

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 747**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2010 E 10824166 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2488868**

54 Título: **Ensayo de transferencia de energía de resonancia con un resto de sustrato de sinaptobrevina**

30 Prioridad:

16.10.2009 US 252315 P

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

11.07.2016

73 Titular/es:

**BIOMADISON, INC. (100.0%)
1568 Luneta Drive
Del Mar, CA 92014, US**

72 Inventor/es:

**TUCKER, WARD y
ZEY TIN, FÜSÜN N.**

74 Agente/Representante:

MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia

ES 2 576 747 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

5 **Ensayo de transferencia de energía de resonancia con un resto de sustrato de sinaptobrevina****Campo de la invención**

10 El campo de la invención se refiere a ensayos para la transferencia de energía de resonancia Förster (FRET por sus siglas en inglés) para la actividad de la proteasa, ensayos especialmente ensayos para proteasa para la neurotoxina botulínica BoNT (*botulinum neurotoxins BoNT*) que escinden sinaptobrevina.

15 **Antecedentes de la invención**

20 Las neurotoxinas botulínicas (BoNT) son proteínas extremadamente tóxicas y pueden clasificarse en distintos subgrupos basados, entre otros, en la secuencia de péptido y/o especificidad de sustrato. Todas las BoNT con origen natural (BoNT/AG) se componen de una cadena pesada que media la entrada de la toxina en una célula diana y una cadena ligera con la actividad de la proteasa dependiente de cinc que hidroliza proteínas SNARE seleccionadas que median la fusión de las vesículas del neurotransmisor a la membrana que forma parte de la hendidura sináptica.

25 Por ejemplo, la cadena ligera de BoNT/A se hidroliza con una alta especificidad SNAP-25, que se requiere para la exocitosis mediada por vesículas de acetilcolina en la hendidura sináptica. Ensayos conocidos para tal actividad hidrolítica incluyen los descritos en nuestra solicitud de patente internacional en tramitación (WO 2009/035476). En esta patente, un fluoróforo y un desactivador están covalentemente unidos a los respectivos extremos de una secuencia de péptidos que incluye, por ejemplo, la secuencia de SNAP-25. La escisión por BoNT/A (u otros BoNT con una especificidad de sustrato hacia la SNAP-25) dará lugar a la separación física de los productos de escisión y así reducir el enfriamiento y desactivación de la fluorescencia, que puede ser cuantificada. Entre otras opciones, a menudo se prefiere que tal ensayo se realice como un ensayo de base en una fase sólida in vitro.

35 Mientras que dichos ensayos son conceptualmente simples y se pueden utilizar para determinar fácilmente la actividad BoNT/A, BoNT/C, o BoNT/E, tales ensayos no pueden ser simplemente modificados para un ensayo basado en células para la determinación de actividades BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F, o BoNT/G reemplazando el motivo SNAP-25 con un dominio SNARE dado que el dominio SNARE incluye una membrana que abarca un subdominio que colocaría el fluoróforo N-terminal en un lumen de la vesícula. En tal caso, sólo la difusión de la señal de fluorescencia se observaría como se ha indicado en otros documentos (Dong *et al.* PNAS (2004), vol.101, N°. 41,14701-14706; o documento de solicitud de patente en los Estados Unidos de América N°. 2006/0134722).

40 Por lo tanto, todavía existe necesidad de mejorar los ensayos BoNT, y los ensayos basados en células, especialmente-para las BoNT que escinden sinaptobrevina.

45 **Sumario de la invención**

50 La presente invención se refiere a diferentes composiciones y métodos de análisis de la actividad proteasa BoNT y, especialmente, BoNT/B, BoNT/G, BoNT/D, y/o actividad de la proteasa de BoNT/F en un sistema basado en células utilizando transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Más preferiblemente, las células expresan una o más proteínas recombinantes híbridas junto con al menos una proteasa de reconocimiento y escisión de secuencia BoNT, en la que la proteína híbrida comprende además un dominio transmembrana que no es escindible por la proteasa BoNT y que dirige la proteína híbrida a una vesícula intracelular sináptica.

55 En un aspecto de la materia objeto de la invención, un método basado en células de medición de la actividad proteasa de una proteasa BoNT, en el que en un solo paso se proporciona una célula transfectada que produce (I) una proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D o (II) dos proteínas híbridas que tienen una estructura de A-C-B y A-C-D, respectivamente, en donde A es un dominio transmembrana que no es escindible por la proteasa BoNT y que se inserta a través de una membrana lipídica como la B, C y D que se encuentran en el mismo lado de la membrana lipídica, B es una primera proteína fluorescente, C es una secuencia de reconocimiento de proteasa y de escisión de BoNT, y D es una segunda proteína fluorescente. En otro paso, la célula transfectada se pone en contacto con una proteasa BoNT en condiciones que permiten que la célula tome la proteasa BoNT, y, en otro paso, se mide la fluorescencia de al menos una de las primera y segunda proteínas fluorescentes en la célula transfectada.

65 Más preferiblemente, la célula transfectada es una célula neuronal, una célula de tumor neuroendocrino, una célula

híbrida, o una célula madre. Además, se prefiere generalmente que A incluya un dominio de membrana de sinaptobrevina, sinaptofisina, sinapsina I, sinapsina II, y/o sinapsina III, y/o que C incluya al menos dos secuencias de reconocimiento de proteasa y de escisión de un sustrato de BoNT/B, un sustrato de BoNT/G, una BoNT/D, y una BoNT/F. Aunque no es limitante para el contenido de la invención, se prefiere, además, que un péptido enlazador esté dispuesto entre uno o más de A y C, A y B, C y B, y C y D, y que el enlazador tenga una longitud de igual o menos de 12 aminoácidos. Además, se contempla que la célula transfectada se pueda poner en contacto con un sustrato putativo o conocido inhibidor de BoNT antes de contactar a la célula transfectada con la proteasa BoNT. En aspectos especialmente preferidos, la célula transfectada produce dos proteínas híbridas.

