entre compuestos auxiliares, es decir, compuestos que no contribuyen a los efectos provocados por el compuesto después de la aplicación de la composición para su propósito deseado, e ingredientes adicionales, es decir, compuestos que contribuyen a un efecto adicional o que modulan el efecto del compuesto. Los diluyentes adecuados y/o portadores dependen del propósito para el cual se utiliza la composición y los otros ingredientes. La persona capacitada en la técnica puede determinar tales diluyentes y/o portadores adecuados sin más preámbulos. Los ejemplos de portadores y/o diluyentes adecuados se describen en otra parte en este documento.

40 En un aspecto adicional de la divulgación, la composición anteriormente mencionada es un medicamento tal como se especifica en otra parte en la descripción en forma más detallada. En un aspecto, dicho medicamento puede ser usado para la prevención y/o tratamiento de al menos una de las siguientes enfermedades y trastornos: la fuerza muscular voluntaria, distonía focal, incluyendo distonía cervical, craneal, y blefaroespasma esencial benigno, espasmo hemifacial, y espasticidad focal, trastornos gastrointestinales, hiperhidrosis, y corrección cosmética de las arrugas, en un aspecto adicional también blefaroespasma, distonía oromandibular, del tipo de apertura de la mandíbula, del tipo de cierre de la mandíbula, bruxismo, síndrome de Meige, distonía lingual, apraxia del párpado, distonía de apertura cervical, antecolis, retrocolis, laterocolis, tortícolis, distonía faríngea, distonía laríngea, disfonía espasmódica / tipo aductor, disfonía espasmódica/tipo abductor, disnea espasmódica, distonía de las extremidades, distonía de los brazos, distonía específica de tareas, calambre del escritor, calambres del músico, calambre del golfista, distonía de las piernas, aducción del muslo, flexión de la rodilla con abducción del muslo, extensión de la rodilla, flexión del tobillo, extensión de tobillo, equinovaro, deformidad por distonía del pie, dedo estriado del pie, flexión del dedo del pie, extensión del dedo del pie, distonía axial, síndrome pisa, distonía de la danza del vientre, distonía segmentaria, hemidistonia, distonía generalizada, distonía en Lubag, distonía tardía, distonía en ataxia espinocerebelosa, distonía en la enfermedad de Parkinson, distonía en la enfermedad de Huntington, distonía en la enfermedad de Hallervorden Spatz, discinesias inducidas por dopa/ distonía inducida por dopa, discinesias tardías / distonía tardía, discinesias/distonías paroxística, mioclonías palatales inducidas por acción cinesigénica no cinesigénica, mioquimia mioclonías, rigidez, calambres musculares benignos, temblor hereditario del mentón, actividad muscular paradójica de la mandíbula, espasmos hemimasticatorios, miopatía branquial hipertrófica, hipertrofia masetérica, hipertrofia anterior de la tibia, nistagmo, parálisis supranuclear progresiva de la mirada, epilepsia parcial continua, planificación de la operación espasmódica de la tortícolis, parálisis de las cuerdas vocales

5 abductoras, disfonía mutacional recalcitrante, disfunción del esfínter esofágico superior, granuloma de las cuerdas vocales, síndrome de tartamudeo de Gilles de la Tourette, mioclonías del oído medio, cierre protector de la laringe, postlaringectomía, insuficiencia discursiva, ptosis protectora, disfunción de Odii del esfínter estropion, pseudoacalasia, nonacalasia, trastornos motores esofágicos, vaginismo, temblor por inmovilización postoperatoria, disfunción de la vejiga, disinergia del esfínter detrusor, espasmo del esfínter de la vejiga, espasmo hemifacial, discinesias por reinervación, patas de gallo de uso cosmético, asimetrías faciales por fruncido del ceño, hoyuelos mentonianos, síndrome de persona rígida, hiperplasia prostática por tétanos, adiposidades, tratamiento del estrabismo infantil por parálisis cerebral, parálisis mixta concomitante, después de cirugía por desprendimiento de retina, después de cirugía de cataratas, en estrabismo miosítico por afasia, estrabismo miopático, desviación vertical disociada, como complemento de la cirugía de estrabismo, esotropía, exotropía, acalasia, fisuras anales, hiperactividad de glándula exocrina, síndrome Frey, síndrome de las Lágrimas de cocodrilo, hiperhidrosis, rinorrea plantar palmaria axilar, hipersalivación relativa en accidente cerebrovascular, en enfermedad de Parkinson, en condiciones de esclerosis espástica lateral amiotrófica, en procesos autoinmunes de encefalitis y mielitis, esclerosis múltiple, mielitis transversal, síndrome de Devic, infecciones virales, infecciones bacterianas, infecciones parasitarias, infecciones por hongos, en infarto hemisférico por síndrome postapopléctico de paraparesis espástica hereditaria, infarto del tallo cerebral, infarto del miocardio mielina, en trauma del sistema nervioso central, lesiones hemisféricas, lesiones del tallo cerebral, lesión de la mielina, en hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia intracerebral, hemorragia subaracnoidea, hemorragia subdural, hemorragia intraespinal, en neoplasias, tumores hemisféricos, tumores del tallo cerebral, tumores de la mielina. Para detalles y síntomas, véase, por ejemplo, Jost 2007, Drugs 67 (5), 669 o Dressler 2000 en Botulinum Toxin Therapy, Thieme Verlag, Stuttgart, Nueva York.

25 En otro aspecto de la descripción, la composición es una composición cosmética que puede ser formulada como se describe para una composición farmacéutica anterior. Para una composición cosmética, del mismo modo, se prevé que el compuesto de la presente descripción es en un aspecto utilizado en forma sustancialmente pura. Las composiciones cosméticas son, en un aspecto adicional, para ser aplicadas en forma intramuscular. En aún un aspecto adicional de la descripción, las composiciones cosméticas que contienen la neurotoxina pueden ser formuladas como una solución antiarrugas.

30 Figuras

35 La Figura 1 es un dibujo esquemático de dos formas de realización de acuerdo con la presente invención (A y B). (A) muestra un polipéptido de neurotoxina con cadena (1) ligera y cadena (2) pesada con un enlazador que comprende una etiqueta (4) de epítipo flanqueada por dos sitios (3) de reconocimiento y escisión de la proteasa. (B) muestra un polipéptido de neurotoxina con cadena (1) ligera y la cadena (2) pesada con un enlazador que comprende una etiqueta (4) de epítipo dentro de una estructura (5) en espiral embobinada flanqueada por dos sitios (3) de reconocimiento y escisión de la proteasa.

Listado de secuencias

40 <110> Merz Pharma GmbH & Co.KGaA

<120> Fabricación selectiva de polipéptidos de neurotoxina recombinantes

45 <130> MP66826PC

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

50 <210> 1

<211> 3891

<212> ADN

<213> Clostridium botulinum

55 <400> 1

atgccatttg	ttaataaaca	atttaattat	aaagatcctg	taaatggtgt	tgatattgct	60
tatataaaaa	ttccaaatgc	aggacaaatg	caaccagtaa	aagcttttaa	aattcataat	120
aaaatatggg	ttattccaga	aagagataca	tttacaatc	ctgaagaagg	agatttaaat	180
ccaccaccag	aagcaaaaca	agttccagtt	tcatattatg	attcaacata	tttaagtaca	240
gataatgaaa	aagataatta	tttaaagggg	gttacaaaat	tatttgagag	aatttattca	300
actgatcttg	gaagaatgtt	gttaacatca	atagtaaggg	gaataccatt	ttggggtgga	360
agtacaatag	atacagaatt	aaaagttatt	gatactaatt	gtattaatgt	gatacaacca	420
gatggtagtt	atagatcaga	agaacttaat	ctagtaataa	taggaccctc	agctgatatt	480
atacagtttg	aatgtaaaag	ctttggacat	gaagttttga	atcttacgcg	aaatggttat	540
ggctctactc	aatacattag	atntagccca	gattttacat	ttggttttga	ggagtcactt	600
gaagttgata	caaatcctct	tttaggtgca	ggcaaatttg	ctacagatcc	agcagtaaca	660
ttagcacatg	aacttataca	tgctggacat	agattatatg	gaatagcaat	taatccaaat	720
agggttttta	aagtaaatac	taatgcctat	tatgaaatga	gtgggttaga	agtaagcttt	780
gaggaactta	gaacatttgg	gggacatgat	gcaaagttta	tagatagttt	acaggaaaac	840
gaatttcgtc	tatattatta	taataagttt	aaagatatag	caagtacact	taataaagct	900
aatcaatag	taggtactac	tgcttcatta	cagtatatga	aaaatgtttt	taaagagaaa	960
tatctcctat	ctgaagatac	atctggaaaa	ttttcggtag	ataaattaa	at ttgataag	1020
ttatacaaaa	tgttaacaga	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	ttagttttaga	tttaatacaa	1500
caatattatt	taaccttaa	ttttgataat	gaacctgaaa	atatttcaat	agaaaatcct	1560

tcaagtgaca	ttataggcca	attagaactt	atgcctaata	tagaaagatt	tcctaattgga	1620
aaaagtatg	agttagataa	atatactatg	ttccattatc	ttcgtgctca	agaatttgaa	1680
catggtaaat	ctaggattgc	tttaacaaat	tctgttaacg	aagcattatt	aaatcctagt	1740
cgtgtttata	catttttttc	ttcagactat	gtaaagaaag	ttaataaagc	tacggaggca	1800
gctatgtttt	taggctgggt	agaacaatta	gtatatgatt	ttaccgatga	aactagcgaa	1860
gtaagtacta	cggataaaat	tgcggatata	actataatta	ttccatatat	aggacctgct	1920
ttaaataatag	gtaatatggt	atataaagat	gattttgtag	gtgctttaat	attttcagga	1980
gctgttattc	tgttagaatt	tataccagag	attgcaatac	ctgtattagg	tacttttgca	2040
cttgtatcat	atattgcgaa	taaggttcta	accgttcaaa	caatagataa	tgctttaagt	2100
aaaagaaatg	aaaaatggga	tgaggtctat	aaatatatag	taacaaattg	gtagcaaag	2160
gttaatacac	agattgatct	aataagaaaa	aaaatgaaag	aagctttaga	aaatcaagca	2220
gaagcaacaa	aggctataat	aaactatcag	tataatcaat	atactgagga	agagaaaaat	2280
aatattaatt	ttaatattga	tgatttaagt	tcgaaactta	atgagtctat	aaataaagct	2340
atgattaata	taaataaatt	tttgaatcaa	tgctctgttt	catatttaat	gaattctatg	2400
atcccttatg	gtgttaaacg	gttagaagat	tttgatgcta	gtcttaaaga	tgcatatta	2460
aagtatatat	atgataatag	aggaacttta	attggtcaag	tagatagatt	aaaagataaa	2520
gttaataata	cacttagtac	agatatacct	tttcagcttt	ccaatacgt	agataatcaa	2580
agattattat	ctacatttac	tgaatatatt	aagaatatta	ttaatacttc	tatattgaat	2640
ttaagatatg	aaagtaatca	tttaatagac	ttatctaggt	atgcatcaaa	aataaatatt	2700
ggtagtaaag	taaattttga	tccaatagat	aaaaatcaaa	ttcaattatt	taatttagaa	2760
agtagtaaaa	ttgaggtaat	tttaaaaaat	gctattgtat	ataatagtat	gtatgaaaat	2820
tttagtacta	gcttttggt	aagaattcct	aagtatttta	acagtataag	tctaaataat	2880
gaatatacaa	taataaattg	tatggaaaat	aattcaggat	ggaaagtatc	acttaattat	2940
ggtgaaataa	tctggacttt	acaggatact	caggaaataa	aacaaagagt	agtttttaa	3000
tacagtcaaa	tgattaatat	atcagattat	ataaacagat	ggatttttgt	aactatcact	3060
aataatagat	taaataactc	taaaatttat	ataaatggaa	gattaataga	tcaaaaacca	3120
atttcaaatt	taggtaatat	tcatgctagt	aataatataa	tgtttaaatt	agatggttgt	3180
agagatacac	atagatatat	ttggataaaa	tattttaatc	tttttgataa	ggaattaaat	3240
gaaaaagaaa	tcaaagattt	atatgataat	caatcaaatt	caggattttt	aaaagacttt	3300
tggggtgatt	atttacaata	tgataaacca	tactatatgt	taaatttata	tgatccaaat	3360
aaatatgtcg	atgtaaataa	tgtaggtatt	agaggttata	tgtatcttaa	agggcctaga	3420
ggtagcgtaa	tgactacaaa	catttattta	aattcaagtt	tgtatagggg	gacaaaattt	3480
attataaaaa	aatatgcttc	tggaaataaa	gataatattg	ttagaaataa	tgatcgtgta	3540
tatattaatg	tagtagttaa	aaataaagaa	tataggttag	ctactaatgc	atcacaggca	3600

ggcgtagaaa aaataactaag tgcattagaa atacctgatg taggaaatct aagtcaagta 3660
 gtagtaatga agtcaaaaaa tgatcaagga ataacaaata aatgcaaaat gaatttacia 3720
 gataataatg ggaatgatat aggctttata ggatttcatc agtttaataa tatagctaaa 3780
 ctagtagcaa gtaattggta taatagacaa atagaaagat ctagtaggac tttgggttgc 3840
 tcatgggaat ttattcctgt agatgatgga tggggagaaa ggccactgta a 3891

<210> 2

<211> 1296

5 <212> PRT

<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
 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
 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 485 Asn Ile Glu Ala Ala 490 Glu Glu Asn Ile Ser Leu 495

Asp Leu Ile Gln 500 Gln Tyr Tyr Leu Thr 505 Phe Asn Phe Asp Asn 510 Glu Pro

Glu Asn Ile 515 Ser Ile Glu Asn 520 Leu Ser Ser Asp Ile Ile 525 Gly Gln Leu

Glu Leu 530 Met Pro Asn Ile Glu 535 Arg Phe Pro Asn Gly 540 Lys Lys Tyr Glu

Leu 545 Asp Lys Tyr Thr Met 550 Phe His Tyr Leu Arg 555 Ala Gln Glu Phe Glu 560

His Gly Lys Ser Arg 565 Ile Ala Leu Thr Asn 570 Ser Val Asn Glu Ala Leu 575

Leu Asn Pro Ser 580 Arg Val Tyr Thr Phe 585 Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys 590

Lys Val Asn 595 Lys Ala Thr Glu Ala 600 Ala Met Phe Leu Gly 605 Trp Val Glu

Gln Leu 610 Val Tyr Asp Phe Thr 615 Asp Glu Thr Ser Glu 620 Val Ser Thr Thr

Asp 625 Lys Ile Ala Asp Ile 630 Thr Ile Ile Ile Pro 635 Tyr Ile Gly Pro Ala 640

Leu Asn Ile Gly Asn 645 Met Leu Tyr Lys Asp 650 Asp Phe Val Gly Ala Leu 655

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

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

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

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

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

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

Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp

	755					760						765			
Leu	Ser 770	Ser	Lys	Leu	Asn	Glu 775	Ser	Ile	Asn	Lys	Ala 780	Met	Ile	Asn	Ile
Asn	Lys 785	Phe	Leu	Asn	Gln 790	Cys	Ser	Val	Ser	Tyr 795	Leu	Met	Asn	Ser	Met 800
Ile	Pro	Tyr	Gly	Val 805	Lys	Arg	Leu	Glu	Asp 810	Phe	Asp	Ala	Ser	Leu 815	Lys
Asp	Ala	Leu	Leu 820	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Asp 825	Asn	Arg	Gly	Thr	Leu 830	Ile	Gly
Gln	Val	Asp 835	Arg	Leu	Lys	Asp	Lys 840	Val	Asn	Asn	Thr	Leu 845	Ser	Thr	Asp
Ile	Pro 850	Phe	Gln	Leu	Ser	Lys 855	Tyr	Val	Asp	Asn	Gln 860	Arg	Leu	Leu	Ser
Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr	Ile 870	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn 875	Thr	Ser	Ile	Leu	Asn 880
Leu	Arg	Tyr	Glu	Ser 885	Asn	His	Leu	Ile	Asp 890	Leu	Ser	Arg	Tyr	Ala 895	Ser
Lys	Ile	Asn	Ile 900	Gly	Ser	Lys	Val	Asn 905	Phe	Asp	Pro	Ile	Asp 910	Lys	Asn
Gln	Ile	Gln 915	Leu	Phe	Asn	Leu	Glu 920	Ser	Ser	Lys	Ile	Glu 925	Val	Ile	Leu
Lys	Asn 930	Ala	Ile	Val	Tyr	Asn 935	Ser	Met	Tyr	Glu	Asn 940	Phe	Ser	Thr	Ser
Phe	Trp	Ile	Arg	Ile	Pro 950	Lys	Tyr	Phe	Asn	Ser 955	Ile	Ser	Leu	Asn	Asn 960
Glu	Tyr	Thr	Ile	Ile 965	Asn	Cys	Met	Glu	Asn 970	Asn	Ser	Gly	Trp	Lys 975	Val
Ser	Leu	Asn	Tyr 980	Gly	Glu	Ile	Ile	Trp 985	Thr	Leu	Gln	Asp	Thr 990	Gln	Glu
Ile	Lys	Gln 995	Arg	Val	Val	Phe	Lys 1000	Tyr	Ser	Gln	Met	Ile 1005	Asn	Ile	Ser
Asp	Tyr 1010	Ile	Asn	Arg	Trp	Ile 1015	Phe	Val	Thr	Ile	Thr 1020	Asn	Asn	Arg	
Leu	Asn 1025	Asn	Ser	Lys	Ile	Tyr 1030	Ile	Asn	Gly	Arg	Leu 1035	Ile	Asp	Gln	

Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile
 1040 1045 1050
 Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp
 1055 1060 1065
 Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu
 1070 1075 1080
 Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys
 1085 1090 1095
 Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met
 1100 1105 1110
 Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val
 1115 1120 1125
 Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val
 1130 1135 1140
 Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr
 1145 1150 1155
 Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile
 1160 1165 1170
 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> 3876

5 <212> ADN

<213> Clostridium botulinum

<400> 3

ES 2 544 060 T3

atgccagtta caataaataa ttttaattat aatgatccta ttgataataa taatattatt	60
atgatggagc ctccatttgc gagaggtagc gggagatatt ataaagcttt taaaatcaca	120
gatcgtatth ggataatacc ggaaagatat acttttggat ataaacctga ggattttaat	180
aaaagttccg gtatthttta tagagatgth tgtgaatatt atgatccaga ttactttaat	240
actaatgata aaaagaatat atthtttaca acaatgatca agttatthta tagaatcaaa	300
tcaaaacat tgggtgaaa gttattagag atgattataa atggtatacc ttatcttgga	360
gatagacgtg ttccactcga agagthtaac acaaacattg ctagtgtaac tgthtaataa	420
ttaatcagta atccaggaga agtggagcga aaaaaaggta ttttcgcaaa thtaataata	480
thtgacctg ggccagthtt aatgaaaat gagactatag atataggtat acaaatcat	540
thtgatcaa gggaggctt cgggggtata atgcaaatga agthttgccc agaatatga	600
agcgtatthta ataatgthca agaaaacaaa ggcgcaagta ththtaatag acgtggatat	660
thttcagatc cagccttgat ataatgcat gaacttatac atgthttaca tggattatat	720
ggcattaaag tagatgattt accaattgta ccaaatgaaa aaaaatthtt tatgcaatct	780
acagatgcta tacaggcaga agaactatat acatthggag gacaagatcc cagcatcata	840
actccttcta cggataaaag tatctatgat aaagthttgc aaaaatthtag agggatagth	900
gatagactta acaagthttt agthttgcata tcagatccta acattaatat taatatatat	960
aaaaataaat thaaagataa atataaattc gthgaagatt ctgagggaaa atatagtata	1020
gatgtagaaa gthttgataa attatataaa agcttaatgt thggthttac agaaactaat	1080
atagcagaaa attataaaat aaaaactaga gcttcttatt thagtgattc cttaccacca	1140
gtaaaaaataa aaaatthatt agataatgaa atctatacta tagaggaagg gthtaatata	1200
tctgataaag atatggaaaa agaatataga ggtcagaata aagctataaa taacaagct	1260
tatgaagaaa ttagcaagga gcatttggtc gtatataaga tacaaatgtg taaaagtgtt	1320
aaagctccag gaatatgtat tgatgthgat aatgaagatt thttctthtat agctgataaa	1380
aatagthttt cagatgattt atctaaaaac gaaagaatag aatataatac acagagtaat	1440
tatatagaaa atgacttccc tataaatgaa thaatthtag atactgattt aataagtaaa	1500
atagaattac caagtgaaaa tacagaatca cttactgatt thaatgtaga thttccagta	1560
tatgaaaaac aaccgcgtat aaaaaaatt thtacagatg aaaataccat cthtcaatat	1620
thtactctc agacatthcc tctagatata agagatataa gthtaacatc thcatttgat	1680
gatgcattat ththttctaa caagthttat thcathttt ctatggatta ththaaact	1740

gctaataaag tggtagaagc aggattatth gcaggttggg tgaacagat agtaaatgat 1800
tttghtaatcg aagctaataa aagcaatact atggataaaa ttgcagatat atctctaatt 1860
gttccttata taggattagc tttaaatgta ggaaatgaaa cagctaaagg aaatthtgaa 1920
aatgctthtg agattgcagg agccagtatt ctactagaat ttataccaga actthtaata 1980
cctghtagtth gagcctthttt attagaatca tatattgaca ataaaaataa aattattaaa 2040
acaatagata atgctthaac taaaagaaat gaaaaatgga gtgatatgta cggattaata 2100
gtagcgaat ggctctcaac agttaatact caatthtata caataaaga gggaaatgtat 2160
aaggctthta attatcaagc acaagcattg gaagaaataa taaaatacag atataatata 2220
tattctgaaa aagaaaagtc aatattaac atcgatttht atgatataaa ttctaaactt 2280
aatgagggta ttaaccaagc tatagataat ataaataatt ttataaatgg atgttctgta 2340
tcatatttht tgaaaaaaat gattccatta gctghtagaaa aattactaga cthtgataat 2400
actctcaaaa aaaatthgtt aaattatata gatgaaaata aattatattt gattggaagt 2460
gcagaatatg aaaaatcaaa agtaaaaaa tacttgaaaa ccattatgcc gthtgatctt 2520
tcaatatata ccaatgatac aatactaata gaaatgttht ataaatata tagcgaatt 2580
ttaaataata ttatctthaa tthaagatat aaggataata atttaataga thtatcagga 2640
tatggggcaa agghtagaggt atatgatgga gtcgagctta atgataaaaa tcaatthaaa 2700
ttaactagtt cagcaaatag taagattaga gtgactcaaa atcagaatat catatthaat 2760
agtggttcc thgattthtag cgthtagctth tggataagaa tacctaaata taagaatgat 2820
ggtatacaaa attatattca taatgaatat acaataatta atgtatgaa aaataattcg 2880
ggctggaaaa tatctattag gggtaatagg ataatatgga cthtaattga tataaatgga 2940
aaaacaaat cggtatthtt tgaatataac ataagagaag atatatcaga gtatataaat 3000
agatggthtt thgtaactat tactaataat thgaataacg cthaaattht tattaatggt 3060
aagctagaat caaatcaga tattaagat ataagagaag thattgctaa tggthgaata 3120
atattthaat tagatggtga tatagataga acacaattht thtgatgaa atatthcagt 3180
atththtaata cggaaattht tcaatcaaat attgaagaaa gatataaat tcaatcatat 3240
agcgaatatt taaaagattt thggggaaat cththtaatgt acaataaaga atattatag 3300
thtaatgcgg ggaataaaaa thcatatatt aaactaaaga aagattcacc thtaggtgaa 3360
atthtaacac gtagcaataa taatcaaaat thtaaatata thaaattatag agatthtatat 3420
attggagaaa aatthattat aagaagaaag thaaattctc aatctataaa thgatgata 3480
gthtagaaaag aagattatata atatctagat thththtaatt thaatcaaga thggagagta 3540
tatactata aataththta gaaagaggaa gaaaaattgt ththtagctcc tataagtgat 3600
thctgatgagt thtacaatac tatacaataa aaagaatath atgaacagcc aacatathgt 3660
thtcagthtc ththtaaaaa agatgaagaa agtactgatg agataggatt gattggtatt 3720
catcgtthct acgaatctgg aatthgattt gaagagtata aagattattt thgtataagt 3780
aaatggtact taaaagaggt aaaaaggaaa ccatataatt thaaattggg atgtaattgg 3840

cagtttattc ctaaagatga aggtggact gaataa

3876

<210> 4

<211> 1291

5 <212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 4

Met Pro Val Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Asn Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Phe Ala Arg Gly Thr Gly Arg
 20 25 30
 Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Ile Pro Glu
 35 40 45
 Arg Tyr Thr Phe Gly Tyr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Lys Ser Ser Gly
 50 55 60
 Ile Phe Asn Arg Asp Val Cys Glu Tyr Tyr Asp Pro Asp Tyr Leu Asn
 65 70 75 80
 Thr Asn Asp Lys Lys Asn Ile Phe Leu Gln Thr Met Ile Lys Leu Phe
 85 90 95
 Asn Arg Ile Lys Ser Lys Pro Leu Gly Glu Lys Leu Leu Glu Met Ile
 100 105 110
 Ile Asn Gly Ile Pro Tyr Leu Gly Asp Arg Arg Val Pro Leu Glu Glu
 115 120 125
 Phe Asn Thr Asn Ile Ala Ser Val Thr Val Asn Lys Leu Ile Ser Asn
 130 135 140
 Pro Gly Glu Val Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Ala Asn Leu Ile Ile
 145 150 155 160
 Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Glu Asn Glu Thr Ile Asp Ile Gly
 165 170 175
 Ile Gln Asn His Phe Ala Ser Arg Glu Gly Phe Gly Gly Ile Met Gln
 180 185 190
 Met Lys Phe Cys Pro Glu Tyr Val Ser Val Phe Asn Asn Val Gln Glu
 195 200 205
 Asn Lys Gly Ala Ser Ile Phe Asn Arg Arg Gly Tyr Phe Ser Asp Pro
 210 215 220
 Ala Leu Ile Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr
 225 230 235 240

Gly Ile Lys Val Asp Asp Leu Pro Ile Val Pro Asn Glu Lys Lys Phe
 245 250 255
 Phe Met Gln Ser Thr Asp Ala Ile Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe
 260 265 270
 Gly Gly Gln Asp Pro Ser Ile Ile Thr Pro Ser Thr Asp Lys Ser Ile
 275 280 285
 Tyr Asp Lys Val Leu Gln Asn Phe Arg Gly Ile Val Asp Arg Leu Asn
 290 300
 Lys Val Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ile Tyr
 305 310 315 320
 Lys Asn Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Asp Ser Glu Gly
 325 330 335
 Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu
 340 345 350
 Met Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys
 355 360 365
 Thr Arg Ala Ser Tyr Phe Ser Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys
 370 375 380
 Asn Leu Leu Asp Asn Glu Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Gly Phe Asn Ile
 385 390 395 400
 Ser Asp Lys Asp Met Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile
 405 410 415
 Asn Lys Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr
 420 425 430
 Lys Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys Ile Asp
 435 440 445
 Val Asp Asn Glu Asp Leu Phe Phe Ile Ala Asp Lys Asn Ser Phe Ser
 450 455 460
 Asp Asp Leu Ser Lys Asn Glu Arg Ile Glu Tyr Asn Thr Gln Ser Asn
 465 470 475 480
 Tyr Ile Glu Asn Asp Phe Pro Ile Asn Glu Leu Ile Leu Asp Thr Asp
 485 490 495
 Leu Ile Ser Lys Ile Glu Leu Pro Ser Glu Asn Thr Glu Ser Leu Thr
 500 505 510

Asp Phe Asn Val Asp Val Pro Val Tyr Glu Lys Gln Pro Ala Ile Lys
 515 520 525

Lys Ile Phe Thr Asp Glu Asn Thr Ile Phe Gln Tyr Leu Tyr Ser Gln
 530 535 540

Thr Phe Pro Leu Asp Ile Arg Asp Ile Ser Leu Thr Ser Ser Phe Asp
 545 550 555 560

Asp Ala Leu Leu Phe Ser Asn Lys Val Tyr Ser Phe Phe Ser Met Asp
 565 570 575

Tyr Ile Lys Thr Ala Asn Lys Val Val Glu Ala Gly Leu Phe Ala Gly
 580 585 590

Trp Val Lys Gln Ile Val Asn Asp Phe Val Ile Glu Ala Asn Lys Ser
 595 600 605

Asn Thr Met Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr Ile
 610 615 620

Gly Leu Ala Leu Asn Val Gly Asn Glu Thr Ala Lys Gly Asn Phe Glu
 625 630 635 640

Asn Ala Phe Glu Ile Ala Gly Ala Ser Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro
 645 650 655

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

Asp Asn Lys Asn Lys Ile Ile Lys Thr Ile Asp Asn Ala Leu Thr Lys
 675 680 685

Arg Asn Glu Lys Trp Ser Asp Met Tyr Gly Leu Ile Val Ala Gln Trp
 690 695 700

Leu Ser Thr Val Asn Thr Gln Phe Tyr Thr Ile Lys Glu Gly Met Tyr
 705 710 715 720

Lys Ala Leu Asn Tyr Gln Ala Gln Ala Leu Glu Glu Ile Ile Lys Tyr
 725 730 735

Arg Tyr Asn Ile Tyr Ser Glu Lys Glu Lys Ser Asn Ile Asn Ile Asp
 740 745 750

Phe Asn Asp Ile Asn Ser Lys Leu Asn Glu Gly Ile Asn Gln Ala Ile
 755 760 765

Asp Asn Ile Asn Asn Phe Ile Asn Gly Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met
 770 775 780

Lys Lys Met Ile Pro Leu Ala Val Glu Lys Leu Leu Asp Phe Asp Asn
 785 790 795 800
 Thr Leu Lys Lys Asn Leu Leu Asn Tyr Ile Asp Glu Asn Lys Leu Tyr
 805 810 815
 Leu Ile Gly Ser Ala Glu Tyr Glu Lys Ser Lys Val Asn Lys Tyr Leu
 820 825 830
 Lys Thr Ile Met Pro Phe Asp Leu Ser Ile Tyr Thr Asn Asp Thr Ile
 835 840 845
 Leu Ile Glu Met Phe Asn Lys Tyr Asn Ser Glu Ile Leu Asn Asn Ile
 850 855 860
 Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Lys Asp Asn Asn Leu Ile Asp Leu Ser Gly
 865 870 875 880
 Tyr Gly Ala Lys Val Glu Val Tyr Asp Gly Val Glu Leu Asn Asp Lys
 885 890 895
 Asn Gln Phe Lys Leu Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys Ile Arg Val Thr
 900 905 910
 Gln Asn Gln Asn Ile Ile Phe Asn Ser Val Phe Leu Asp Phe Ser Val
 915 920 925
 Ser Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Lys Asn Asp Gly Ile Gln Asn
 930 935 940
 Tyr Ile His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Lys Asn Asn Ser
 945 950 955 960
 Gly Trp Lys Ile Ser Ile Arg Gly Asn Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile
 965 970 975
 Asp Ile Asn Gly Lys Thr Lys Ser Val Phe Phe Glu Tyr Asn Ile Arg
 980 985 990
 Glu Asp Ile Ser Glu Tyr Ile Asn Arg Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr
 995 1000 1005
 Asn Asn Leu Asn Asn Ala Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Lys Leu Glu
 1010 1015 1020
 Ser Asn Thr Asp Ile Lys Asp Ile Arg Glu Val Ile Ala Asn Gly
 1025 1030 1035
 Glu Ile Ile Phe Lys Leu Asp Gly Asp Ile Asp Arg Thr Gln Phe
 1040 1045 1050
 Ile Trp Met Lys Tyr Phe Ser Ile Phe Asn Thr Glu Leu Ser Gln

1055	1060	1065
Ser Asn 1070	Ile Glu Glu Arg Tyr 1075	Lys Ile Gln Ser Tyr 1080
Leu Lys 1085	Asp Phe Trp Gly Asn 1090	Pro Leu Met Tyr Asn 1095
Tyr Met 1100	Phe Asn Ala Gly Asn 1105	Lys Asn Ser Tyr Ile 1110
Lys Asp 1115	Ser Pro Val Gly Glu 1120	Ile Leu Thr Arg Ser 1125
Gln Asn 1130	Ser Lys Tyr Ile Asn 1135	Tyr Arg Asp Leu Tyr 1140
Lys Phe 1145	Ile Ile Arg Arg Lys 1150	Ser Asn Ser Gln Ser 1155
Asp Ile 1160	Val Arg Lys Glu Asp 1165	Tyr Ile Tyr Leu Asp 1170
Leu Asn 1175	Gln Glu Trp Arg Val 1180	Tyr Thr Tyr Lys Tyr 1185
Glu Glu 1190	Glu Lys Leu Phe Leu 1195	Ala Pro Ile Ser Asp 1200
Phe Tyr 1205	Asn Thr Ile Gln Ile 1210	Lys Glu Tyr Asp Glu 1215
Tyr Ser 1220	Cys Gln Leu Leu Phe 1225	Lys Lys Asp Glu Glu 1230
Glu Ile 1235	Gly Leu Ile Gly Ile 1240	His Arg Phe Tyr Glu 1245
Val Phe 1250	Glu Glu Tyr Lys Asp 1255	Tyr Phe Cys Ile Ser 1260
Leu Lys 1265	Glu Val Lys Arg Lys 1270	Pro Tyr Asn Leu Lys 1275
Asn Trp 1280	Gln Phe Ile Pro Lys 1285	Asp Glu Gly Trp Thr 1290