5
10 En ejemplos de realización, la proteína híbrida que tiene la estructura de A-B-C-D tiene una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:2, la proteína híbrida que tiene la estructura de A-C-B tiene una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:4, y la proteína híbrida que tiene la estructura de A-C-B tiene una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:6.

15 De esta manera, visto desde una perspectiva diferente, un ácido nucleico recombinante que incluye una secuencia que codifica (I) una proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D o (II) dos proteínas híbridas que tienen una estructura de A-C-B y A-C-D, respectivamente, en la que A es un dominio transmembrana que no es escindible por la proteasa BoNT y que se inserta a través de una membrana lipídica de forma que B, C y D se encuentran en el mismo lado de la membrana lipídica, B es una primera proteína fluorescente, C es una secuencia de reconocimiento y escisión de proteasa BoNT, y D es una segunda proteína fluorescente. Más preferiblemente, A comprende un dominio transmembrana de sinaptobrevina, sinaptofisina, sinapsina I, sinapsina II, y/o sinapsina III, y/o C comprende al menos dos de un sustrato de BoNT/B, un sustrato de BoNT/G, un sustrato de BoNT/D, y una secuencia de reconocimiento y escisión de la proteasa de BoNT/F. Cuando se desea, se puede proporcionar al menos una secuencia adicional que codifica un péptido enlazador que está dispuesto entre al menos uno de A y C, A y B, C y B, y C y D, en el que el enlazador tiene una longitud de igual o menos de 12 aminoácidos.

20
25 En aspectos especialmente preferidos, el ácido nucleico recombinante codifica las dos proteínas híbridas. En ejemplos de ácidos nucleicos, la proteína híbrida que tiene la estructura de A-B-C-D está codificada por una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:1, la proteína híbrida que tiene la estructura de A-C-B está codificada por una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:3, y la proteína híbrida que tiene la estructura de A-C-B está codificada por una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:5.

30 En consecuencia, los inventores también contemplan una célula transfectada con el ácido nucleico presentado en el presente documento, y generalmente se prefiere que la célula sea establemente transfectada con el ácido nucleico. Células especialmente adecuadas incluyen células neuronales, células tumorales, células neuroendocrinas híbridas, y células madre. Además, típicamente se prefiere que la célula comprenda un ácido nucleico que codifica las dos proteínas híbridas que tienen la estructura de A-C-B y A-C-D.

35
40 Objetos diversos, características, aspectos y ventajas de la presente invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención.

Breve descripción de los dibujos

45 Las figuras de la técnica anterior 1A-1B son conocidas en ensayos FRET para la actividad proteasa de BoNT en la que dos proteínas fluorescentes se separan por una secuencia de reconocimiento y escisión SNAP25.

50 Las figuras 2B-2B son ilustraciones esquemáticas para ensayos FRET intramoleculares (2A) e intermoleculares (2B) para la actividad proteasa de BoNT de acuerdo con el contenido de la invención.

Las figuras 3A-3B son ejemplos de mapas de vectores para construcciones recombinantes FRET intramoleculares (3A) e intermoleculares (3B) de acuerdo con el contenido de la invención.

55 La figura 4A representa ejemplos de resultados FRET para análisis intramoleculares (panel izquierdo) e intermoleculares (panel derecho) de acuerdo con el contenido de la invención.

La figura 4B es una representación gráfica de los resultados de los experimentos de la figura 4A.

60 **Descripción detallada**

65 De acuerdo con la presente invención se proporciona un ensayo FRET a base de células para BoNT (y especialmente para BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F, o BoNT/G) en el que se transfecta una célula de manera que la célula produce (a) una única proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D, o (b) dos proteínas híbridas

distintas que tienen una estructura de A-C-B y A-C-D, respectivamente, en la que A es un dominio transmembrana, B es una primera proteína fluorescente, C es una secuencia de reconocimiento y escisión de proteasa BoNT y D es una segunda proteína fluorescente, en donde muy típicamente, B y D permiten un ensayo FRET.

5 Se debe apreciar que la(s) proteína(s) híbrida que se forma en las células de modo transfectadas incluyen un dominio transmembrana. Por lo tanto, se espera que estas proteínas se coloquen en vesículas intracelulares para así presentar un sustrato de una unión de vesículas. Tras la exposición de las células con BoNT, cadenas pesadas de BoNT mediadas por endocitosis en la célula transfectada son seguidas por la presentación de la cadena ligera en la superficie exterior de la vesícula, permitiendo la actividad de la proteasa de la cadena ligera para escindir la
10 secuencia de escisión de la(s) proteína(s) híbrida(s), reduciendo así el FRET y proporcionando una señal cuantificable. Por lo tanto, se debe apreciar que las composiciones y métodos presentados en el presente documento permiten un ensayo basado en células en el que la captación, el procesamiento, y la actividad proteolítica se pueden supervisar en condiciones que se asemejan estrechamente a las condiciones naturales.