<210> 5

<211> 3843

<212> ADN

<213> Clostridium botulinum

5

<400> 5

atgccaataa caattaacaa ctttaattat tcagatcctg ttgataataa aatatattta	60
tatttagata ctcatntaaa tacattagct aatgagcctg aaaaagcctt tcgcattata	120
gggaatatat gggtaatacc cgatagattt tcaagagatt ctaatccaaa tttaaataaa	180
cctcctcgag ttacaagccc taaaagtggg tattatgatc ctaattattt gagtactgat	240
tctgaaaaag atacattttt aaaagaaatt ataaagttat ttaaaagaat taactctaga	300
gaaataggag aagaattaat atatagactt gcaacagaca taccctttcc tgggaataac	360
aatactccaa ttaatacttt tgattttgat gtagatttta acagtgttga tgttaaaact	420
agacaaggta acaactgggt taaaactggg agtataaatc ctagtgttat aataactgga	480
cctagagaaa acattataga cccagaaact tctacgttta aattaactaa caatactttt	540
gcggcacaag aaggatttgg tgctttatca ataatttcaa tatcacctag atttatgcta	600
acatatagta atgcaactaa taatgtagga gagggtagat tttctaagtc tgaattttgc	660
atggatccaa tactaatttt aatgcatgaa cttaatcatg caatgcataa tttatatgga	720
atagctatac caaatgatca aagaatttca tctgtaacta gtaatatttt ttattctcaa	780
tataaggtga aattagagta tgcagaaata tatgcatttg gaggtccaac tatagacctt	840
attcctaaaa gtgcaaggaa atattttgag gaaaaggcat tggattatta tagatccata	900
gctaaaagac ttaatagtat aactactgca aatccttcaa gctttaataa atatatagga	960
gaatataaac agaaacttat tagaaagtat agattcgtag tagaatcttc aggtgaagtt	1020
gcagtagatc gtaataagtt tgctgagtta tataaagaac ttacacaaat atttacagaa	1080
tttaactacg ctaaaatata taatgtacaa aataggaaaa tatatctttc aaatgtatat	1140
actccggtta cggcaaatat attagacgat aatgtttatg atatacaaaa tggatttaac	1200
atacctaaaa gtaattttaa tgtactattt atgggtcaaa atttatctcg aaatccagca	1260
ttaagaaaag tcaatcctga aaatatgctt tatttattta caaaattttg ccataaagca	1320
atagatggta gatcattata taataaaaca ttagattgta gagagctttt agttaaaaat	1380
actgacttac cctttatagg tgatattagt gatatcaaaa ctgatataat ttaagcaaa	1440
gatattaatg aagaaactga agttatagac tatccggaca atgtttcagt ggatcaagtt	1500
attctcagta agaatacctc agaacatgga caactagatt tattataccc tattattgaa	1560
ggtgagagtc aagtattacc gggagagaat caagtctttt atgataatag aactcaaaat	1620
gttgattatt tgaattctta ttattaccta gaatctcaaa aactaagtga taatgttgaa	1680
gattttactt ttacgacatc aattgaggaa gctttggata atagtggaaa agtatatact	1740
tactttccta aactagctga taaagtaa atcgggtgttc aaggtggttt atttttaatg	1800
tgggcaaatg atgtagttga agattttact acaaatattc taagaaaaga tacattagat	1860
aaaatatcag atgtatcagc tattattccc tatataggac ctgcattaaa tataagtaat	1920
tctgtaagaa ggggaaattt tactgaagca tttgcagtta ccgggtgtaac tattttatta	1980
gaagcgtttc aagaatttac aatacctgca cttggtgcat ttgtgattta tagtaaggtt	2040
caagaaagaa acgagattat taaaactata gataattggt tagaacaag gattaaga	2100

tggaaagatt catatgaatg gatgatagga acgtggttat ccaggattac tactcaattt 2160
 aataatataa gttatcaaat gtatgattct ttaaattatc aggcagatgc aatcaaagat 2220
 aaaatagatt tagaatataa aaaatactca ggaagtgata aagaaaatat aaaaagtcaa 2280
 gttgaaaatt taaaaaatag tttagatata aaaatctcgg aagcaatgaa taatataaat 2340
 aaatttatac gagaatgttc tgtaacatac ttatttataa atatgctccc taaagtaatt 2400
 gatgaattaa ataagtttga tttaaaaact aaaacagaat taattaatct tatagatagt 2460
 cataatatta ttctagttgg tgaagtagat agattaaaag caaaagtaaa tgagagtttt 2520
 gaaaatacaa taccctttaa tttttttca tatactaata attctttatt aaaagatata 2580
 attaatgaat atttcaatag tattaatgat tcaaaaattt tgagcttaca aaacaaaaaa 2640
 aatgcttttag tggatacatc aggatataat gcagaagtga ggctagaagg tgatgttcaa 2700
 gttaatacga tatatacaaa tgattttaaa ttaagtagtt caggagataa aattatagta 2760
 aatttaataa ataataatct atatagcgtt atttatgaga actctagtgt tagtttttgg 2820
 attaagatat ctaaagattt aactaattct cataatgaat atacaataat taatagtata 2880
 aaacaaaatt ctgggtggaa attatgtatt aggaatggca atatagaatg gattttacaa 2940
 gatattaata gaaagtataa aagtttaatt tttgattata gtgaatcatt aagtcataca 3000
 ggatatacaa ataatgggt ttttgttact ataactaata atataatggg gtatatgaaa 3060
 ctttatataa atggagaatt aaagcagagt gaaagaattg aagattttaa tgaggtttaag 3120
 ttagataaaa ccatagtatt tggaatagat gagaatatag atgagaatca gatgctttgg 3180
 attagagatt ttaatatttt ttctaagaa ttaagcaatg aagatattaa tattgtatat 3240
 gagggacaaa tattaagaaa tgttattaaa gattattggg gaaatccttt gaagtttgat 3300
 acagaatatt atattattaa tgataattat atagataggt atatagcacc taaaagtaat 3360
 atacttgtag ttgttcagta tccagataga tctaaattat atactggaaa tcctattact 3420
 attaatcag tatctgataa gaatccttat agtagaattt taaatggaga taatataatg 3480
 tttcatatgt tatataatag tgggaaatat atgataataa gagatactga tacaatatat 3540
 gcaatagaag gaagagagtg ttcaaaaaat tgtgtatatg cattaaaatt acagagtaat 3600
 ttaggtaatt atggataggt tatatttagt ataaaaata ttgtatctca aaataaatat 3660
 tgtagtcaaa ttttctctag ttttatgaaa aatacaatgc ttctagcaga tatatataaa 3720
 ccttgagat tttcttttga aatgcatac acgccagttg cagtaactaa ttatgagaca 3780
 aaactattat caacttcac tttttggaaa tttatttcta gggatccagg atgggtagag 3840
 taa 3843

<210> 6

<211> 1280

5 <212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 6

Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val Asp Asn
1 5 10 15

Lys Asn Ile Leu Tyr Leu Asp Thr His Leu Asn Thr Leu Ala Asn Glu
20 25 30

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

Arg Phe Ser Arg Asp Ser Asn Pro Asn Leu Asn Lys Pro Pro Arg Val
50 55 60

Thr Ser Pro Lys Ser Gly Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
65 70 75 80

Ser Glu Lys Asp Thr Phe Leu Lys Glu Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg
85 90 95

Ile Asn Ser Arg Glu Ile Gly Glu Glu Leu Ile Tyr Arg Leu Ala Thr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Pro Gly Asn Asn Asn Thr Pro Ile Asn Thr Phe Asp
115 120 125

Phe Asp Val Asp Phe Asn Ser Val Asp Val Lys Thr Arg Gln Gly Asn
130 135 140

Asn Trp Val Lys Thr Gly Ser Ile Asn Pro Ser Val Ile Ile Thr Gly
145 150 155 160

Pro Arg Glu Asn Ile Ile Asp Pro Glu Thr Ser Thr Phe Lys Leu Thr
165 170 175

Asn Asn Thr Phe Ala Ala Gln Glu Gly Phe Gly Ala Leu Ser Ile Ile
180 185 190

Ser Ile Ser Pro Arg Phe Met Leu Thr Tyr Ser Asn Ala Thr Asn Asn
195 200 205

Val Gly Glu Gly Arg Phe Ser Lys Ser Glu Phe Cys Met Asp Pro Ile
210 215 220

Leu Ile Leu Met His Glu Leu Asn His Ala Met His Asn Leu Tyr Gly
225 230 235 240

Ile Ala Ile Pro Asn Asp Gln Arg Ile Ser Ser Val Thr Ser Asn Ile
245 250 255

Phe Tyr Ser Gln Tyr Lys Val Lys Leu Glu Tyr Ala Glu Ile Tyr Ala
260 265 270

Phe Gly Gly Pro Thr Ile Asp Leu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Lys Tyr

275					280					285					
Phe	Glu	Glu	Lys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Ile	Ala	Lys	Arg	Leu
	290					295					300				
Asn	Ser	Ile	Thr	Thr	Ala	Asn	Pro	Ser	Ser	Phe	Asn	Lys	Tyr	Ile	Gly
305					310					315					320
Glu	Tyr	Lys	Gln	Lys	Leu	Ile	Arg	Lys	Tyr	Arg	Phe	Val	Val	Glu	Ser
				325					330					335	
Ser	Gly	Glu	Val	Ala	Val	Asp	Arg	Asn	Lys	Phe	Ala	Glu	Leu	Tyr	Lys
			340					345					350		
Glu	Leu	Thr	Gln	Ile	Phe	Thr	Glu	Phe	Asn	Tyr	Ala	Lys	Ile	Tyr	Asn
		355					360					365			
Val	Gln	Asn	Arg	Lys	Ile	Tyr	Leu	Ser	Asn	Val	Tyr	Thr	Pro	Val	Thr
	370					375					380				
Ala	Asn	Ile	Leu	Asp	Asp	Asn	Val	Tyr	Asp	Ile	Gln	Asn	Gly	Phe	Asn
385					390					395					400
Ile	Pro	Lys	Ser	Asn	Leu	Asn	Val	Leu	Phe	Met	Gly	Gln	Asn	Leu	Ser
				405					410					415	
Arg	Asn	Pro	Ala	Leu	Arg	Lys	Val	Asn	Pro	Glu	Asn	Met	Leu	Tyr	Leu
			420					425					430		
Phe	Thr	Lys	Phe	Cys	His	Lys	Ala	Ile	Asp	Gly	Arg	Ser	Leu	Tyr	Asn
		435					440					445			
Lys	Thr	Leu	Asp	Cys	Arg	Glu	Leu	Leu	Val	Lys	Asn	Thr	Asp	Leu	Pro
	450					455					460				
Phe	Ile	Gly	Asp	Ile	Ser	Asp	Ile	Lys	Thr	Asp	Ile	Phe	Leu	Ser	Lys
465					470					475					480
Asp	Ile	Asn	Glu	Glu	Thr	Glu	Val	Ile	Asp	Tyr	Pro	Asp	Asn	Val	Ser
				485					490					495	
Val	Asp	Gln	Val	Ile	Leu	Ser	Lys	Asn	Thr	Ser	Glu	His	Gly	Gln	Leu
			500					505					510		
Asp	Leu	Leu	Tyr	Pro	Ile	Ile	Glu	Gly	Glu	Ser	Gln	Val	Leu	Pro	Gly
		515					520					525			
Glu	Asn	Gln	Val	Phe	Tyr	Asp	Asn	Arg	Thr	Gln	Asn	Val	Asp	Tyr	Leu
	530					535					540				
Asn	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Leu	Glu	Ser	Gln	Lys	Leu	Ser	Asp	Asn	Val	Glu
545					550					555					560

Lys Ala Lys Val Asn Glu Ser Phe Glu Asn Thr Ile Pro Phe Asn Ile
 835 840 845
 Phe Ser Tyr Thr Asn Asn Ser Leu Leu Lys Asp Ile Ile Asn Glu Tyr
 850 855 860
 Phe Asn Ser Ile Asn Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Lys Lys
 865 870 875 880
 Asn Ala Leu Val Asp Thr Ser Gly Tyr Asn Ala Glu Val Arg Leu Glu
 885 890 895
 Gly Asp Val Gln Val Asn Thr Ile Tyr Thr Asn Asp Phe Lys Leu Ser
 900 905 910
 Ser Ser Gly Asp Lys Ile Ile Val Asn Leu Asn Asn Asn Ile Leu Tyr
 915 920 925
 Ser Ala Ile Tyr Glu Asn Ser Ser Val Ser Phe Trp Ile Lys Ile Ser
 930 935 940
 Lys Asp Leu Thr Asn Ser His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Ser Ile
 945 950 955 960
 Lys Gln Asn Ser Gly Trp Lys Leu Cys Ile Arg Asn Gly Asn Ile Glu
 965 970 975
 Trp Ile Leu Gln Asp Ile Asn Arg Lys Tyr Lys Ser Leu Ile Phe Asp
 980 985 990
 Tyr Ser Glu Ser Leu Ser His Thr Gly Tyr Thr Asn Lys Trp Phe Phe
 995 1000 1005
 Val Thr Ile Thr Asn Asn Ile Met Gly Tyr Met Lys Leu Tyr Ile
 1010 1015 1020
 Asn Gly Glu Leu Lys Gln Ser Glu Arg Ile Glu Asp Leu Asn Glu
 1025 1030 1035
 Val Lys Leu Asp Lys Thr Ile Val Phe Gly Ile Asp Glu Asn Ile
 1040 1045 1050
 Asp Glu Asn Gln Met Leu Trp Ile Arg Asp Phe Asn Ile Phe Ser
 1055 1060 1065
 Lys Glu Leu Ser Asn Glu Asp Ile Asn Ile Val Tyr Glu Gly Gln
 1070 1075 1080
 Ile Leu Arg Asn Val Ile Lys Asp Tyr Trp Gly Asn Pro Leu Lys
 1085 1090 1095

Phe Asp Thr Glu Tyr Tyr Ile Ile Asn Asp Asn Tyr Ile Asp Arg
 1100 1105 1110
 Tyr Ile Ala Pro Lys Ser Asn Ile Leu Val Leu Val Gln Tyr Pro
 1115 1120 1125
 Asp Arg Ser Lys Leu Tyr Thr Gly Asn Pro Ile Thr Ile Lys Ser
 1130 1135 1140
 Val Ser Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Arg Ile Leu Asn Gly Asp Asn
 1145 1150 1155
 Ile Met Phe His Met Leu Tyr Asn Ser Gly Lys Tyr Met Ile Ile
 1160 1165 1170
 Arg Asp Thr Asp Thr Ile Tyr Ala Ile Glu Gly Arg Glu Cys Ser
 1175 1180 1185
 Lys Asn Cys Val Tyr Ala Leu Lys Leu Gln Ser Asn Leu Gly Asn
 1190 1200
 Tyr Gly Ile Gly Ile Phe Ser Ile Lys Asn Ile Val Ser Gln Asn
 1205 1210 1215
 Lys Tyr Cys Ser Gln Ile Phe Ser Ser Phe Met Lys Asn Thr Met
 1220 1225 1230
 Leu Leu Ala Asp Ile Tyr Lys Pro Trp Arg Phe Ser Phe Glu Asn
 1235 1240 1245
 Ala Tyr Thr Pro Val Ala Val Thr Asn Tyr Glu Thr Lys Leu Leu
 1250 1255 1260
 Ser Thr Ser Ser Phe Trp Lys Phe Ile Ser Arg Asp Pro Gly Trp
 1265 1270 1275
 Val Glu
 1280

<210> 7

<211> 3858

5 <212> ADN

<213> Clostridium botulinum

<400> 7

ES 2 544 060 T3

atgacatggc cagtaaaaga ttttaattat agtgatcctg ttaatgacaa tgatatatta	60
tatttaagaa taccacaaaa taagttaatt actacacctg taaaagcttt tatgattact	120
caaatatfff gggaatacc agaaagatff tcatcagata ctaatccaag ttttaagtaaa	180
ccgcctagac ctacttcaaa gtatcaaagt tattatgatc ctagttatff atctactgat	240
gagcaaaaag atacatffff aaaagggatt ataaaattat ttaaaagaat taatgaaaga	300
gatataggaa aaaaattaat aaattatffa gtagttgggt cacctffat gggagattca	360

agtacgcctg aagatacatt tgatthttaca cgtcatacta ctaatatattgc agttgaaaag	420
tttgaaaatg gtagttggaa agtaacaaat attataacac caagtgtatt gatattttgga	480
ccacttccta atatattaga ctatacagca tcccttacat tgcaaggaca acaatcaaat	540
ccatcatttg aagggtttgg aacattatct atactaaaag tagcacctga atttttgtta	600
acatttagtg atgtaacatc taatcaaagt tcagctgtat taggcaaadc tatattttgt	660
atggatccag taatagcttt aatgcatgag ttaacacatt ctttgcacatc attgtatgga	720
ataaatatac catctgataa aaggattcgt ccacaagtta gcgagggatt tttttctcaa	780
gatggacca acgtacaatt tgaggaatta tacacatttg gaggatcaga tgettgaata	840
atacctcaa ttgaaagatt acaattaaga gaaaagcat taggtcacta taaagatata	900
gcgaaaagac ttaataatat taataaaact attccttcta gttggagtag taatatagat	960
aaatataaaa aaatattttc tgaaaagtat aattttgata aagataatac aggaaatttt	1020
gttgtaaata ttgataaatt caatagctta tattcagact tgactaatgt tatgtcagaa	1080
gttgtttatt cttcgcaata taatgttaaa aacaggactc attatttttc aaagcattat	1140
ctacctgtat ttgcaaatat attagatgat aatatttata ctataataaa cggttttaat	1200
ttaacaacta aaggttttta tatagaaaat tcgggtcaga atatagaaag gaatcctgca	1260
ctacaaaaac ttagtccaga aagtgtagta gatttgttta caaaagtatg tttaaagatta	1320
acaagaaata gtagagatga ttcaacatgt attcaagtta aaaataatac attaccttat	1380
gtagctgata aagatagcat ttcacaagaa atatttgaaa gtcaaattat tacagatgag	1440
actaatgtag aaaattattc agataatttt tcattagatg aatctatttt agatgcaaaa	1500
gtccctacta atcctgaagc agtagatcca ctgttaccba atgttaatat ggaaccttta	1560
aatgtttcag gtgaagaaga agtattttat gatgatatta ctaaagatgt tgattattta	1620
aactcttatt attatttgga agcccaaaaa ttaagtaata atgttgaaaa tattactctt	1680
acaacttcag ttgaagaagc attaggttat agcaataaga tatacacatt tttacctagc	1740
ttagctgaaa aagtgaataa aggtgttcaa gcaggtttat tcttaaattg ggcgaatgaa	1800
gtagttgagg attttactac aaatattatg aaaaaagata cattggataa aatatcagat	1860
gtatcagcca taattccata tataggacct gccttaata taggaaattc agcattaagg	1920
ggaaacttta agcaagcatt tgcaacagct ggtgtagctt ttttgttaga aggatttcca	1980
gagtttcaa tacctgcact cgggtgtattt accttttata gttctattca agaaagagag	2040
aaaattatta aaactataga aaattgttta gaacaaagag ttaagagatg gaaagattca	2100
tatcaatgga tggatcaaaa ttggtgtca agaattacta ctcgatttaa tcatataagt	2160
tatcaaatgt atgattcttt gagttatcag gcagatgcaa tcaaagctaa aatagattta	2220
gaatataaaa aatactcagg aagtgataaa gaaaatataa aaagtcaagt tgaaaattta	2280
aaaaatagtt tagatgtaaa aatctcggaa gcaatgaata atataaataa atttatacga	2340
gaatgttctg taacatactt atttaaaaat atgctcccta aagtaattga tgaattaaat	2400
aagtttgatt taaaaactaa aacagaatta attaatctta tagatagtca taatattatt	2460