15 Por el contrario, tal como se representa esquemáticamente en la figura 1A de la técnica anterior, se muestra un sistema de prueba con una proteína híbrida BoNT/A. La proteína híbrida tiene primera y segunda proteínas de fluorescencia (CFP y YFP, respectivamente por sus siglas en inglés) acopladas covalentemente a los extremos respectivos de una secuencia de péptido intermedio, que también incluye una secuencia SNAP-25 (que es el sustrato para la cadena ligera de proteasa BoNT/A). La excitación de los resultados de la CFP en la emisión de fluorescencia mediada por FRET de YFP, crea así una impresión de fluorescencia espectral específica, como se
20 ilustra esquemáticamente en la B. Tras la incubación con BoNT/A, la secuencia SNAP-25 se hidroliza y YFP se libera de la molécula híbrida (el resto cuales todavía permanece unido a una membrana u otra fase sólida) como se muestra en C. Como alternativa, o adicionalmente, se puede continuar con la excitación y la emisión utilizando sólo YFP, la que cuando se separa de la proteína híbrida, en última instancia, será procesada en el proteasoma complejo. Del mismo modo, como se muestra en la figura 1B de la técnica anterior, una proteína híbrida tiene primera y segunda proteínas de fluorescencia (CFP y YFP, respectivamente) acopladas covalentemente a los extremos respectivos de una secuencia de péptido intermedio, que también incluye una secuencia SNAP-25. La proteína híbrida se asocia al exterior de la vesícula a través de un dominio rico en cisteína de la secuencia SNAP-25. Una vez más, tras la escisión del enlazador SNAP-25 entre la CFP y YFP, ya no está disponible FRET y la
25 fluorescencia se puede medir ya sea como pérdida en FRET o en última instancia como pérdida en YFP como se describe anteriormente.

Si bien tales sistemas proporcionan diversas ventajas, debería ser fácilmente evidente que cuando la secuencia de SNAP-25 se sustituye por una sinaptobrevina (VAMP), la presencia del sub-dominio transmembrana en sinaptobrevina dará lugar a la separación física de CFP y YFP por la vesícula (u otro) de la membrana, suprimiendo así cualquier FRET entre CFP y YFP como se muestra en la figura 9B del documento de solicitud de patente de los
35 EEUU N°. 2006/0134722.

Para superar estas dificultades, los inventores ahora han preparado moléculas híbridas adecuadas para FRET intramolecular en la que se coloca una proteína fluorescente (o de otro indicador) entre el sub-dominio transmembrana y la secuencia de reconocimiento de la proteasa y la escisión de BoNT, y en el que otra proteína fluorescente (u otro indicador) se coloca tras el reconocimiento de la proteasa y secuencia de escisión de BoNT. Además, los inventores también han preparado pares de moléculas híbridas adecuadas para FRET intermolecular en las que ambas moléculas híbridas tienen una proteína fluorescente respectiva acoplada a secuencias respectivas que incluyen un dominio transmembrana y una secuencia de reconocimiento y escisión de proteasa BoNT.
45

Tal como se utiliza en este documento, el término "dominio transmembrana" se refiere a cualquier resto molecular que es capaz de inserción en una membrana plasmática de una manera tal que al menos una porción de la fracción se extiende dentro (y más típicamente a través de) de la bicapa lipídica. Así, un resto que sólo toca el exterior (por ejemplo, por vía de interacción iónica o electrostática) de la superficie exterior de la membrana plasmática no se considera un dominio transmembrana en la definición establecida en la presente memoria. Por lo tanto, los dominios transmembrana especialmente preferidos incluyen dominios de polipéptidos hidrófobos que se extienden (y más típicamente a través de) en la membrana plasmática. Más típicamente, los dominios transmembrana preferidos comprenden un polipéptido (por lo general recombinante). Sin embargo, se debe reconocer que los diversos elementos alternativos (por ejemplo, palmitoilación N-terminal) también caen dentro del alcance de la definición proporcionada en este documento.
50
55

También como se usa en este documento, el término "secuencia de reconocimiento y escisión de BoNT" se refiere a cualquier resto molecular que se puede unir y escindir por una proteasa BoNT. En general se prefiere que la secuencia de reconocimiento y escisión BoNT comprenda un polipéptido sinaptobrevina o parte del mismo, que es típicamente un polipéptido recombinante.
60

En un aspecto especialmente preferido del contenido de la invención, los ácidos nucleicos recombinantes contemplados pueden incluir una secuencia que codifica (I) una proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D o (II) al menos una de las dos proteínas híbridas que tienen una estructura de A-C-B y que tienen una estructura de A-C-D, respectivamente, donde A es un dominio transmembrana, B es una primera proteína fluorescente, C es
65

una secuencia de reconocimiento y escisión de BoNT, y D es una segunda proteína fluorescente. Lo más preferiblemente, cuando la secuencia codifica dos proteínas híbridas, la expresión de las dos proteínas híbridas está bajo el control de promotores respectivos (típicamente, pero no necesariamente, con la misma fuerza y el mismo mecanismo de control reglamentario).

5 Más comúnmente, el dominio transmembrana se selecciona de tipo que permita la inserción de la(s) proteína(s) recombinante(s) en la membrana de las vesículas sinápticas. Por lo tanto, se prefiere generalmente que el dominio transmembrana sea el dominio transmembrana de sinaptobrevina, sinaptofisina, sinapsina I, sinapsina II, y/o sinapsina III, o cualquier parte del mismo que todavía confiera anclaje de la proteína recombinante en la membrana.
10 Sin embargo, en aspectos alternativos de la materia objeto de la invención, se contempla que varios otros dominios transmembrana también se consideren adecuados, siempre que tales dominios anclen la proteína recombinante a una o más membranas intracelulares. Hay numerosos dominios transmembrana conocidos en la técnica, y todos los se consideran adecuados para su uso en el presente documento. La persona con habilidad ordinaria en la técnica será fácilmente capaz de identificar un dominio como un dominio transmembrana (por ejemplo, a través de la publicación y la descripción del dominio, o por medio de análisis de dominio computacional). Por supuesto, también
15 reconocerá dominios adecuados de origen natural, así como formas mutadas del mismo (por ejemplo, formas con una o más transiciones, transversiones, inserciones, deleciones, inversiones, etc.). Por otra parte, además el dominio transmembrana, contemplado también puede ser enteramente sintético y basado en análisis computacional.