ctagttagtg aagtagatag attaaaagca aaagtaaatg agagttttga aaatacaata 2520
 ccctttaata ttttttcata tactaataat tctttattaa aagatatgat taatgaatat 2580
 ttcaatagta ttaatgattc aaaaattttg agcttacaaa ataaaaaaaa tactttgatg 2640
 gatacatcag gatataacgc agaagtgaga gtagaaggca atgttcagct taatccaata 2700
 tttccattg actttaaatt aggtagtcca ggggatgata gaggtaaagt tatagtaacc 2760
 cagaatgaaa atattgtata taatgctatg tatgaaagtt ttagtattag tttttggatt 2820
 aggataaata aatgggtaag taatttacct ggatatacta taattgatag tgttaaaaat 2880
 aactcaggtt ggagtatagg tattattagt aattttttag tgtttacttt aaaacaaaat 2940
 gaaaatagtg aacaagatat aaactttagt tatgatatat caaagaatgc tgcgggatat 3000
 aataaatggt tttttgtaac tattactacc aatatgatgg gaaatatgat gatttatata 3060
 aatggaaaat taatagatac tataaaagtt aaagagttaa ctggaattaa ttttagcaaa 3120
 actataacat ttcaaatgaa taaaattcca aatactggct taattacctc agattctgat 3180
 aacatcaata tgtggataag ggatttttat atctttgcta aagaattaga tgataaagat 3240
 attaataat tatttaatag cttgcaatat actaatgttg taaaagatta ttggggaaat 3300
 gatttaagat atgataaaga atattacatg attaacgtaa attatatgaa tagatatatg 3360
 tctaaaaaag gcaatggaat tgtttttaat acacgtaaaa ataataatga cttcaatgaa 3420
 ggatataaaa ttataataaa aagaattaga ggaaatacaa atgatactag agtacgagga 3480
 gaaaatgtat tatattttta tactacaatt gataacaaac aatatagttt aggtatgtat 3540
 aaaccttcta gaaatctagg gactgattta gttccactag gtgcattgga tcaaccaatg 3600
 gatgagatac gtaaaratgg ttcgtttata atacaacat gcaatacttt tgattactat 3660
 gcatcacaat tatttttgtc aagtaatgca acaacaaata ggcttggaaat actatcaatt 3720
 ggtagttata gtttcaaact tggagatgac tattggttta atcacgaata ttttaattcct 3780
 gttataaaaa tagagcatta tgcttcatta ttagaatcaa catcaactca ttgggttttt 3840
 gtacctgcaa gtgaataa 3858

<210> 8

<211> 1285

5 <212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 8

Met Thr Trp Pro Val Lys Asp Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val Asn Asp
1 5 10 15

Asn Asp Ile Leu Tyr Leu Arg Ile Pro Gln Asn Lys Leu Ile Thr Thr
20 25 30

Pro Val Lys Ala Phe Met Ile Thr Gln Asn Ile Trp Val Ile Pro Glu
35 40 45

Arg Phe Ser Ser Asp Thr Asn Pro Ser Leu Ser Lys Pro Pro Arg Pro
 50 55 60
 Thr Ser Lys Tyr Gln Ser Tyr Tyr Asp Pro Ser Tyr Leu Ser Thr Asp
 65 70 75 80
 Glu Gln Lys Asp Thr Phe Leu Lys Gly Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg
 85 90 95
 Ile Asn Glu Arg Asp Ile Gly Lys Lys Leu Ile Asn Tyr Leu Val Val
 100 105 110
 Gly Ser Pro Phe Met Gly Asp Ser Ser Thr Pro Glu Asp Thr Phe Asp
 115 120 125
 Phe Thr Arg His Thr Thr Asn Ile Ala Val Glu Lys Phe Glu Asn Gly
 130 135 140
 Ser Trp Lys Val Thr Asn Ile Ile Thr Pro Ser Val Leu Ile Phe Gly
 145 150 155 160
 Pro Leu Pro Asn Ile Leu Asp Tyr Thr Ala Ser Leu Thr Leu Gln Gly
 165 170 175
 Gln Gln Ser Asn Pro Ser Phe Glu Gly Phe Gly Thr Leu Ser Ile Leu
 180 185 190
 Lys Val Ala Pro Glu Phe Leu Leu Thr Phe Ser Asp Val Thr Ser Asn
 195 200 205
 Gln Ser Ser Ala Val Leu Gly Lys Ser Ile Phe Cys Met Asp Pro Val
 210 215 220
 Ile Ala Leu Met His Glu Leu Thr His Ser Leu His Gln Leu Tyr Gly
 225 230 235 240
 Ile Asn Ile Pro Ser Asp Lys Arg Ile Arg Pro Gln Val Ser Glu Gly
 245 250 255
 Phe Phe Ser Gln Asp Gly Pro Asn Val Gln Phe Glu Glu Leu Tyr Thr
 260 265 270
 Phe Gly Gly Ser Asp Val Glu Ile Ile Pro Gln Ile Glu Arg Leu Gln
 275 280 285
 Leu Arg Glu Lys Ala Leu Gly His Tyr Lys Asp Ile Ala Lys Arg Leu
 290 295 300
 Asn Asn Ile Asn Lys Thr Ile Pro Ser Ser Trp Ser Ser Asn Ile Asp
 305 310 315 320
 Lys Tyr Lys Lys Ile Phe Ser Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Lys Asp Asn

Ile Met Lys Lys Asp Thr Leu Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Ala Ile
610 615 620

Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Ser Ala Leu Arg
625 630 635 640

Gly Asn Phe Lys Gln Ala Phe Ala Thr Ala Gly Val Ala Phe Leu Leu
645 650 655

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

Tyr Ser Ser Ile Gln Glu Arg Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile Glu Asn
675 680 685

Cys Leu Glu Gln Arg Val Lys Arg Trp Lys Asp Ser Tyr Gln Trp Met
690 695 700

Val Ser Asn Trp Leu Ser Arg Ile Thr Thr Arg Phe Asn His Ile Ser
705 710 715 720

Tyr Gln Met Tyr Asp Ser Leu Ser Tyr Gln Ala Asp Ala Ile Lys Ala
725 730 735

Lys Ile Asp Leu Glu Tyr Lys Lys Tyr Ser Gly Ser Asp Lys Glu Asn
740 745 750

Ile Lys Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Asn Ser Leu Asp Val Lys Ile
755 760 765

Ser Glu Ala Met Asn Asn Ile Asn Lys Phe Ile Arg Glu Cys Ser Val
770 775 780

Thr Tyr Leu Phe Lys Asn Met Leu Pro Lys Val Ile Asp Glu Leu Asn
785 790 795 800

Lys Phe Asp Leu Lys Thr Lys Thr Glu Leu Ile Asn Leu Ile Asp Ser
805 810 815

His Asn Ile Ile Leu Val Gly Glu Val Asp Arg Leu Lys Ala Lys Val
820 825 830

Asn Glu Ser Phe Glu Asn Thr Ile Pro Phe Asn Ile Phe Ser Tyr Thr
835 840 845

Asn Asn Ser Leu Leu Lys Asp Met Ile Asn Glu Tyr Phe Asn Ser Ile
850 855 860

Asn Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Lys Lys Asn Thr Leu Met
865 870 875 880

Asp Thr Ser Gly Tyr Asn Ala Glu Val Arg Val Glu Gly Asn Val Gln
 885 890 895
 Leu Asn Pro Ile Phe Pro Phe Asp Phe Lys Leu Gly Ser Ser Gly Asp
 900 905 910
 Asp Arg Gly Lys Val Ile Val Thr Gln Asn Glu Asn Ile Val Tyr Asn
 915 920 925
 Ala Met Tyr Glu Ser Phe Ser Ile Ser Phe Trp Ile Arg Ile Asn Lys
 930 935 940
 Trp Val Ser Asn Leu Pro Gly Tyr Thr Ile Ile Asp Ser Val Lys Asn
 945 950 955 960
 Asn Ser Gly Trp Ser Ile Gly Ile Ile Ser Asn Phe Leu Val Phe Thr
 965 970 975
 Leu Lys Gln Asn Glu Asn Ser Glu Gln Asp Ile Asn Phe Ser Tyr Asp
 980 985 990
 Ile Ser Lys Asn Ala Ala Gly Tyr Asn Lys Trp Phe Phe Val Thr Ile
 995 1000 1005
 Thr Thr Asn Met Met Gly Asn Met Met Ile Tyr Ile Asn Gly Lys
 1010 1015 1020
 Leu Ile Asp Thr Ile Lys Val Lys Glu Leu Thr Gly Ile Asn Phe
 1025 1030 1035
 Ser Lys Thr Ile Thr Phe Gln Met Asn Lys Ile Pro Asn Thr Gly
 1040 1045 1050
 Leu Ile Thr Ser Asp Ser Asp Asn Ile Asn Met Trp Ile Arg Asp
 1055 1060 1065
 Phe Tyr Ile Phe Ala Lys Glu Leu Asp Asp Lys Asp Ile Asn Ile
 1070 1075 1080
 Leu Phe Asn Ser Leu Gln Tyr Thr Asn Val Val Lys Asp Tyr Trp
 1085 1090 1095
 Gly Asn Asp Leu Arg Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr Met Ile Asn Val
 1100 1105 1110
 Asn Tyr Met Asn Arg Tyr Met Ser Lys Lys Gly Asn Gly Ile Val
 1115 1120 1125
 Phe Asn Thr Arg Lys Asn Asn Asn Asp Phe Asn Glu Gly Tyr Lys
 1130 1135 1140

Ile Ile Ile Lys Arg Ile Arg Gly Asn Thr Asn Asp Thr Arg Val
 1145 1150 1155

Arg Gly Glu Asn Val Leu Tyr Phe Asn Thr Thr Ile Asp Asn Lys
 1160 1165 1170

Gln Tyr Ser Leu Gly Met Tyr Lys Pro Ser Arg Asn Leu Gly Thr
 1175 1180 1185

Asp Leu Val Pro Leu Gly Ala Leu Asp Gln Pro Met Asp Glu Ile
 1190 1195 1200

Arg Lys Tyr Gly Ser Phe Ile Ile Gln Pro Cys Asn Thr Phe Asp
 1205 1210 1215

Tyr Tyr Ala Ser Gln Leu Phe Leu Ser Ser Asn Ala Thr Thr Asn
 1220 1225 1230

Arg Leu Gly Ile Leu Ser Ile Gly Ser Tyr Ser Phe Lys Leu Gly
 1235 1240 1245

Asp Asp Tyr Trp Phe Asn His Glu Tyr Leu Ile Pro Val Ile Lys
 1250 1255 1260

Ile Glu His Tyr Ala Ser Leu Leu Glu Ser Thr Ser Thr His Trp
 1265 1270 1275

Val Phe Val Pro Ala Ser Glu
 1280 1285

<210> 9

<211> 3756

5 <212> ADN

<213> Clostridium botulinum

<400> 9

ES 2 544 060 T3

atgccaaaa	ttaatagttt	taattataat	gatcctgtta	atgatagaac	aattttatat	60
attaaaccag	gcggttgca	agaattttat	aatcattta	atattatgaa	aaatatttgg	120
ataattccag	agagaaatgt	aattggtaca	accccccaag	attttcatcc	gcctacttca	180
ttaaaaaatg	gagatagtag	ttattatgac	cctaattatt	tacaaagtga	tgaagaaaag	240
gatagatfff	taaaaatagt	cacaaaaata	tttaatagaa	taaataataa	tctttcagga	300
gggatfffat	tagaagaact	gtcaaaagct	aatccatatt	tagggaatga	taatactcca	360
gataatcaat	tccatattgg	tgatgcatca	gcagttgaga	ttaaattctc	aatggtagc	420
caagacatac	tattacctaa	tgttattata	atgggagcag	agcctgattt	atftgaaact	480
aacagttcca	atatttctct	aagaaataat	tatatgcaa	gcaatcaccg	ttttggatca	540
atagctatag	taacattctc	acctgaatat	tcttttagat	ttaatgataa	ttgtatgaat	600
gaatttattc	aagatcctgc	tcttacatta	atgcatgaat	taatacattc	attacatgga	660
ctatatgggg	ctaaagggat	tactacaaag	tatactataa	cacaaaaaca	aatccccta	720

ataacaaata taagaggtac aaatattgaa gaattcttaa cttttggagg tactgattta 780
 aacattatta ctagtgctca gtccaatgat atctatacta atcttctagc tgattataaa 840
 aaaatagcgt ctaaacttag caaagtacaa gtatctaadc cactacttaa tccttataaa 900
 gatgtttttg aagcaaagta tggattagat aaagatgcta gcggaattta ttcggtaaatt 960
 ataaacaaat ttaatgatat ttttaaaaaa ttatacagct ttacggaatt tgattttacga 1020
 actaaatttc aagttaaatg taggcaaact tatattggac agtataaata cttcaaactt 1080
 tcaaacttgt taaatgattc tatttataat atatcagaag gctataatat aaataattta 1140
 aaggtaaatt ttagaggaca gaatgcaaat ttaaattccta gaattattac accaattaca 1200
 ggtagaggac tagtaaaaaa aatcattaga ttttgtaaaa atattgtttc tgtaaaaggc 1260
 ataaggaaat caatatgtat cgaaataaat aatggtgagt tattttttgt ggcttccgag 1320
 aatagttata atgatgataa tataaatact cctaaagaaa ttgacgatac agtaacttca 1380
 aataataatt atgaaaatga tttagatcag gttattttta attttaatag tgaatcagca 1440
 cctggacttt cagatgaaaa attaaattta actatccaaa atgatgctta tataccaaaa 1500
 tatgattcta atggaacaag tgatatagaa caacatgatg ttaatgaact taatgtattt 1560
 ttctatttag atgcacagaa agtgcccga ggtgaaaata atgtcaatct cacctcttca 1620
 attgatacag cattattaga acaacctaaa atatatacat ttttttcatc agaatttatt 1680
 aataatgtca ataaacctgt gcaagcagca ttattttgtaa gctggataca acaagtgtta 1740
 gtagatttta ctactgaagc taaccaaaaa agtactgttg ataaaattgc agatatttct 1800
 atagttgttc catatatagg tcttgcttta aatataggaa atgaagcaca aaaaggaaat 1860
 tttaaagatg cacttgaatt attaggagca ggtattttat tagaatttga acccgagctt 1920
 ttaattccta caatttttagt attcacgata aaatcttttt taggttcatc tgataataaa 1980
 aataaagtta ttaaagcaat aaataatgca ttgaaagaaa gagatgaaaa atggaaagaa 2040
 gtatatagtt ttatagtatc gaattggatg actaaaatta atacacaatt taataaaaga 2100
 aaagaacaaa tgtatcaagc tttacaaaat caagtaaagc caattaaaac aataatagaa 2160
 tctaagtata atagttatac tttagaggaa aaaaatgagc ttacaaataa atatgatatt 2220
 aagcaaatag aaaatgaact taatcaaaaag gtttctatag caatgaataa tatagacagg 2280
 ttcttaactg aaagttctat atcctattta atgaaaataa taaatgaagt aaaaattaat 2340
 aaattaagag aatatgatga gaatgtcaaa acgtattttat tgaattatat tatacaacat 2400
 ggatcaatct tgggagagag tcagcaagaa ctaaattcta tggtaactga taccctaaat 2460
 aatagtattc cttttaagct ttcttcttat acagatgata aaattttaat ttcatttttt 2520
 aataaattct ttaagagaat taaaagtagt tcagttttta atatgagata taaaatgat 2580
 aaatacgtag atacttcagg atatgattca aatataaata ttaatggaga tgtatataaa 2640
 tatccaacta ataaaaatca atttggaata tataatgata aacttagtga agttaatata 2700
 tctcaaaatg attacattat atatgataat aaatataaaa attttagtat tagtttttgg 2760

ES 2 544 060 T3

gtaagaattc	ctaactatga	taataagata	gtaaatgtta	ataatgaata	cactataata	2820
aattgtatga	gagataataa	ttcaggatgg	aaagtatctc	ttaatcataa	tgaaataatt	2880
tggacattcg	aagataatcg	aggaattaat	caaaaattag	catttaacta	tggtaacgca	2940
aatggatttt	ctgattatat	aaataagtgg	atTTTTgtaa	ctataactaa	tgatagatta	3000
ggagattcta	aactttatat	taatggaaat	ttaatagatc	aaaaatcaat	tttaaattta	3060
ggtaatatcc	atgtttagtga	caatatatta	tttaaaaatag	ttaattgtag	ttatacaaga	3120
tatattggta	ttagatatttt	taatattttt	gataaagaat	tagatgaaac	agaaattcaa	3180
actttatata	gcaatgaacc	taatacaaat	atTTTTgaagg	atTTTTgggg	aaattatttg	3240
ctttatgaca	aagaatacta	tttattaat	gtgTTaaaac	caaataactt	tattgatagg	3300
agaaaagatt	ctactttaag	cattaataat	ataagaagca	ctattctttt	agctaataga	3360
ttatatagtg	gaataaaagt	taaaatacaa	agagTTaata	atagtagtac	taacgataat	3420
cttgTTagaa	agaatgatca	ggatatatt	aatTTTTgtag	ccagcaaaaac	tcacttattt	3480
ccattatatg	ctgatacagc	taccacaaat	aaagagaaaa	caataaaaat	atcatcatct	3540
ggcaatagat	ttaatcaagt	agtagttatg	aattcagtag	gaaattgtac	aatgaatttt	3600
aaaaataata	atggaaataa	tattgggTTg	ttaggTTtca	aggcagatac	tgtcgttgct	3660
agtactTggT	attatacaca	tatgagagat	catacaaaca	gcaatggatg	TTTTTggaac	3720
TTTatttctg	aagaacatgg	atggcaagaa	aaataa			3756

<210> 10

<211> 1251

5 <212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 10

ES 2 544 060 T3

Met Pro Lys Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp Arg
 1 5 10 15
 Thr Ile Leu Tyr Ile Lys Pro Gly Gly Cys Gln Glu Phe Tyr Lys Ser
 20 25 30
 Phe Asn Ile Met Lys Asn Ile Trp Ile Ile Pro Glu Arg Asn Val Ile
 35 40 45
 Gly Thr Thr Pro Gln Asp Phe His Pro Pro Thr Ser Leu Lys Asn Gly
 50 55 60
 Asp Ser Ser Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Gln Ser Asp Glu Glu Lys
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Leu Lys Ile Val Thr Lys Ile Phe Asn Arg Ile Asn Asn
 85 90 95
 Asn Leu Ser Gly Gly Ile Leu Leu Glu Glu Leu Ser Lys Ala Asn Pro
 100 105 110

Tyr Leu Gly Asn Asp Asn Thr Pro Asp Asn Gln Phe His Ile Gly Asp
 115 120 125
 Ala Ser Ala Val Glu Ile Lys Phe Ser Asn Gly Ser Gln Asp Ile Leu
 130 135 140
 Leu Pro Asn Val Ile Ile Met Gly Ala Glu Pro Asp Leu Phe Glu Thr
 145 150 155 160
 Asn Ser Ser Asn Ile Ser Leu Arg Asn Asn Tyr Met Pro Ser Asn His
 165 170 175
 Arg Phe Gly Ser Ile Ala Ile Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Ser Phe
 180 185 190
 Arg Phe Asn Asp Asn Cys Met Asn Glu Phe Ile Gln Asp Pro Ala Leu
 195 200 205
 Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Ser Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala
 210 215 220
 Lys Gly Ile Thr Thr Lys Tyr Thr Ile Thr Gln Lys Gln Asn Pro Leu
 225 230 235 240
 Ile Thr Asn Ile Arg Gly Thr Asn Ile Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly
 245 250 255
 Gly Thr Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Gln Ser Asn Asp Ile Tyr
 260 265 270
 Thr Asn Leu Leu Ala Asp Tyr Lys Lys Ile Ala Ser Lys Leu Ser Lys
 275 280 285
 Val Gln Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu
 290 295 300
 Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn
 305 310 315 320
 Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu
 325 330 335
 Phe Asp Leu Arg Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile
 340 345 350
 Gly Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile
 355 360 365
 Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe
 370 375 380

Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr
 385 390 395 400
 Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val
 405 410 415
 Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys Ile Glu Ile Asn Asn Gly
 420 425 430
 Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Asn Ser Tyr Asn Asp Asp Asn Ile
 435 440 445
 Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Val Thr Ser Asn Asn Asn Tyr
 450 455 460
 Glu Asn Asp Leu Asp Gln Val Ile Leu Asn Phe Asn Ser Glu Ser Ala
 465 470 475 480
 Pro Gly Leu Ser Asp Glu Lys Leu Asn Leu Thr Ile Gln Asn Asp Ala
 485 490 495
 Tyr Ile Pro Lys Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Asp Ile Glu Gln His
 500 505 510
 Asp Val Asn Glu Leu Asn Val Phe Phe Tyr Leu Asp Ala Gln Lys Val
 515 520 525
 Pro Glu Gly Glu Asn Asn Val Asn Leu Thr Ser Ser Ile Asp Thr Ala
 530 535 540
 Leu Leu Glu Gln Pro Lys Ile Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Glu Phe Ile
 545 550 555 560
 Asn Asn Val Asn Lys Pro Val Gln Ala Ala Leu Phe Val Ser Trp Ile
 565 570 575
 Gln Gln Val Leu Val Asp Phe Thr Thr Glu Ala Asn Gln Lys Ser Thr
 580 585 590
 Val Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Ile Val Val Pro Tyr Ile Gly Leu
 595 600 605
 Ala Leu Asn Ile Gly Asn Glu Ala Gln Lys Gly Asn Phe Lys Asp Ala
 610 615 620
 Leu Glu Leu Leu Gly Ala Gly Ile Leu Leu Glu Phe Glu Pro Glu Leu
 625 630 635 640
 Leu Ile Pro Thr Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Phe Leu Gly Ser
 645 650 655
 Ser Asp Asn Lys Asn Lys Val Ile Lys Ala Ile Asn Asn Ala Leu Lys

			660					665						670			
Glu	Arg	Asp	Glu	Lys	Trp	Lys	Glu	Val	Tyr	Ser	Phe	Ile	Val	Ser	Asn		
		675					680					685					
Trp	Met	Thr	Lys	Ile	Asn	Thr	Gln	Phe	Asn	Lys	Arg	Lys	Glu	Gln	Met		
	690					695					700						
Tyr	Gln	Ala	Leu	Gln	Asn	Gln	Val	Asn	Ala	Ile	Lys	Thr	Ile	Ile	Glu		
705					710					715					720		
Ser	Lys	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Glu	Leu	Thr	Asn		
				725					730					735			
Lys	Tyr	Asp	Ile	Lys	Gln	Ile	Glu	Asn	Glu	Leu	Asn	Gln	Lys	Val	Ser		
			740					745					750				
Ile	Ala	Met	Asn	Asn	Ile	Asp	Arg	Phe	Leu	Thr	Glu	Ser	Ser	Ile	Ser		
		755					760					765					
Tyr	Leu	Met	Lys	Ile	Ile	Asn	Glu	Val	Lys	Ile	Asn	Lys	Leu	Arg	Glu		
	770					775					780						
Tyr	Asp	Glu	Asn	Val	Lys	Thr	Tyr	Leu	Leu	Asn	Tyr	Ile	Ile	Gln	His		
785					790					795					800		
Gly	Ser	Ile	Leu	Gly	Glu	Ser	Gln	Gln	Glu	Leu	Asn	Ser	Met	Val	Thr		
				805					810					815			
Asp	Thr	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Pro	Phe	Lys	Leu	Ser	Ser	Tyr	Thr	Asp		
			820					825					830				
Asp	Lys	Ile	Leu	Ile	Ser	Tyr	Phe	Asn	Lys	Phe	Phe	Lys	Arg	Ile	Lys		
		835					840					845					
Ser	Ser	Ser	Val	Leu	Asn	Met	Arg	Tyr	Lys	Asn	Asp	Lys	Tyr	Val	Asp		
	850					855					860						
Thr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Ser	Asn	Ile	Asn	Ile	Asn	Gly	Asp	Val	Tyr	Lys		
865					870					875					880		
Tyr	Pro	Thr	Asn	Lys	Asn	Gln	Phe	Gly	Ile	Tyr	Asn	Asp	Lys	Leu	Ser		
				885					890					895			
Glu	Val	Asn	Ile	Ser	Gln	Asn	Asp	Tyr	Ile	Ile	Tyr	Asp	Asn	Lys	Tyr		
			900					905					910				
Lys	Asn	Phe	Ser	Ile	Ser	Phe	Trp	Val	Arg	Ile	Pro	Asn	Tyr	Asp	Asn		
		915					920					925					
Lys	Ile	Val	Asn	Val	Asn	Asn	Glu	Tyr	Thr	Ile	Ile	Asn	Cys	Met	Arg		
	930					935						940					

Asp Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn His Asn Glu Ile Ile
 945 950 955 960

Trp Thr Phe Glu Asp Asn Arg Gly Ile Asn Gln Lys Leu Ala Phe Asn
 965 970 975

Tyr Gly Asn Ala Asn Gly Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe
 980 985 990

Val Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Asn
 995 1000 1005

Gly Asn Leu Ile Asp Gln Lys Ser Ile Leu Asn Leu Gly Asn Ile
 1010 1015 1020

His Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Asn Cys Ser Tyr
 1025 1030 1035

Thr Arg Tyr Ile Gly Ile Arg Tyr Phe Asn Ile Phe Asp Lys Glu
 1040 1045 1050

Leu Asp Glu Thr Glu Ile Gln Thr Leu Tyr Ser Asn Glu Pro Asn
 1055 1060 1065

Thr Asn Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asp
 1070 1075 1080

Lys Glu Tyr Tyr Leu Leu Asn Val Leu Lys Pro Asn Asn Phe Ile
 1085 1090 1095

Asp Arg Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ile Asn Asn Ile Arg Ser
 1100 1105 1110

Thr Ile Leu Leu Ala Asn Arg Leu Tyr Ser Gly Ile Lys Val Lys
 1115 1120 1125

Ile Gln Arg Val Asn Asn Ser Ser Thr Asn Asp Asn Leu Val Arg
 1130 1135 1140

Lys Asn Asp Gln Val Tyr Ile Asn Phe Val Ala Ser Lys Thr His
 1145 1150 1155

Leu Phe Pro Leu Tyr Ala Asp Thr Ala Thr Thr Asn Lys Glu Lys
 1160 1165 1170

Thr Ile Lys Ile Ser Ser Ser Gly Asn Arg Phe Asn Gln Val Val
 1175 1180 1185

Val Met Asn Ser Val Gly Asn Cys Thr Met Asn Phe Lys Asn Asn
 1190 1195 1200

ES 2 544 060 T3

Asn Gly Asn Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe Lys Ala Asp Thr Val
1205 1210 1215

Val Ala Ser Thr Trp Tyr Tyr Thr His Met Arg Asp His Thr Asn
1220 1225 1230

Ser Asn Gly Cys Phe Trp Asn Phe Ile Ser Glu Glu His Gly Trp
1235 1240 1245

Gln Glu Lys
1250

<210> 11

<211> 3843

5 <212> ADN

<213> Clostridium botulinum

<400> 11

atgccagttg taataaatag ttttaattat aatgaccctg ttaatgatga gacaatttta	60
tacatgcaga aaccatatga agaaagaagt agaaaatatt ataaagcttt tgagattatg	120
cctaattgttt ggataatgcc tgagagagat acaataggaa ctaagcctga tgagtttcag	180
gtgccggatt cattaagaa cggaagtagt gcttattatg atcctaatta ttttaaccact	240
gatgctgaaa aagatagata tttaaaaaca atgataaaaat tatttaatag aattaatagt	300
aatcctacag ggaaagtttt gttagaagaa gtatcaaagc ctagaccata tttaggagat	360
gatgacacgc taattaatga attccttcca gttaatgtaa ctacaagtgt taatataaaa	420
ttttcaactg atgttgaaag ttcaataata tcgaatcttc ttgtattggg agcaggacct	480
gatataatta aagcttactg tacccttctt gtaaggttta ataagtcaga taaattaatt	540
gaaccaagta atcatggttt tggatcaatt aatatcttga cattttcacc tgagtatgaa	600
catattttta atgatattag tggaggggaat cataatagta cagaatcatt tattgcagat	660
cctgcaattt cactagctca tgaattgata catgcactac atggattata cggggctaag	720
gcagttactc ataaagagtc tctagtagca gagcgaggac ctcttatgat agccgaaaag	780
cccataaggc tagaagaatt ttttaacttt ggaggtgagg atttaaataat cattcctagt	840
gctatgaagg aaaaaatata taacgatctt ttagctaact atgaaaaaat agctactaga	900
cttagagaag ttaatacggc tcctcctgga tatgatatta atgaatataa agattatttt	960
caatggaagt atggactaga tagaaatgca gatggaagtt atactgtgaa tagaaataaa	1020
tttaatgaaa tttataaaaa attatatagc tttacagaga ttgacttagc aaataaattt	1080
aaagtaaaat gtagaaatac ttattttatt aaatatggat ttgtaaaagt tccaaatttg	1140
ttagatgatg atatttatac tgtatcagag gggtttaata taggtaattt agcagtaaac	1200
aatcgcggac aaaatataaa tttaaatcct aaaattattg attccattcc agataaagg	1260
ttagtggaaa agattattaa attttgtaag agcattattc ctagaaaagg tacgaagcag	1320
tcaccgtcac tatgcattag agtaaataat agggagttat tttttgtagc ttcagaaagt	1380

agctataatg	aaagtgatat	taatacacct	aaagaaattg	acgatacaac	aaatctaaat	1440
aataattata	gaaataatth	agatgaagtt	atthtagatt	ataatagtga	gacaataacct	1500
caaatatcaa	atcgaacatt	aaatacactt	gtacaagaca	atagttatgt	gccaagatat	1560
gattctaattg	gaacaagtga	aatagaggaa	tatgatgttg	ttgactttaa	tgtatthttc	1620
tatttacatg	cacaaaaagt	accagaaggt	gaaaccaata	taagthtaac	ttcttcaatt	1680
gatacagcat	tattagaaga	atccaaagta	tatacattht	ttcttccaga	gtttatcgat	1740
actatcaata	aacctgtaa	tgcagcacta	tttatagatt	ggataagcaa	agtaataaga	1800
gattttacca	ctgaagctac	acaaaaaagt	actgthgata	agattgcaga	catatctthta	1860
attgtaccct	atgtaggtct	tgctthgaa	atagthattg	aggcagaaaa	aggaaattht	1920
gaggaggcat	ttgaattatt	aggagcgggt	atthtattag	aatthgtgcc	agagcttaca	1980
attcctgtaa	thttagthtt	tacgataaaa	tcctatatag	atthcatatga	gaataaaaaat	2040
aaagcaatta	aagcaataaaa	taattcatta	atcgaaagag	aagcaaaagt	gaaagaaata	2100
tatagthgga	tagtatcaaa	ttggcttact	agaatthaata	cgcaatthta	taaaagaaaa	2160
gagcaaatgt	atcaggctth	acaaaatcaa	gtagatgcaa	taaaaacagc	aatagaatat	2220
aaatataata	attatacttc	agatgagaaa	aatagacttg	aatctaaata	taatatcaat	2280
aatatagaag	aagaattgaa	taaaaaagt	tcthtagcaa	tgaaaaatat	agaaagattt	2340
atgacagaaa	gttctatata	ttatthtaat	aaatthaata	atgaagccga	agthggtaaa	2400
thaaaagaat	atgataaaca	tgthtaagagc	gattthattag	actatattct	ctaccataaaa	2460
thaatcttag	gagagcagac	aaaggaatta	attgattthg	tgactagtac	thtgaatagt	2520
agtattccat	thgaactthc	thcatatact	aatgataaaa	thctaattht	atattthtaat	2580
agattatata	aaaaaattaa	agatagthct	atthtagata	tgcgatatga	aaataataaaa	2640
thtatagata	tctctggata	tggttcaaat	ataagcatta	atggaaacgt	atatathttat	2700
tcaacaaata	gaaatcaatt	tggaatatat	agthgtaggc	thtagtgaagt	taatatagct	2760
caaaataatg	atattatata	caatagtaga	tatcaaaatt	thtagtattag	thtctgggta	2820
accattccta	aacactacag	acctatgaa	cgtaatcggg	aatacactat	aataaattgt	2880
atggggaata	ataatthcggg	atggaaaaata	tcacttagaa	ctatttagaga	thtggaata	2940
atthggactt	tacaagatac	thccggaaat	aaggaaaaat	taatththtag	gtatgaagaa	3000
cttgctagta	tatctgatta	tataaataaaa	tggaatthttg	taactattac	taataataga	3060
thtaggcaatt	ctagaattth	catcaatgga	aatthaatag	thgaaaaatc	aatthcgaat	3120
thtaggtgata	thcatgthtag	tgataatata	thattthaaaa	thgtthggtg	tgatgatgaa	3180
acgtatgtht	gtataagata	ththaaagt	thtaatacgg	aattagataa	aacagaaatt	3240
gagactthtat	atagthaatga	gccagatcca	agtatctthaa	aagactattg	gggaaattat	3300
thgctatata	ataaaaaata	thattthattc	aatthactaa	gaaaagataa	gtatattact	3360
cggaaatcag	gcattthtaaa	tattaatcaa	caaagaggtg	thtactggagg	catatctgth	3420
thththgaact	ataaattata	tgaaggagta	gaagthatta	taagaaaaaa	tgctcctata	3480

ES 2 544 060 T3

gatatatcta atacagataa ttttgttaga aaaaacgatc tagcatacat taatgtagta	3540
gatcatggtg tagaatatcg gttatatgct gatatatcaa ttacaaaatc agagaaaata	3600
ataaaaattaa taagaacatc taatccaaac gatagcttag gtcaaattat agttatggat	3660
tcaataggaa ataattgcac aatgaatttt caaaacaatg atgggagcaa tataggatta	3720
ctaggttttc attcagatga tttggttgct agtagttggt attataacca tatacgaaga	3780
aacactagca gtaatggatg cttttggagt tttatttcta aagagcatgg ttggaaagaa	3840
taa	3843