20 De manera similar, se debe apreciar que el dominio transmembrana también puede ser sustituido por otro resto polipéptido que permita al menos el anclaje temporal de la proteína híbrida a una membrana de tal manera que el resto de la proteína híbrida se exponga al citosol. El anclaje puede estar mediado por diversas interacciones (típicamente no covalentes), incluyendo interacciones iónicas, hidrófobas, y/o electrostáticas. Aún todavía se contemplan además dominios transmembrana que también incluyen dominios transmembrana no proteicos. Por
25 ejemplo, los dominios transmembrana alternativos especialmente preferidos incluirán aquellos en los que un grupo hidrófobo (por ejemplo, esteroides, hidrocarburos, etc.) se unen a la proteína, y particularmente un grupo palmitoilo. Tales grupos pueden ser añadidos intracelularmente (por ejemplo, palmitoilación a través de la señal) o in vitro utilizando diversos esquemas de síntesis.

30 Además, debe apreciarse que los dominios transmembrana adecuados preferiblemente no incluirán un sitio de escisión de proteasa BoNT y/o un sitio de reconocimiento de proteasa BoNT y por tanto sólo pueden actuar como un anclaje de transmembrana de la proteína recombinante. De esta forma, los dominios transmembrana adecuados pueden incluir sinaptobrevina de longitud completa (o sustancialmente de longitud completa) que ha sido
35 suficientemente mutada para eliminar el sitio de escisión y/o sitio de reconocimiento. Alternativamente, la sinaptobrevina (u otro dominio transmembrana) se puede truncar de forma tal que al menos el sitio de escisión y/o sitio de reconocimiento se retire. Además, si bien lo anterior se dirige a los dominios transmembrana individuales, se debe apreciar que también se considera más de un dominio transmembrana apropiado (que están acoplados preferiblemente entre sí a través de un espaciador).

40 Con respecto a las primera y segunda proteínas fluorescentes en general se contempla que todas las proteínas fluorescentes conocidas son adecuadas para uso en esta invención, siempre que tales proteínas se pueden usar como restos específicos y distintos de generación de señal. Sin embargo, se prefiere particularmente que los restos
45 de generación de señal sean proteínas fluorescentes que son adecuados para FRET. Por ejemplo, las primera y segunda proteínas pueden ser Proteínas Fluorescentes Cian (CFP por sus siglas en inglés) y Proteínas Fluorescentes Amarillas (YFP por sus siglas en inglés) y sus respectivas modificaciones, respectivamente. Por supuesto, y como ya se ha indicado anteriormente, las proteínas fluorescentes pueden ser modificados para incluir una o más características específicas (por ejemplo, espectral) o truncarse a un tamaño específico. Entre otras
50 opciones, las proteínas fluorescentes contempladas incluyen diversas proteínas fluorescentes azules (por ejemplo, EBFP, EBFP2, azurita, mKalamal), diversas proteínas fluorescentes cian (por ejemplo, ECFP, Cerulean, CyPet), diversas proteínas fluorescentes verdes (por ejemplo, AcGFP1, ZsGreen1), y diversos derivados de proteína amarilla fluorescente (por ejemplo, YFP, citrino, Venus, YPet).

De manera similar, se debe apreciar que la secuencia de reconocimiento y escisión de proteasa BoNT y puede
55 variar considerablemente, y aún todavía dicha secuencia es reconocida y e hidrolizada por una cadena ligera de BoNT. Por ejemplo, la secuencia de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT puede ser de humano, ratón, o de origen murino, puede estar presente en forma de oligo-multimérica, y puede ser además modificada específicamente para facilitar o inhibir al menos parcialmente la escisión. Alternativamente, la secuencia de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT también se puede modificar para permitir la identificación de uno o más subtipos específicos de BoNT (por ejemplo, BoNT/B, D, F, y/o G, así como la toxina del tétanos) por escisión
60 preferente o exclusiva. Por supuesto, se debe reconocer que todas las isoformas y mutantes de secuencias de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT también se consideran adecuadas para su uso en conjunción con las enseñanzas presentadas en el presente documento siempre que tales formas y mutaciones también sean escindibles por una o más proteasas de BoNT. Por ejemplo, secuencias de reconocimiento y escisión de la proteasa adecuadas incluyen las de Vamp (sinaptobrevina) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8, y las secuencias a modo de ejemplo se
65 enumeran a continuación en el que el dominio de reconocimiento y la escisión está en una fuente de tipo regular, el dominio de transmembrana está en un tipo de letra cursiva, y en donde las posiciones actuales de escisión de las

ES 2 576 747 T3

respectivas proteasas BoNT están subrayados (QK: BoNT/F; KL: BoNT/D; QF: BoNT/B y TeTN; AA: BoNT/G):

Secuencia de proteína de ratón Vamp2 (SEQ ID NO: 7):