<210> 12

<211> 1280

5 <212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 12

Met Pro Val Val Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp
 1 5 10 15
 Glu Thr Ile Leu Tyr Met Gln Lys Pro Tyr Glu Glu Arg Ser Arg Lys
 20 25 30
 Tyr Tyr Lys Ala Phe Glu Ile Met Pro Asn Val Trp Ile Met Pro Glu
 35 40 45
 Arg Asp Thr Ile Gly Thr Lys Pro Asp Glu Phe Gln Val Pro Asp Ser
 50 55 60
 Leu Lys Asn Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Thr Thr
 65 70 75 80
 Asp Ala Glu Lys Asp Arg Tyr Leu Lys Thr Met Ile Lys Leu Phe Asn
 85 90 95
 Arg Ile Asn Ser Asn Pro Thr Gly Lys Val Leu Leu Glu Glu Val Ser
 100 105 110
 Asn Ala Arg Pro Tyr Leu Gly Asp Asp Asp Thr Leu Ile Asn Glu Phe
 115 120 125
 Leu Pro Val Asn Val Thr Thr Ser Val Asn Ile Lys Phe Ser Thr Asp
 130 135 140
 Val Glu Ser Ser Ile Ile Ser Asn Leu Leu Val Leu Gly Ala Gly Pro
 145 150 155 160
 Asp Ile Phe Lys Ala Tyr Cys Thr Pro Leu Val Arg Phe Asn Lys Ser
 165 170 175
 Asp Lys Leu Ile Glu Pro Ser Asn His Gly Phe Gly Ser Ile Asn Ile
 180 185 190

Leu Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Glu His Ile Phe Asn Asp Ile Ser Gly
 195 200 205

Gly Asn His Asn Ser Thr Glu Ser Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ile Ser
 210 215 220

Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala Lys
 225 230 235 240

Ala Val Thr His Lys Glu Ser Leu Val Ala Glu Arg Gly Pro Leu Met
 245 250 255

Ile Ala Glu Lys Pro Ile Arg Leu Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly Gly
 260 265 270

Glu Asp Leu Asn Ile Ile Pro Ser Ala Met Lys Glu Lys Ile Tyr Asn
 275 280 285

Asp Leu Leu Ala Asn Tyr Glu Lys Ile Ala Thr Arg Leu Arg Glu Val
 290 295 300

Asn Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Asp Ile Asn Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe
 305 310 315 320

Gln Trp Lys Tyr Gly Leu Asp Arg Asn Ala Asp Gly Ser Tyr Thr Val
 325 330 335

Asn Arg Asn Lys Phe Asn Glu Ile Tyr Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr
 340 345 350

Glu Ile Asp Leu Ala Asn Lys Phe Lys Val Lys Cys Arg Asn Thr Tyr
 355 360 365

Phe Ile Lys Tyr Gly Phe Val Lys Val Pro Asn Leu Leu Asp Asp Asp
 370 375 380

Ile Tyr Thr Val Ser Glu Gly Phe Asn Ile Gly Asn Leu Ala Val Asn
 385 390 395 400

Asn Arg Gly Gln Asn Ile Asn Leu Asn Pro Lys Ile Ile Asp Ser Ile
 405 410 415

Pro Asp Lys Gly Leu Val Glu Lys Ile Ile Lys Phe Cys Lys Ser Ile
 420 425 430

Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Gln Ser Pro Ser Leu Cys Ile Arg Val
 435 440 445

Asn Asn Arg Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Ser Ser Tyr Asn Glu
 450 455 460

Ser Asp Ile Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Thr Asn Leu Asn
 465 470 475 480
 Asn Asn Tyr Arg Asn Asn Leu Asp Glu Val Ile Leu Asp Tyr Asn Ser
 485 490 495
 Glu Thr Ile Pro Gln Ile Ser Asn Arg Thr Leu Asn Thr Leu Val Gln
 500 505 510
 Asp Asn Ser Tyr Val Pro Arg Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Glu Ile
 515 520 525
 Glu Glu Tyr Asp Val Val Asp Phe Asn Val Phe Phe Tyr Leu His Ala
 530 535 540
 Gln Lys Val Pro Glu Gly Glu Thr Asn Ile Ser Leu Thr Ser Ser Ile
 545 550 555 560
 Asp Thr Ala Leu Leu Glu Glu Ser Lys Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser
 565 570 575
 Glu Phe Ile Asp Thr Ile Asn Lys Pro Val Asn Ala Ala Leu Phe Ile
 580 585 590
 Asp Trp Ile Ser Lys Val Ile Arg Asp Phe Thr Thr Glu Ala Thr Gln
 595 600 605
 Lys Ser Thr Val Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr
 610 615 620
 Val Gly Leu Ala Leu Asn Ile Val Ile Glu Ala Glu Lys Gly Asn Phe
 625 630 635 640
 Glu Glu Ala Phe Glu Leu Leu Gly Ala Gly Ile Leu Leu Glu Phe Val
 645 650 655
 Pro Glu Leu Thr Ile Pro Val Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Tyr
 660 665 670
 Ile Asp Ser Tyr Glu Asn Lys Asn Lys Ala Ile Lys Ala Ile Asn Asn
 675 680 685
 Ser Leu Ile Glu Arg Glu Ala Lys Trp Lys Glu Ile Tyr Ser Trp Ile
 690 695 700
 Val Ser Asn Trp Leu Thr Arg Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys
 705 710 715 720
 Glu Gln Met Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asp Ala Ile Lys Thr
 725 730 735

Ala Ile Glu Tyr Lys Tyr Asn Asn Tyr Thr Ser Asp Glu Lys Asn Arg
740 745 750

Leu Glu Ser Lys Tyr Asn Ile Asn Asn Ile Glu Glu Glu Leu Asn Lys
755 760 765

Lys Val Ser Leu Ala Met Lys Asn Ile Glu Arg Phe Met Thr Glu Ser
770 775 780

Ser Ile Ser Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Ala Glu Val Gly Lys
785 790 800

Leu Lys Glu Tyr Asp Lys His Val Lys Ser Asp Leu Leu Asp Tyr Ile
805 810 815

Leu Tyr His Lys Leu Ile Leu Gly Glu Gln Thr Lys Glu Leu Ile Asp
820 825 830

Leu Val Thr Ser Thr Leu Asn Ser Ser Ile Pro Phe Glu Leu Ser Ser
835 840 845

Tyr Thr Asn Asp Lys Ile Leu Ile Ile Tyr Phe Asn Arg Leu Tyr Lys
850 855 860

Lys Ile Lys Asp Ser Ser Ile Leu Asp Met Arg Tyr Glu Asn Asn Lys
865 870 875 880

Phe Ile Asp Ile Ser Gly Tyr Gly Ser Asn Ile Ser Ile Asn Gly Asn
885 890 895

Val Tyr Ile Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Ser Gly
900 905 910

Arg Leu Ser Glu Val Asn Ile Ala Gln Asn Asn Asp Ile Ile Tyr Asn
915 920 925

Ser Arg Tyr Gln Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Thr Ile Pro Lys
930 935 940

His Tyr Arg Pro Met Asn Arg Asn Arg Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys
945 950 955 960

Met Gly Asn Asn Asn Ser Gly Trp Lys Ile Ser Leu Arg Thr Ile Arg
965 970 975

Asp Cys Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Ser Gly Asn Lys Glu
980 985 990

Lys Leu Ile Phe Arg Tyr Glu Glu Leu Ala Ser Ile Ser Asp Tyr Ile
995 1000 1005

Asn Lys Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Gly Asn

1010						1015					1020			
Ser	Arg	Ile	Tyr	Ile	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile	Val	Glu	Lys	Ser	Ile
	1025					1030					1035			
Ser	Asn	Leu	Gly	Asp	Ile	His	Val	Ser	Asp	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys
	1040					1045					1050			
Ile	Val	Gly	Cys	Asp	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Gly	Ile	Arg	Tyr	Phe
	1055					1060					1065			
Lys	Val	Phe	Asn	Thr	Glu	Leu	Asp	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu	Thr	Leu
	1070					1075					1080			
Tyr	Ser	Asn	Glu	Pro	Asp	Pro	Ser	Ile	Leu	Lys	Asp	Tyr	Trp	Gly
	1085					1090					1095			
Asn	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Asn	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Asn	Leu	Leu
	1100					1105					1110			
Arg	Lys	Asp	Lys	Tyr	Ile	Thr	Arg	Asn	Ser	Gly	Ile	Leu	Asn	Ile
	1115					1120					1125			
Asn	Gln	Gln	Arg	Gly	Val	Thr	Gly	Gly	Ile	Ser	Val	Phe	Leu	Asn
	1130					1135					1140			
Tyr	Lys	Leu	Tyr	Glu	Gly	Val	Glu	Val	Ile	Ile	Arg	Lys	Asn	Ala
	1145					1150					1155			
Pro	Ile	Asp	Ile	Ser	Asn	Thr	Asp	Asn	Phe	Val	Arg	Lys	Asn	Asp
	1160					1165					1170			
Leu	Ala	Tyr	Ile	Asn	Val	Val	Asp	His	Gly	Val	Glu	Tyr	Arg	Leu
	1175					1180					1185			
Tyr	Ala	Asp	Ile	Ser	Ile	Thr	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ile	Lys	Leu
	1190					1195					1200			
Ile	Arg	Thr	Ser	Asn	Pro	Asn	Asp	Ser	Leu	Gly	Gln	Ile	Ile	Val
	1205					1210					1215			
Met	Asp	Ser	Ile	Gly	Asn	Asn	Cys	Thr	Met	Asn	Phe	Gln	Asn	Asn
	1220					1225					1230			
Asp	Gly	Ser	Asn	Ile	Gly	Leu	Leu	Gly	Phe	His	Ser	Asp	Asp	Leu
	1235					1240					1245			
Val	Ala	Ser	Ser	Trp	Tyr	Tyr	Asn	His	Ile	Arg	Arg	Asn	Thr	Ser
	1250					1255					1260			
Ser	Asn	Gly	Cys	Phe	Trp	Ser	Phe	Ile	Ser	Lys	Glu	His	Gly	Trp
	1265					1270					1275			

Lys Glu
1280

<210> 13

<211> 3894

5 <212> ADN

<213> Clostridium botulinum

<220>

<221> característica nueva

10 <222> (20)..(20)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 13

atgccagtta	atataaaaan	ctttaattat	aatgacccta	ttaataatga	tgacattatt	60
atgatggaac	cattcaatga	cccagggcca	ggaacatatt	ataaagcttt	taggattata	120
gatcgtat	ggatagtacc	agaaaggttt	acttatggat	ttcaacctga	ccaatttaat	180
gccagtacag	gagtttttag	taaagatgtc	tacgaatatt	acgatccaac	ttatttataa	240
accgatgctg	aaaaagataa	atTTTTtaaa	acaatgatta	aattatttaa	tagaattaat	300
tcaaaacat	caggacagag	attactggat	atgatagtag	atgctatacc	ttatcttggg	360
aatgcatcta	caccgcccga	caaatttgca	gcaaagtgtg	caaatgtatc	tatttaataaa	420
aaaattatcc	aacctggagc	tgaagatcaa	ataaaaagggt	taatgacaaa	tttaataata	480
tttggaccag	gaccagttct	aagtgataat	tttactgata	gtatgattat	gaatggccat	540
tcccaatat	cagaaggatt	tggtgcaaga	atgatgataa	gattttgtcc	tagttgttta	600
aatgtattta	ataatgttca	ggaaaataaa	gatacatcta	tatttagtag	acgcgcgtat	660
tttgcagatc	cagctctaac	gttaatgcat	gaacttatac	atgtgttaca	tggattatat	720
ggaattaaga	taagtaattt	accaattact	ccaatacaa	aagaattttt	catgcaacat	780
agcgatcctg	tacaagcaga	agaactatat	acattcggag	gacatgatcc	tagtgttata	840
agtccttcta	cggatatgaa	tatttataat	aaagcgttac	aaaattttca	agatatagct	900
aataggctta	atattgtttc	aagtgcccaa	gggagtggaa	ttgatatttc	cttatataaa	960
caaatatata	aaaataaata	tgattttggt	gaagatccta	atggaaaata	tagtgtagat	1020
aaggataagt	ttgataaatt	atataaggcc	ttaatgtttg	gctttactga	aactaatcta	1080
gctggtgaat	atggaataaa	aactaggtat	tcttatttta	gtgaatattt	gccaccgata	1140
aaaactgaaa	aattgttaga	caatacaatt	tatactcaaa	atgaaggctt	taacatagct	1200
agtaaaaatc	tcaaaacgga	atttaatggt	cagaataagg	cggtaaataa	agaggcttat	1260
gaagaaatca	gcctagaaca	tctcgttata	tatagaatag	caatgtgcaa	gcctgtaatg	1320
tacaaaaata	ccggtaaatc	tgaacagtgt	attattgtta	ataatgagga	tttatttttc	1380
atagctaata	aagatagttt	ttcaaaagat	ttagctaaag	cagaaactat	agcatataat	1440
acacaaaata	atactataga	aaataatttt	tctatagatc	agttgatttt	agataatgat	1500
ttaagcagtg	gcatagactt	accaaataaa	aacacagaac	catttataaa	ttttgacgac	1560

atagatatcc ctgtgtatat taaacaatct gctttaaaaa aaatTTTTgt ggatggagat 1620
 agcTTTTtg aatatttaca tgctcaaca tttccttcta atatagaaaa tctacaacta 1680
 acgaattcat taaatgatgc ttaagaaat aataataaag tctatacttt tttttctaca 1740
 aaccttgttg aaaaagctaa tacagttgta ggtgcttcac tttttgtaa ctgggtaaaa 1800
 ggagtaatag atgattttac atctgaatcc acacaaaaaa gtactataga taaagtttca 1860
 gatgtatcca taattattcc ctatatagga cctgctttga atgtaggaaa tgaaacagct 1920
 aaagaaaatt ttaaaaatgc ttttgaaata ggtggagccg ctatcttaat ggagtttatt 1980
 ccagaactta ttgtacctat agttggattt tttacattag aatcatatgt aggaaataaa 2040
 gggcatatta ttatgacgat atccaatgct ttaaagaaaa gggatcaaaa atggacagat 2100
 atgtatggtt tgatagtatc gcagtggctc tcaacggtta atactcaatt ttatacaata 2160
 aaagaaagaa tgtacaatgc tttaaataat caatcacaag caatagaaaa aataatagaa 2220
 gatcaatata atagatatag tgaagaagat aaaatgaata ttaacattga ttttaatgat 2280
 atagatttta aacttaatca aagtataaat ttagcaataa acaatataga tgattttata 2340
 aaccaatggt ctatatacata tctaataaat agaatgattc cattagctgt aaaaaagtta 2400
 aaagactttg atgataatct taagagagat ttattggagt atatagatac aatgaacta 2460
 tatttacttg atgaagtaaa tattctaaaa tcaaaagtaa atagacacct aaaagacagt 2520
 ataccatttg atctttcact atataccaag gacacaattt taatacaagt ttttaataat 2580
 tatattagta atattagtag taatgctatt ttaagtttaa gttatagagg tgggcgttta 2640
 atagattcat ctggatatgg tgcaactatg aatgtaggtt cagatgttat ctttaatgat 2700
 ataggaaatg gtcaatttaa attaaataat tctgaaaata gtaatattac ggcacatcaa 2760
 agtaaattcg ttgtatatga tagtatgttt gataatttta gcattaactt ttgggtaagg 2820
 actcctaaat ataataataa tgatatacaa acttatcttc aaaatgagta tacaataatt 2880
 agttgtataa aaaatgactc aggatggaaa gtatctatta agggaaatag aataataggg 2940
 acattaatag atgttaatgc aaaatctaaa tcaatatttt tcgaatatag tataaaagat 3000
 aatatatcag attatataaa taaatggttt tccataacta ttactaatga tagattaggt 3060
 aacgcaaata tttatataaa tggaagtttg aaaaaagtg aaaaaatttt aaacttagat 3120
 agaattaatt ctagtaatga tatagacttc aaattaatta attgtacaga tactactaaa 3180
 tttgtttggg ttaaggattt taatattttt ggtagagaat taaatgctac agaagtatct 3240
 tcactatatt ggattcaatc atctacaaat actttaaaag atttttgggg gaatccttta 3300
 agatacgata cacaatacta tctgtttaat caaggatgc aaaatatcta tataaagtat 3360
 tttagtaaag cttctatggg ggaaactgca ccacgtacaa actttaataa tgcagcaata 3420
 aattatcaaa atttatatct tggtttacga tttattataa aaaaagcattc aaattctcgg 3480
 aatataaata atgataatat agtcagagaa ggagattata tatatcttaa tattgataat 3540
 atttctgatg aatcttacag agtatatggt ttggtgaatt ctaaagaaat tcaaactcaa 3600

ttatttttag caccataaa tgatgatcct acgttctatg atgtactaca aataaaaaaa	3660
tattatgaaa aaacaacata taattgtcag ataccttgcg aaaaagatac taaaacattt	3720
gggctgtttg gaattggtaa atttgttaa gattatggat atgtttggga tacctatgat	3780
aattattttt gcataagtca gtggtatctc agaagaatat ctgaaaatat aaataaatta	3840
aggttgggat gtaattggca attcattccc gtggatgaag gatggacaga ataa	3894

<210> 14

<211> 1297

5 <212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<220>

<221> característica nueva

10 <222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 14

ES 2 544 060 T3

Met Pro Val Asn Ile Lys Xaa Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asn Asn
1 5 10 15

Asp Asp Ile Ile Met Met Glu Pro Phe Asn Asp Pro Gly Pro Gly Thr
20 25 30

Tyr Tyr Lys Ala Phe Arg Ile Ile Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu
35 40 45