5

```
MSATAATVPPAAPAGEGGPPAPPNLTSNRRLLQQTQAQVDEVVDIMRVNVD  
KVLERDQKLSELDDRADALQAGASQFETSAAKLRKYWWKNLKMIIIILGVICAIILIII  
VYFST SEQ ID NO:7
```

Secuencia de la proteína de ratón Vamp2 (SEQ ID NO: 8):

10

```
MSATAATVPPAAPAGEGGPPAPPNLTSNRRLLQQTQAQVDEVVDIMRVNVD  
KVLERDQKLSELDDRADALQAGASQFETSAAKLRKYWWKNLKMIIIILGVICAIILIII  
VYFST (SEQ ID NO:8)
```

Secuencia de proteína Vamp2 humano (SEQ ID NO: 9):

15

```
MSATAATAPPAAPAGEGGPPAPPNLTSNRRLLQQTQAQVDEVVDIMRVNVD  
KVLERDQKLSELDDRADALQAGASQFETSAAKLRKYWWKNLKMIIIILGVICAIILIII  
VYFST (SEQ ID NO:9)
```

20

Por supuesto, hay que señalar que las secuencias anteriores simplemente sirven como ejemplos para las secuencias a partir de las cuales se pueden obtener el dominio transmembrana y las secuencias de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT. Por lo tanto, también se observa que también se contemplan numerosas secuencias alternativas distintas de sinaptobrevina particularmente si pueden ser escindidas por una de origen natural o sintética o diseñada de BoNT, incluyendo SNAP-25 y formas mutantes de la misma.

25

Además, debe apreciarse que uno o más del dominio transmembrana, la primera y segunda proteínas fluorescentes, y el dominio de reconocimiento y escisión de proteasa BoNT se pueden trincar al tiempo que conserva la función correspondiente (es decir, anclar la transmembrana, fluorescencia, reconocimiento y escisión de proteasa BoNT). Por otra parte, se debe apreciar que uno o más aminoácidos de los elementos anteriores pueden ser eliminados o sustituidos por uno o más aminoácidos, típicamente de una manera conservada.

30

Por otra parte, especialmente se contempla que los aminoácidos adicionales se puedan añadir como espaciadores entre uno o más del dominio transmembrana, la primera y segunda proteínas fluorescentes, y el dominio de reconocimiento y escisión de proteasa BoNT. Tales espaciadores se pueden incluir para proporcionar más flexibilidad estérica, aumentar la distancia entre los elementos, etc. Típicamente, los espaciadores adecuados tendrán una longitud de entre 1 a 100 aminoácidos, más típicamente entre 2 a 50 aminoácidos, y más típicamente entre 3 a 12 aminoácidos. Cuando se usa la proteína recombinante para los ensayos FRET, en general, se prefieren separadores más cortos. Todavía más, se observa que los dominios adicionales pueden proporcionarse para impartir las funciones más deseadas. Por ejemplo, dominios adicionales adecuados incluyen etiquetas de afinidad para facilitar el aislamiento o etiquetado a base de anticuerpos, el tráfico de células para dirigir la proteína recombinante en un compartimento deseado, etc.

40

Con respecto a las células transfectadas que expresan la proteína híbrida en general se prefiere que la célula se transfecte de forma estable. Sin embargo, también se contempla la transfección transitoria. Hay numerosas estructuras promotora conocidas en la técnica, y todas ellas generalmente se consideran adecuadas para su uso en el presente documento. Sin embargo, se prefiere especialmente que la expresión sea inducible del promotor. En otros aspectos contemplados, la expresión también puede ser constitutivamente. La figura 3A representa un ejemplo de mapa vector para una construcción de expresión de una proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D, y la figura 3B representa un ejemplo de mapa vector para la expresión de dos proteínas híbridas que tienen una estructura de A-C-B y A-C-D, respectivamente.

50

Las células particularmente preferidas para la transfección incluyen células neuronales (por ejemplo, astrocitos, células gliales, dendrocitos, etc.) y las células madre (por ejemplo, pluripotentes para adultos, o capa de línea germinal de adultos, o progenitoras adultas). Sin embargo, también se contemplan en el presente documento numerosas otras células no neuronales, incluyendo las células bacterianas humanas, de roedor, células de insectos, e incluso la levadura y.

Consecuentemente, los inventores contemplan un método basado en células de medición de la actividad proteasa de una proteasa BoNT en la que en un solo paso se proporciona una célula transfectada que produce (i) una proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D o (ii) dos proteínas híbridas que tienen una estructura de A-C-B y A-C-D, respectivamente, en donde A es un dominio transmembrana, B es una primera proteína fluorescente, C es una secuencia de reconocimiento y escisión de BoNT, y D es una segunda proteína fluorescente. En ejemplos de aspectos de la materia objeto de la invención, la proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D tiene una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:2, que está codificada preferiblemente por un ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:1. Cuando las proteínas híbridas tienen una estructura de A-C-B y A-C-D, las secuencias de la proteína serán preferentemente como se muestra en SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6, que se codifican preferiblemente por un ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5, respectivamente. Por supuesto, y como ya se ha señalado anteriormente, todas las formas mutantes de las secuencias anteriores también se contemplan expresamente en este documento, siempre que tales formas mutantes retengan las funciones respectivas como se señaló anteriormente. En otro paso, la célula transfectada se pone en contacto con una proteasa BoNT en condiciones que permite que la célula tome la proteasa BoNT, y, en otro paso, la fluorescencia se mide a partir de al menos una de las primera y segunda proteínas fluorescentes en la célula transfectada.

Dependiendo de los requisitos y condiciones particulares, se pueden realizar ensayos basados en células contempladas como se representa en figura 2A en la que la proteína híbrida es una única cadena de polipéptido que tiene un dominio de transmembrana N-terminal, seguido de un CFP, que es a su vez seguido de una secuencia de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT, que es a su vez seguido de un YFP (preferiblemente terminal). La expresión de la proteína híbrida y la posterior translocación de la proteína híbrida a la membrana de una vesícula intracelular resultará en la presentación de la proteína híbrida en el exterior de la vesícula. La actividad proteasa de BoNT/B a continuación, escindirán intracelularmente la secuencia de escisión, liberando así la YFP de la proteína híbrida. Por consiguiente, se reduce el enfriamiento y la fluorescencia de la YFP es detectable en forma difusa a partir de la célula.

Alternativamente, como se muestra en figura 2B, dos proteínas híbridas separadas se forman en la célula, teniendo cada una un dominio de transmembrana N-terminal, seguido de la secuencia de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT, que es a su vez seguido de un YFP y CFP (preferiblemente terminales), respectivamente. La expresión de las proteínas híbridas y la posterior translocación de las proteínas híbridas a la membrana de una vesícula intracelular resultará en la presentación de las proteínas híbridas en el exterior de la vesícula. La actividad de la proteasa de la BoNT/B entonces escinde intracelularmente las secuencias de escisión, liberando así YFP y CFP de la proteína híbrida. Por consiguiente, el enfriamiento se reduce y la fluorescencia de la YFP y CFP es detectable en forma difusa a partir de la célula. Sorprendentemente, las respectivas proteínas híbridas se sitúan en la membrana vesicular de tal manera que permiten el FRET. Ejemplos de resultados para tales ensayos se muestran en las microfotografías de fluorescencia calculadas de la figura 4A y las correspondientes representaciones del gráfico de barras de la figura 4B. Como fácilmente se puede inferir de estas figuras, el ensayo FRET se funcionó bien en el ensayo de FRET intermolecular y menos satisfactoriamente en el ensayo de FRET intramolecular. Sin embargo, se espera que la experimentación de rutina también proporcione resultados satisfactorios del ensayo FRET intramolecular.

Ejemplos

Clonación de la construcción intramolecular

La construcción intramolecular FRET, pMD0031 (figura 3A), fue construida en pEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA). Tres fragmentos de ADN un fragmento N-terminal de ratón Vamp2 desde el principio del ácido 92 amino, de longitud completa YFP sin un codón de parada, y un fragmento C-terminal de ratón Vamp2 desde el aminoácido 93 al tope fueron amplificados por la reacción en cadena de polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Un sitio de restricción EcoRI fue diseñado en el extremo 5' del fragmento Vamp2 N-terminal y un enlazador SerGlyGly (TCGGGAGGC) y los primeros 12 nucleótidos de la YFP fueron diseñados en el extremo 3'. El fragmento de YFP tenía los últimos 13 nucleótidos del fragmento de Vamp2 N-terminal y el mismo enlazador SerGlyGly como el fragmento N-terminal Vamp2 diseñado en el extremo 5' y un segundo enlazador SerGlyGly (AGCGGCGGT) y los 9 primeros nucleótidos del fragmento C-terminal Vamp2 diseñado en el extremo 3'. El fragmento C-terminal Vamp2 tenía los últimos 12 nucleótidos de YFP continuos y el mismo enlazador SerGlyGly como el fragmento YFP diseñado en el extremo 5' y un sitio de restricción BamHI de diseñado en el extremo 3'.

Estos tres fragmentos se combinaron a continuación, utilizando la extensión de empalme de solapamiento (SOE) PCR para crear un único fragmento que consiste en un sitio de restricción EcoRI, el fragmento N-terminal de Vamp2 de ratón (aminoácidos 1-92), un enlazador SerGlyGly, YFP continuo, un segundo enlazador SerGlyGly, el fragmento C-terminal de Vamp2 de ratón (aminoácidos 93-tope) y un sitio de restricción BamHI. Este fragmento y el pEGFP-C1 fueron digeridos con EcoRI y BamHI, se ligaron juntos, y se transformaron en DH5 α de *E. coli*. El inserto de construcción final fue entonces completamente secuenciado.

Clonación de la construcción intramolecular

5 La construcción intramolecular FRET, pMD0034 (figura 3B), fue construida en pBudCE4.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La fusión del YFP de ratón Vamp2 se generó mediante la amplificación de dos fragmentos por PCR. El primer fragmento era YFP sin una parada con un sitio de diseño de restricción HindIII en el extremo 5' y un enlazador SerGlyGly (AGTGGAGGC) y los primeros 9 nucleótidos de Vamp2 de ratón diseñado en el extremo 3'. El segundo fragmento era de longitud completa de Vamp2 de ratón con los últimos 9 nucleótidos de YFP y el mismo enlazador SerGlyGly diseñado en el extremo 5' y un sitio de restricción XbaI diseñado en el extremo 3'. Estos dos fragmentos se combinaron a continuación, utilizando PCR SOE para crear un fragmento, SerGlyGly enlazador, Vamp2 de longitud completa YFP. El fragmento y pBudCE4.1 fueron entonces digeridos con HindIII y XbaI, y ligados juntos, y se transformaron en DH5 α *E. coli*. La fusión CFP de Vamp2 de ratón se ha creado de manera similar pero contenía una CFP sin una parada, un sitio de restricción NotI en el extremo 5' y un sitio KpnI en el extremo 3'. La construcción final fue entonces completamente secuenciada.