Arg Phe Thr Tyr Gly Phe Gln Pro Asp Gln Phe Asn Ala Ser Thr Gly
50 55 60

Val Phe Ser Lys Asp Val Tyr Glu Tyr Tyr Asp Pro Thr Tyr Leu Lys
65 70 75 80

Thr Asp Ala Glu Lys Asp Lys Phe Leu Lys Thr Met Ile Lys Leu Phe
85 90 95

Asn Arg Ile Asn Ser Lys Pro Ser Gly Gln Arg Leu Leu Asp Met Ile
100 105 110

Val Asp Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn Ala Ser Thr Pro Pro Asp Lys
115 120 125

Phe Ala Ala Asn Val Ala Asn Val Ser Ile Asn Lys Lys Ile Ile Gln
130 135 140

Pro Gly Ala Glu Asp Gln Ile Lys Gly Leu Met Thr Asn Leu Ile Ile
145 150 155 160

Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Ser Asp Asn Phe Thr Asp Ser Met Ile
165 170 175

Met Asn Gly His Ser Pro Ile Ser Glu Gly Phe Gly Ala Arg Met Met

ES 2 544 060 T3

180					185					190					
Ile	Arg	Phe	Cys	Pro	Ser	Cys	Leu	Asn	Val	Phe	Asn	Asn	Val	Gln	Glu
		195					200					205			
Asn	Lys	Asp	Thr	Ser	Ile	Phe	Ser	Arg	Arg	Ala	Tyr	Phe	Ala	Asp	Pro
	210					215					220				
Ala	Leu	Thr	Leu	Met	His	Glu	Leu	Ile	His	Val	Leu	His	Gly	Leu	Tyr
225					230					235					240
Gly	Ile	Lys	Ile	Ser	Asn	Leu	Pro	Ile	Thr	Pro	Asn	Thr	Lys	Glu	Phe
				245					250					255	
Phe	Met	Gln	His	Ser	Asp	Pro	Val	Gln	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr	Thr	Phe
			260					265					270		
Gly	Gly	His	Asp	Pro	Ser	Val	Ile	Ser	Pro	Ser	Thr	Asp	Met	Asn	Ile
		275					280					285			
Tyr	Asn	Lys	Ala	Leu	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Ile	Ala	Asn	Arg	Leu	Asn
	290					295					300				
Ile	Val	Ser	Ser	Ala	Gln	Gly	Ser	Gly	Ile	Asp	Ile	Ser	Leu	Tyr	Lys
305					310					315					320
Gln	Ile	Tyr	Lys	Asn	Lys	Tyr	Asp	Phe	Val	Glu	Asp	Pro	Asn	Gly	Lys
				325					330					335	
Tyr	Ser	Val	Asp	Lys	Asp	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Lys	Ala	Leu	Met
			340					345					350		
Phe	Gly	Phe	Thr	Glu	Thr	Asn	Leu	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Ile	Lys	Thr
		355					360					365			
Arg	Tyr	Ser	Tyr	Phe	Ser	Glu	Tyr	Leu	Pro	Pro	Ile	Lys	Thr	Glu	Lys
	370					375					380				
Leu	Leu	Asp	Asn	Thr	Ile	Tyr	Thr	Gln	Asn	Glu	Gly	Phe	Asn	Ile	Ala
385					390					395					400
Ser	Lys	Asn	Leu	Lys	Thr	Glu	Phe	Asn	Gly	Gln	Asn	Lys	Ala	Val	Asn
				405					410					415	
Lys	Glu	Ala	Tyr	Glu	Glu	Ile	Ser	Leu	Glu	His	Leu	Val	Ile	Tyr	Arg
			420					425					430		
Ile	Ala	Met	Cys	Lys	Pro	Val	Met	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gly	Lys	Ser	Glu
		435					440					445			
Gln	Cys	Ile	Ile	Val	Asn	Asn	Glu	Asp	Leu	Phe	Phe	Ile	Ala	Asn	Lys
	450					455					460				

Asp Ser Phe Ser Lys Asp Leu Ala Lys Ala Glu Thr Ile Ala Tyr Asn
 465 470 475 480
 Thr Gln Asn Asn Thr Ile Glu Asn Asn Phe Ser Ile Asp Gln Leu Ile
 485 490 495
 Leu Asp Asn Asp Leu Ser Ser Gly Ile Asp Leu Pro Asn Glu Asn Thr
 500 505 510
 Glu Pro Phe Thr Asn Phe Asp Asp Ile Asp Ile Pro Val Tyr Ile Lys
 515 520 525
 Gln Ser Ala Leu Lys Lys Ile Phe Val Asp Gly Asp Ser Leu Phe Glu
 530 535 540
 Tyr Leu His Ala Gln Thr Phe Pro Ser Asn Ile Glu Asn Leu Gln Leu
 545 550 555 560
 Thr Asn Ser Leu Asn Asp Ala Leu Arg Asn Asn Asn Lys Val Tyr Thr
 565 570 575
 Phe Phe Ser Thr Asn Leu Val Glu Lys Ala Asn Thr Val Val Gly Ala
 580 585 590
 Ser Leu Phe Val Asn Trp Val Lys Gly Val Ile Asp Asp Phe Thr Ser
 595 600 605
 Glu Ser Thr Gln Lys Ser Thr Ile Asp Lys Val Ser Asp Val Ser Ile
 610 615 620
 Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Val Gly Asn Glu Thr Ala
 625 630 635 640
 Lys Glu Asn Phe Lys Asn Ala Phe Glu Ile Gly Gly Ala Ala Ile Leu
 645 650 655
 Met Glu Phe Ile Pro Glu Leu Ile Val Pro Ile Val Gly Phe Phe Thr
 660 665 670
 Leu Glu Ser Tyr Val Gly Asn Lys Gly His Ile Ile Met Thr Ile Ser
 675 680 685
 Asn Ala Leu Lys Lys Arg Asp Gln Lys Trp Thr Asp Met Tyr Gly Leu
 690 695 700
 Ile Val Ser Gln Trp Leu Ser Thr Val Asn Thr Gln Phe Tyr Thr Ile
 705 710 715 720
 Lys Glu Arg Met Tyr Asn Ala Leu Asn Asn Gln Ser Gln Ala Ile Glu
 725 730 735

Lys Ile Ile Glu Asp Gln Tyr Asn Arg Tyr Ser Glu Glu Asp Lys Met
 740 745 750
 Asn Ile Asn Ile Asp Phe Asn Asp Ile Asp Phe Lys Leu Asn Gln Ser
 755 760 765
 Ile Asn Leu Ala Ile Asn Asn Ile Asp Asp Phe Ile Asn Gln Cys Ser
 770 775 780
 Ile Ser Tyr Leu Met Asn Arg Met Ile Pro Leu Ala Val Lys Lys Leu
 785 790 795 800
 Lys Asp Phe Asp Asp Asn Leu Lys Arg Asp Leu Leu Glu Tyr Ile Asp
 805 810 815
 Thr Asn Glu Leu Tyr Leu Leu Asp Glu Val Asn Ile Leu Lys Ser Lys
 820 825 830
 Val Asn Arg His Leu Lys Asp Ser Ile Pro Phe Asp Leu Ser Leu Tyr
 835 840 845
 Thr Lys Asp Thr Ile Leu Ile Gln Val Phe Asn Asn Tyr Ile Ser Asn
 850 855 860
 Ile Ser Ser Asn Ala Ile Leu Ser Leu Ser Tyr Arg Gly Gly Arg Leu
 865 870 875 880
 Ile Asp Ser Ser Gly Tyr Gly Ala Thr Met Asn Val Gly Ser Asp Val
 885 890 895
 Ile Phe Asn Asp Ile Gly Asn Gly Gln Phe Lys Leu Asn Asn Ser Glu
 900 905 910
 Asn Ser Asn Ile Thr Ala His Gln Ser Lys Phe Val Val Tyr Asp Ser
 915 920 925
 Met Phe Asp Asn Phe Ser Ile Asn Phe Trp Val Arg Thr Pro Lys Tyr
 930 935 940
 Asn Asn Asn Asp Ile Gln Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Tyr Thr Ile Ile
 945 950 955 960
 Ser Cys Ile Lys Asn Asp Ser Gly Trp Lys Val Ser Ile Lys Gly Asn
 965 970 975
 Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile Asp Val Asn Ala Lys Ser Lys Ser Ile
 980 985 990
 Phe Phe Glu Tyr Ser Ile Lys Asp Asn Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys
 995 1000 1005

Trp Phe Ser Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asn Ala Asn
 1010 1015 1020
 Ile Tyr Ile Asn Gly Ser Leu Lys Lys Ser Glu Lys Ile Leu Asn
 1025 1030 1035
 Leu Asp Arg Ile Asn Ser Ser Asn Asp Ile Asp Phe Lys Leu Ile
 1040 1045 1050
 Asn Cys Thr Asp Thr Thr Lys Phe Val Trp Ile Lys Asp Phe Asn
 1055 1060 1065
 Ile Phe Gly Arg Glu Leu Asn Ala Thr Glu Val Ser Ser Leu Tyr
 1070 1075 1080
 Trp Ile Gln Ser Ser Thr Asn Thr Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn
 1085 1090 1095
 Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Gln Tyr Tyr Leu Phe Asn Gln Gly Met
 1100 1105 1110
 Gln Asn Ile Tyr Ile Lys Tyr Phe Ser Lys Ala Ser Met Gly Glu
 1115 1120 1125
 Thr Ala Pro Arg Thr Asn Phe Asn Asn Ala Ala Ile Asn Tyr Gln
 1130 1135 1140
 Asn Leu Tyr Leu Gly Leu Arg Phe Ile Ile Lys Lys Ala Ser Asn
 1145 1150 1155
 Ser Arg Asn Ile Asn Asn Asp Asn Ile Val Arg Glu Gly Asp Tyr
 1160 1165 1170
 Ile Tyr Leu Asn Ile Asp Asn Ile Ser Asp Glu Ser Tyr Arg Val
 1175 1180 1185
 Tyr Val Leu Val Asn Ser Lys Glu Ile Gln Thr Gln Leu Phe Leu
 1190 1195 1200
 Ala Pro Ile Asn Asp Asp Pro Thr Phe Tyr Asp Val Leu Gln Ile
 1205 1210 1215
 Lys Lys Tyr Tyr Glu Lys Thr Thr Tyr Asn Cys Gln Ile Leu Cys
 1220 1225 1230
 Glu Lys Asp Thr Lys Thr Phe Gly Leu Phe Gly Ile Gly Lys Phe
 1235 1240 1245
 Val Lys Asp Tyr Gly Tyr Val Trp Asp Thr Tyr Asp Asn Tyr Phe
 1250 1255 1260
 Cys Ile Ser Gln Trp Tyr Leu Arg Arg Ile Ser Glu Asn Ile Asn

1265

1270

1275

Lys Leu Arg Leu Gly Cys Asn Trp Gln Phe Ile Pro Val Asp Glu
1280 1285 1290

Gly Trp Thr Glu
1295

<210> 15

<211> 4400

5 <212> ADN

<213> Clostridium tetani

<400> 15

tagcatta	aaaattag	cctatag	ataaatta	taatata	ttttata	60
ttaattat	ataatatt	taagata	agtaaatt	taaaaatt	aattttc	120
ttacaaaa	taacctg	atggtat	taattgt	aaacata	aaaatca	180
aaatttag	ggtatatt	taatgga	aataata	ttttaatt	cttttg	240
ataaatat	aatgttt	ttaattag	gatgata	atgcca	ccataaa	300
ttttagat	agtgatc	ttaataat	tacaatt	atgatgg	caccata	360
taagggct	gatattc	ataaggc	caaaata	gatcgt	ggatagt	420
ggaaagg	gaatttg	caaacct	agatttt	ccaccat	cattaat	480
aggtgcat	gagtatt	atccaa	tttaagg	gattctg	aagatag	540
tttaca	accatg	tgtttaa	caaaata	aatgtag	gtgaagc	600
attagata	agataat	ccatac	ccttgga	tcatatt	tactaga	660
gtttgata	caactta	caagtat	taatttt	gaacaag	ccagtgg	720
aactacaa	tcagca	atgca	aaataat	ggacctg	ctgtttt	780
taaaaat	gaggtag	ttgtatt	ggtagat	aaaaatt	tcccatg	840
agatgg	ttttt	ggctcaa	tgcaaat	atgttgc	caaatgt	900
taatgta	ataata	cgctact	caatg	tattgg	caaatat	960
agcattac	ttaatgc	caactta	tgctact	ggtttat	caatgc	1020
atcaagcc	atgca	caatc	caatc	caatc	caatc	1080
aagtgctg	aaactatt	caatc	caatc	caatc	caatc	1140
aaaaaac	gatg	aaacttt	tgattata	gctatag	caaaact	1200
tcaagtc	actgca	atccca	tgatatt	agctaca	aaatata	1260
acaaaaat	caattcg	aagatag	tggaaca	attgtaa	aggataa	1320
tcagatac	tataat	taatgat	ttttaca	attgaat	gaaaaaa	1380
taatata	aaactag	cttattt	tatgaat	gacctgt	aaattcca	1440
tttattag	gataca	acaatga	agaagg	aatatag	gcaaag	1500
gaaatctg	ataaagg	aaaatat	ggtaaata	aatgctt	gaaatgt	1560

tggatcaggc	ctagtttcaa	aacttattgg	cttatgtaaa	aaaattatac	caccaacaaa	1620
tataagagaa	aatttatata	atagaactgc	atcattaaca	gatttaggag	gagaattatg	1680
tataaaaatt	aaaaatgaag	atttaacttt	tatagctgaa	aaaaatagct	tttcagaaga	1740
accatttcaa	gatgaaatag	ttagttataa	tacaaaaaat	aaaccattaa	attttaatta	1800
ttcgctagat	aaaattattg	tagattataa	tctacaaagt	aaaattacat	tacctaataga	1860
taggacaacc	ccagttacaa	aaggaattcc	atatgctcca	gaatataaaa	gtaatgctgc	1920
aagtacaata	gaaatacata	atattgatga	caatacaata	tatcaatatt	tgtatgctca	1980
aaaatctcct	acaactctac	aaagaataac	tatgactaat	tctgttgatg	acgcattaat	2040
aaattccacc	aaaatatatt	catattttcc	atctgtaatc	agtaaagtta	accaaggtgc	2100
acaaggaatt	ttattcttac	agtgggtgag	agatataatt	gatgatttta	ccaatgaatc	2160
ttcacaaaaa	actactattg	ataaaatttc	agatgtatcc	actattgttc	cttatatagg	2220
acccgcatta	aacattgtaa	aacaaggcta	tgagggaaac	tttataggcg	ctttagaaac	2280
taccggagtg	gttttattat	tagaatatat	tccagaaatt	actttaccag	taattgcagc	2340
tttatctata	gcagaaagta	gcacacaaaa	agaaaagata	ataaaaacaa	tagataaactt	2400
tttagaaaaa	agatatgaaa	aatggattga	agtatataaa	ctagtaaaag	caaaatggtt	2460
aggcacagtt	aatacgcaat	tccaaaaaag	aagttatcaa	atgtatagat	ctttagaata	2520
tcaagtagat	gcaataaaaa	aaataataga	ctatgaatat	aaaatatatt	caggacctga	2580
taaggaacaa	attgccgacg	aaattaataa	tctgaaaaac	aaacttgaag	aaaaggctaa	2640
taaagcaatg	ataaacataa	atatattttat	gagggaaagt	tctagatcat	ttttagttaa	2700
tcaaatgatt	aacgaagcta	aaaagcagtt	attagagttt	gatactcaa	gcaaaaatat	2760
tttaatgcag	tataaaaaag	caaattctaa	atttataggt	ataactgaac	taaaaaaatt	2820
agaatcaaaa	ataaacaaag	ttttttcaac	accaattcca	ttttcttatt	ctaaaaatct	2880
ggattgttgg	gttgataatg	aagaagatat	agatgttata	ttaaaaaaga	gtacaatttt	2940
aaatttagat	attaataatg	atattatatac	agatataatct	gggtttaatt	catctgtaat	3000
aacatatcca	gatgctcaat	tggtgcccgg	aataaatggc	aaagcaatac	atttagtaaa	3060
caatgaatct	tctgaagtta	tagtgcataa	agctatggat	attgaatata	atgatatggt	3120
taataatttt	accgttagct	tttggttgag	ggttcctaaa	gtatctgcta	gtcatttaga	3180
acaatatggc	acaaatgagt	attcaataat	tagctctatg	aaaaaacata	gtctatcaat	3240
aggatctggt	tggagtgtat	cacttaaagg	taataactta	atatggactt	taaaagattc	3300
cgcgggagaa	gttagacaaa	taacttttag	ggatttacct	gataaattta	atgcttattt	3360
agcaataaaa	tgggttttta	taactattac	taatgataga	ttatcttctg	ctaatttgta	3420
tataaatgga	gtacttatgg	gaagtgcaga	aattactggt	ttaggagcta	ttagagagga	3480
taataatata	acattaaaac	tagatagatg	taataataat	aatcaatacg	tttctattga	3540
taaatttagg	atattttgca	aagcattaaa	tccaaaagag	attgaaaaat	tatacacaaag	3600
ttatttatct	ataacctttt	taagagactt	ctggggaaac	cctttacgat	atgatacaga	3660