Cultivo de células y ensayo de FRET

20 Análisis de los indicadores de la eficiencia FRET, coeficientes de fluorescencia YFP/CFP, y sensibilidad de BoNT/B se realizaron con células in vitro. Más específicamente, se cultivaron células Neuro2A en una placa de 96 pocillos a 70% de confluencia (~2000 células/pocillo) y se transfectaron de forma transitoria usando *Lipofectamine 2000* (Invitrogen), con indicadores BoNT/B intra o intermoleculares. Después de 24 horas, las células se incubaron en presencia o ausencia de 25 nM de BoNT/B a 37°C durante 72 horas en 100 μ l de fenol MEM libre de rojo.

25 Se realizaron mediciones semiautomático o totales de fluorescencia FRET o YFP y CFP utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon TE2000-U con un aumento de 200x y software Nikon NIS elements 3.4. Para las mediciones de FRET, se calcularon los coeficientes -A y -B (aceptor y donante) en 0,03 y 0,73 respectivamente, usando un método específico de purga a través. La figura 4A representa campos seleccionados al azar pseudo-coloreados para la eficiencia de FRET o la relación de fluorescencia YFP/CFP. Los coeficientes de YFP/CFP se calcularon a partir de las emisiones recogidas tras la excitación directa de cada fluoróforo. Como puede verse a partir de la representación gráfica en la figura 4B, el indicador del enfoque intermolecular BoNT/B fue significativamente más sensible para la detección de BoNT/B en las células vivas. Se analizaron 30 células seleccionadas al azar por condición para la eficiencia de FRET (figura 4A, paneles de la izquierda) o coeficientes de fluorescencia YFP/CFP (figura 4A, paneles de la derecha) en presencia o ausencia de 25 nM de BoNT/B. En efecto, estos resultados fueron completamente inesperados dado que el FRET intermolecular eficaz no sólo necesitó expresión equilibrada de las dos proteínas fluorescentes, sino que también de la co-localización de las proteínas recombinantes en cantidades correspondientes. Se muestra la señal media de las 30 células de 5 campos microscópicos en 3 pozos diferentes. Se excluyeron células que muestran fluorescencia sobresaturada.

40 Así, se han descrito realizaciones y aplicaciones de los ensayos de BoNT específicos. Sin embargo, debe ser evidente, para los expertos en la técnica que son posibles muchas más modificaciones además de las ya descritas sin apartarse de los conceptos inventivos de este documento.

45 LISTADO DE SECUENCIAS

[0042]
 <110> BioSentinel, Inc.
 50 <120> Ensayo de transferencia de energía de resonancia con un resto de sustrato de sinaptobrevina
 <130> 101666.0006PCT
 55 <150> US 61/252315
 <151> 2009-10-16
 <160> 9
 60 Versión <170> PatentIn 3.4
 <210> 1
 <211> 1839
 <212> DNA
 65 <213> Artificial

ES 2 576 747 T3

<220>
 <223> Secuencia codificadora recombinante para pMD0031

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) ..(717)
 <223> Proteína fluorescente cian mejorada

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (718) ..(753)
 <223> Enlazador

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (754) ..(1017)
 <223> Porción N-terminal de VAMP2 incluyendo todos los sitios de escisión y sin dominio transmembrana

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1018) ..(1026)
 <223> SGG Enlazador

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1027) ..(1743)
 <223> Proteína Fluorescente Amarilla

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1744) ..(1752)
 <223> SGG Enlazador

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1753) ..(1839)
 <223> Porción N-terminal de VAMP2 incluyendo dominio transmembrana y sin sitios de escisión

40 <400> 1

```

atggtgagca agggcagaga gctgttcaac gggatggtgc ccctctggt agagctggac   60
ggcgaagtas acggccaca gttcagcgtg tcggcgagg gcaagggga tgcaccctac   120
ggcaagctga ccctgaagt cctctgcacc acggccagg tcctcgtgcc ctggccacc   180
ctcgtgacca ccctgacctg gggcgtgcaq tctttcagcc cctaccoga ccacatgaag   240
cagcaagact tcttcaagtc agccatgcc gaaggctaag tcagggagcg caccatcttc   300
ttcaaggagc acggcaacta caagaccctg gctgaggta agttcaggg agacaccctg   360
gtgaaccgca tcgagctga gggcatogac ttcaaggagg aggcaacat ctgggggac   420
aaqctggagt acaactacat cagccacaac gtctatatca ccgcgcaca gcagaagaa   480
ggcctcaagg ccaactcaâ gatccgcaac ââcatcgagg acggaagct gcaqctcgc   540
gaaccctacc agcagaacc cccatcggc gacggccccg tctctctgcc agaccaacc   600
  