ES 2 544 060 T3

atattattta ataccagtag cttctagttc taaagatggt caattgaaaa atataacaga	3720
ttatatgtat ttgacaaatg cgccatcgta tactaacgga aaattgaata tatattatag	3780
aaggttatat aatggactaa aatttattat aaaaagatat acacctaata atgaaataga	3840
ttcttttggt aaatcagggtg attttattaa attatatgta tcatataaca ataatgagca	3900
cattgtaggt tatccgaaag atggaaatgc ctttaataat cttgatagaa ttctaagagt	3960
aggttataat gccccaggta tccctcttta taaaaaatg gaagcagtaa aattgcgtga	4020
tttaaaaacc tattctgtac aacttaaatt atatgatgat aaaaatgcat ctttaggact	4080
agtaggtacc cataatggtc aaataggcaa cgatccaaat agggatatat taattgcaag	4140
caactggtag tttaatcatt taaaagataa aatttttagga tgtgattggt actttgtacc	4200
tacagatgaa ggatggacaa atgattaaac agattgatat gttcatgatt actctatata	4260
aaaaattaaa taatataaca atctagctat attatTTTTg attatTTTTct taatataac	4320
taataaaata atcaaaatag agcctatctt aaattactga agggctgtgt caaaataaga	4380
ttttgacaca gcctctactt	4400

<210> 16

<211> 1315

5 <212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 16

Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Val Asn Asn
 1 5 10 15

Asp Thr Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Tyr Cys Lys Gly Leu Asp Ile
 20 25 30

Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu
 35 40 45

Arg Tyr Glu Phe Gly Thr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Pro Pro Ser Ser
 50 55 60

Leu Ile Glu Gly Ala Ser Glu Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Arg Thr
 65 70 75 80

Asp Ser Asp Lys Asp Arg Phe Leu Gln Thr Met Val Lys Leu Phe Asn
 85 90 95

Arg Ile Lys Asn Asn Val Ala Gly Glu Ala Leu Leu Asp Lys Ile Ile
 100 105 110

Asn Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Leu Asp Lys Phe
 115 120 125

Asp Thr Asn Ser Asn Ser Val Ser Phe Asn Leu Leu Glu Gln Asp Pro
 130 135 140

Ser Gly Ala Thr Thr Lys Ser Ala Met Leu Thr Asn Leu Ile Ile Phe
 145 150 155 160
 Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Lys Asn Glu Val Arg Gly Ile Val Leu
 165 170 175
 Arg Val Asp Asn Lys Asn Tyr Phe Pro Cys Arg Asp Gly Phe Gly Ser
 180 185
 Ile Met Gln Met Ala Phe Cys Pro Glu Tyr Val Pro Thr Phe Asp Asn
 195 200 205
 Val Ile Glu Asn Ile Thr Ser Leu Thr Ile Gly Lys Ser Lys Tyr Phe
 210 215 220
 Gln Asp Pro Ala Leu Leu Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His
 225 230 235 240
 Gly Leu Tyr Gly Met Gln Val Ser Ser His Glu Ile Ile Pro Ser Lys
 245 250 255
 Gln Glu Ile Tyr Met Gln His Thr Tyr Pro Ile Ser Ala Glu Glu Leu
 260 265 270
 Phe Thr Phe Gly Gly Gln Asp Ala Asn Leu Ile Ser Ile Asp Ile Lys
 275 280 285
 Asn Asp Leu Tyr Glu Lys Thr Leu Asn Asp Tyr Lys Ala Ile Ala Asn
 290 295 300
 Lys Leu Ser Gln Val Thr Ser Cys Asn Asp Pro Asn Ile Asp Ile Asp
 305 310 315 320
 Ser Tyr Lys Gln Ile Tyr Gln Gln Lys Tyr Gln Phe Asp Lys Asp Ser
 325 330 335
 Asn Gly Gln Tyr Ile Val Asn Glu Asp Lys Phe Gln Ile Leu Tyr Asn
 340 345 350
 Ser Ile Met Tyr Gly Phe Thr Glu Ile Glu Leu Gly Lys Lys Phe Asn
 355 360 365
 Ile Lys Thr Arg Leu Ser Tyr Phe Ser Met Asn His Asp Pro Val Lys
 370 375 380
 Ile Pro Asn Leu Leu Asp Asp Thr Ile Tyr Asn Asp Thr Glu Gly Phe
 385 390 395 400
 Asn Ile Glu Ser Lys Asp Leu Lys Ser Glu Tyr Lys Gly Gln Asn Met
 405 410 415

Arg Val Asn Thr Asn Ala Phe Arg Asn Val Asp Gly Ser Gly Leu Val
 420 425 430
 Ser Lys Leu Ile Gly Leu Cys Lys Lys Ile Ile Pro Pro Thr Asn Ile
 435 440 445
 Arg Glu Asn Leu Tyr Asn Arg Thr Ala Ser Leu Thr Asp Leu Gly Gly
 450 455 460
 Glu Leu Cys Ile Lys Ile Lys Asn Glu Asp Leu Thr Phe Ile Ala Glu
 465 470 475 480
 Lys Asn Ser Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gln Asp Glu Ile Val Ser Tyr
 485 490 495
 Asn Thr Lys Asn Lys Pro Leu Asn Phe Asn Tyr Ser Leu Asp Lys Ile
 500 505 510
 Ile Val Asp Tyr Asn Leu Gln Ser Lys Ile Thr Leu Pro Asn Asp Arg
 515 520 525
 Thr Thr Pro Val Thr Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Pro Glu Tyr Lys Ser
 530 535 540
 Asn Ala Ala Ser Thr Ile Glu Ile His Asn Ile Asp Asp Asn Thr Ile
 545 550 555 560
 Tyr Gln Tyr Leu Tyr Ala Gln Lys Ser Pro Thr Thr Leu Gln Arg Ile
 565 570 575
 Thr Met Thr Asn Ser Val Asp Asp Ala Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile
 580 585 590
 Tyr Ser Tyr Phe Pro Ser Val Ile Ser Lys Val Asn Gln Gly Ala Gln
 595 600 605
 Gly Ile Leu Phe Leu Gln Trp Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr
 610 615 620
 Asn Glu Ser Ser Gln Lys Thr Thr Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser
 625 630 635 640
 Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Val Lys Gln Gly
 645 650 655
 Tyr Glu Gly Asn Phe Ile Gly Ala Leu Glu Thr Thr Gly Val Val Leu
 660 665 670
 Leu Leu Glu Tyr Ile Pro Glu Ile Thr Leu Pro Val Ile Ala Ala Leu
 675 680 685

Ser Ile Ala Glu Ser Ser Thr Gln Lys Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile
690 695 700

Asp Asn Phe Leu Glu Lys Arg Tyr Glu Lys Trp Ile Glu Val Tyr Lys
705 710 715 720

Leu Val Lys Ala Lys Trp Leu Gly Thr Val Asn Thr Gln Phe Gln Lys
725 730 735

Arg Ser Tyr Gln Met Tyr Arg Ser Leu Glu Tyr Gln Val Asp Ala Ile
740 745 750

Lys Lys Ile Ile Asp Tyr Glu Tyr Lys Ile Tyr Ser Gly Pro Asp Lys
755 760 765

Glu Gln Ile Ala Asp Glu Ile Asn Asn Leu Lys Asn Lys Leu Glu Glu
770 775 780

Lys Ala Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Ile Phe Met Arg Glu Ser
785 790 795 800

Ser Arg Ser Phe Leu Val Asn Gln Met Ile Asn Glu Ala Lys Lys Gln
805 810 815

Leu Leu Glu Phe Asp Thr Gln Ser Lys Asn Ile Leu Met Gln Tyr Ile
820 825 830

Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu
835 840 845

Ser Lys Ile Asn Lys Val Phe Ser Thr Pro Ile Pro Phe Ser Tyr Ser
850 855 860

Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile
865 870 875 880

Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile
885 890 895

Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala
900 905 910

Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn
915 920 925

Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn
930 935 940

Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys
945 950 955 960

Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr Gly Thr Asn Glu Tyr Ser Ile

			965				970				975				
Ile	Ser	Ser	Met 980	Lys	Lys	His	Ser	Leu	Ser	Ile	Gly	Ser	Gly	Trp	Ser
Val	Ser	Leu	Lys 995	Gly	Asn	Asn	Leu	Ile	Trp	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser	Ala
							1000					1005			
Gly	Glu	Val	Arg	Gln	Ile	Thr	Phe	Arg	Asp	Leu	Pro	Asp	Lys	Phe	
	1010					1015					1020				
Asn	Ala	Tyr	Leu	Ala	Asn	Lys	Trp	Val	Phe	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	
	1025					1030					1035				
Asp	Arg	Leu	Ser	Ser	Ala	Asn	Leu	Tyr	Ile	Asn	Gly	Val	Leu	Met	
	1040					1045					1050				
Gly	Ser	Ala	Glu	Ile	Thr	Gly	Leu	Gly	Ala	Ile	Arg	Glu	Asp	Asn	
	1055					1060					1065				
Asn	Ile	Thr	Leu	Lys	Leu	Asp	Arg	Cys	Asn	Asn	Asn	Asn	Gln	Tyr	
	1070					1075					1080				
Val	Ser	Ile	Asp	Lys	Phe	Arg	Ile	Phe	Cys	Lys	Ala	Leu	Asn	Pro	
	1085					1090					1095				
Lys	Glu	Ile	Glu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ile	Thr	Phe	
	1100					1105					1110				
Leu	Arg	Asp	Phe	Trp	Gly	Asn	Pro	Leu	Arg	Tyr	Asp	Thr	Glu	Tyr	
	1115					1120					1125				
Tyr	Leu	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Ser	Ser	Lys	Asp	Val	Gln	Leu	Lys	
	1130					1135					1140				
Asn	Ile	Thr	Asp	Tyr	Met	Tyr	Leu	Thr	Asn	Ala	Pro	Ser	Tyr	Thr	
	1145					1150					1155				
Asn	Gly	Lys	Leu	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Arg	Arg	Leu	Tyr	Asn	Gly	Leu	
	1160					1165					1170				
Lys	Phe	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	Thr	Pro	Asn	Asn	Glu	Ile	Asp	Ser	
	1175					1180					1185				
Phe	Val	Lys	Ser	Gly	Asp	Phe	Ile	Lys	Leu	Tyr	Val	Ser	Tyr	Asn	
	1190					1195					1200				
Asn	Asn	Glu	His	Ile	Val	Gly	Tyr	Pro	Lys	Asp	Gly	Asn	Ala	Phe	
	1205					1210					1215				
Asn	Asn	Leu	Asp	Arg	Ile	Leu	Arg	Val	Gly	Tyr	Asn	Ala	Pro	Gly	
	1220					1225					1230				

Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val Lys Leu Arg Asp Leu
 1235 1240 1245

Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn Ala
 1250 1255 1260

Ser Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile Gly Asn Asp
 1265 1270 1275

Pro Asn Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His
 1280 1285 1290

Leu Lys Asp Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr
 1295 1300 1305

Asp Glu Gly Trp Thr Asn Asp
 1310 1315

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de neurotoxina que comprende una cadena ligera, un enlazador y una cadena pesada, en donde el enlazador es un enlazador modificado que comprende una secuencia heteróloga de aminoácidos que confiere al menos una propiedad fisicoquímica al polipéptido que permite la separación de polipéptidos de neurotoxina parcialmente procesados o sin procesar de polipéptidos de neurotoxina procesados, siendo dicha secuencia heteróloga de aminoácidos flanqueada en el terminal N y C por un sitio de reconocimiento y escisión de proteasa, en donde la neurotoxina es una neurotoxina botulínica.
- 10 2. El polinucleótido de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia heteróloga de aminoácidos se enlaza con alta afinidad a una matriz de purificación.
- 15 3. El polinucleótido de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha secuencia heteróloga de aminoácidos que se enlaza con alta afinidad a una matriz de purificación comprende una etiqueta de purificación.
4. El polinucleótido de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia heteróloga de aminoácidos aumenta el peso molecular del polipéptido de neurotoxina de tal manera que los polipéptidos de neurotoxina parcialmente procesados y/o no procesados pueden ser físicamente separados del polipéptido de neurotoxina procesado.
- 20 5. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, en donde dicha secuencia heteróloga de aminoácidos que se enlaza con alta afinidad a una matriz de purificación comprende (i) al menos un dominio de aminoácidos que confiere alta afinidad de enlazamiento a la matriz de purificación y (ii) al menos un dominio de aminoácidos que pone los residuos de cisteína que forman el puente disulfuro intramolecular entre la cadena ligera y pesada en forma muy próxima y/o previene la interferencia de la secuencia heteróloga de aminoácido con la
- 25 formación de enlaces disulfuro adecuados entre la cadena ligera y pesada.
6. El polinucleótido de la reivindicación 5, en donde dicho al menos un dominio que confiere alta afinidad de enlazamiento con la matriz de purificación comprende una etiqueta de purificación.
- 30 7. El polinucleótido de la reivindicación 5 o 6, en donde dicho al menos un dominio de aminoácidos que evita la interferencia de la secuencia heteróloga de aminoácidos con la formación de enlaces disulfuro adecuados entre la cadena ligera y pesada forma una estructura tridimensional que pone los residuos de cisteína que forman el puente disulfuro intramolecular entre la cadena ligera y pesada en proximidad física.
- 35 8. El polinucleótido de la reivindicación 7, en donde dicha estructura tridimensional formada por los aminoácidos del terminal C y N de la secuencia heteróloga de aminoácidos es una bobina en espiral antiparalela o una estructura de lámina beta antiparalela.
- 40 9. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde dicha secuencia heteróloga de aminoácidos que se enlaza con alta afinidad a una matriz de purificación comprende además al menos una secuencia de aminoácidos marcadora detectable.
- 45 10. El polinucleótido de la reivindicación 9, en donde dicha secuencia de aminoácidos marcadora detectable se selecciona de entre el grupo que consiste de: una secuencia de aminoácidos de una proteína fluorescente, una secuencia de aminoácidos de una enzima capaz de generar una señal detectable, y una secuencia de aminoácidos de una etiqueta detectable.
- 50 11. El polinucleótido de la reivindicación 3 o cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde dicha etiqueta de purificación se selecciona de entre el grupo que consiste de: etiqueta de His, etiqueta de Myc, etiqueta FLAG, etiqueta de estreptavidina, etiqueta de MBP, etiqueta de NusA, etiqueta de GST, estreptavidina y avidina.
- 55 12. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho sitio de reconocimiento y escisión de proteasa se selecciona de entre el grupo que consiste de: el sitio de reconocimiento y escisión de proteasa de cadena ligera de neurotoxina de SNAP 25, el sitio de reconocimiento y escisión de una proteasa de E. coli, el sitio de reconocimiento y escisión de trombina, el sitio de reconocimiento y escisión del Factor X, el sitio de reconocimiento y escisión de la tripsina, el sitio de reconocimiento y escisión de la enteroquinasa, el sitio de reconocimiento y escisión de la proteasa TEV, el sitio de reconocimiento y escisión de HRV 3c y el sitio de reconocimiento y escisión de la proteasa PreScission.

13. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha cadena ligera y pesada del polipéptido de neurotoxina son la cadena ligera y pesada de una neurotoxina seleccionada de entre el grupo que consiste de: BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G o TeNT.
- 5
14. Un vector que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. Una célula anfitriona que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o el vector de la reivindicación 14.
- 10
16. La célula anfitriona de la reivindicación 15, en donde dicha célula anfitriona es una célula bacteriana.
17. Un polipéptido codificado por el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
18. Un método para la fabricación de un polipéptido de neurotoxina procesado que comprende las etapas de:
- 15
- a) poner en contacto el polipéptido de neurotoxina sin procesar de la reivindicación 17 con una matriz de purificación bajo las condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir el enlazamiento de dicho polipéptido de neurotoxina sin procesar a la matriz de purificación;
- 20
- b) poner en contacto el polipéptido de neurotoxina no procesado enlazado a la matriz de purificación con una proteasa que es capaz de escindir el polipéptido de neurotoxina en los sitios de reconocimiento y escisión de la proteasa dando como resultado polipéptidos de neurotoxina procesados y parcialmente procesados y/o no procesados; y
- 25
- c) remover el polipéptido de neurotoxina procesado liberado de la matriz de purificación.
19. Un método para la fabricación de un polipéptido de neurotoxina procesado que comprende las etapas de:
- 30
- a) poner en contacto un polipéptido de neurotoxina de la reivindicación 17 con una proteasa que es capaz de escindir el polipéptido de neurotoxina en los sitios de reconocimiento y escisión de la proteasa;
- 35
- b) poner en contacto el polipéptido de neurotoxina procesado, sin procesar y/o parcialmente procesado obtenido en la etapa a) con una matriz de purificación bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir el enlazamiento de dicho polipéptido de neurotoxina sin procesar y/o parcialmente procesado a la matriz de purificación; y
- 40
- c) remover el polipéptido de neurotoxina procesado, liberado, de la matriz de purificación.
20. El método de la reivindicación 19, en donde la etapa a) se lleva a cabo en una célula anfitriona o un lisado de la misma que expresa el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y una proteasa que es capaz de escindir el polipéptido de neurotoxina en los sitios de reconocimiento y escisión de la proteasa.
21. Un método para la fabricación de un polipéptido de neurotoxina procesado que comprende las etapas de:
- 45
- a) poner en contacto un polipéptido de neurotoxina de la reivindicación 17 con una proteasa que es capaz de escindir el polipéptido de neurotoxina en los sitios de reconocimiento y escisión de la proteasa;
- 50
- b) someter el polipéptido de neurotoxina procesado, sin procesar y/o parcialmente procesado obtenido en la etapa a) a condiciones físicas durante un tiempo suficiente para permitir la separación física de los polipéptidos de neurotoxina parcialmente procesados o sin procesar de los polipéptidos de neurotoxina procesados; y
- c) remover el polipéptido de neurotoxina procesado después de dicha separación física.

Fig. 1