```

ES 2 576 747 T3

Tacttgagaa cccagctccg cctgagcaaa gaaccccaacg agaagcgcga tcaatgggc 660
 ctgctggagt tctgagccgc cgcaggatc actctcggca tggagcagct gtacaagtc 770
 ggactcagat ctogagctca agcttcgaat tetatgtcgg ctaccgctgc caacgtccg 780
 cctgcgcgc cggcaggcga gggctggccc cctgcaactc cccccaaatc taacagtaac 840
 aggagactgc agcagaccca ggcaccagtg gatgaggtgg tggacatcat gagggtgat 900
 gtgagcaagg tcttggagcg ggcaccagaag ctatcggaac tggatgatcg cgcagatgc 960
 ctccaggcag gggcctccc gtttcaaac aqtgcagcca agctcaagcg caaatctcg 1020
 ggaggcatgg tgagcaaggg cagagagctg ttaaccgggg tgggcccac cctggctcag 1080
 ctggacggcg acgtaaacg ccacaggtc agcgtgtcgg ggcagggcga gggcagatgc 1140
 acctacggca agctgaccc taaagttaic tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgcctcgg 1200
 cccaccctcg tgaccacct tggctacggc ctgcagtgct tgcaccgcta cccgaccac 1260
 atgagcagc agcactctt caagtcggc atgcaccag gctacgtcca ggcagcacc 1320
 atctctctca aggacgagc caactcaag acccggcgc aggtgaaagt cagggcagc 1380
 accctggtg accgcctcga gctgaaggc ctgacttca aggggagcgc caacctctg 1440
 gggcacaagc tggagtaca ctacaaccg caccaagctc atatcatggc cagacaagcag 1500
 aagcaccgac tcaaggtga cttcaagtc cgcaccaca tggaggagc cagcgtgag 1560
 ctgcgcgac actaccagca gaacaacct atggggcag gcccctgct gctgccagc 1620
 aaccactacc tggcttaca gtcggcctg agcaaaagcc ccaacgagaa ggcgcatc 1680
 atggtcctgc tggagttcgt gcccgcgcc gggatcctc tggcctagg cggctgtac 1740
 aagagcggcg gttggtgga saacctcaag atgatgata tcttgggagt gattcggcc 1800
 atcactctca tcatcatcat cgtttacttc agcactta 1839

5 <210> 2
 <211> 612
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Proteína recombinante codificada por pMD0031

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) ..(239)
 <223> Proteína Fluorescente Cian Mejorada

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (240) ..(251)
 <223> Enlazador

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (252) ..(339)
 <223> Porción N-terminal de VAMP2 incluyendo todos los sitios de escisión y sin dominio transmembrana
 <220>

ES 2 576 747 T3

- <221> MISC_FEATURE
- <222> (340) ..(342)
- <223> SGG Enlazador

- 5 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (343) ..(581)
- <223> Porción Proteína Fluorescente Amarilla

- 10 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (582) ..(584)
- <223> SGG Enlazador

- 15 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (585) ..(612)
- <223> Porción C-terminal de VAMP2 incluyendo dominio transmembrana y sin sitios de escisión

- 20 <400> 2

```

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1      5      10      15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20     25     30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35     40     45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Phe Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50     55     60

Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65     70     75     80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85     90     95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100    105    110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Ser Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115    120    125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130    135    140

```

ES 2 576 747 T3

Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser
 225 230 235 240

Gly Leu Arg Ser Arg Ala Gln Ala Ser Asn Ser Met Ser Ala Thr Ala
 245 250 255

Ala Thr Val Pro Pro Ala Ala Pro Ala Gly Glu Gly Gly Pro Pro Ala
 260 265 270

Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu Gln Gln Thr Gln Ala
 275 280 285

Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val Asn Val Asp Lys Val
 290 295 300

Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg Ala Asp Ala
 305 310 315 320

Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser Ala Ala Lys Leu Lys
 325 330 335

Arg Lys Tyr Ser Gly Gly Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr
 340 345 350

Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His
 355 360 365

Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys
 370 375 380

Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp
 385 390 395 400

ES 2 576 747 T3

Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg
 405 410 415

Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro
 420 425 430

Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn
 435 440 445

Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn
 450 455 460

Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Gln Asp Gly Asn Ile Leu
 465 470 475 480

Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met
 485 490 495

Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His
 500 505 510

Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn
 515 520 525

Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu
 530 535 540

Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His
 545 550 555 560

Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met
 565 570 575

Asp Glu Leu Tyr Lys Ser Gly Gly Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met Met
 580 585 590

Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val
 595 600 605

Tyr Phe Ser Thr
 610

5

<210> 3
 <211> 1077
 <212> DNA
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de codificación recombinante para construcción intermolecular con YFP

15

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 576 747 T3

<222> (1) ..(717)
 <223> Proteína Fluorescente Amarilla

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (718) ..(726)
 <223> SGG Enlazador

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (727) ..(1077)
 <223> Sitios VAMP2 de longitud completa con dominios transmembrana y de escisión

15 <400> 3

```

atggtgagca agggcgaggg gctgttcaacc ggggtggtgc ccatactggt cgggctggac   60
ggcgacqtda agggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgaggggga tgccacctac   120
ggcaagctga ccttgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgctgc ctggcccacc   180
ctggtgacca ccttcggcta gggcctgcag tgcctcgccc gctaccocga ccacatgaag   240
cagccagact tcttcaagtc agccatgcgc gaaggctacg tccaggagcg taccatcttc   300
ttcaaggagc agggcaacta caagaccgcg gcccagggtg agttcgaggg cgcaccctg   360
gtgaaccgca tccgctgaa gggatcgac ttcaaggagg accgcaacat cctggggcac   420
aagctggagt acaactacaa cagccaaac gctctatata tggccgacaa gcagaagaac   480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg accgcagcgt gacgctcgcc   540
gaccactccc agcagaacc cccatcgcc gaggccccc tgcctgctgc cgcacaacc   600
taoctgagct accagtcgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgga tccatggtc   660
ctgctggagt tctgtaecgc cggcgggac actctcgga tggagagct gtacaagagt   720
ggagcctgt ggcctaccgc tgcaccctc cgcctcgcc ccccgcccg cggggctgc   780
cccctgcac ctctccaa tcttaccgt aacaggagc tgcagcagc ccaggcccag   840
gtgatgagg tggfagcat cctgaggtg eatgtggcc aggtcctgga gcgagaccg   900
aagctatcgg aactggatga tgcgcagat gccctccag caggggcctc ccagtttga   960
acaagtcag ccaagctcaa gcgcaaatc tggtagaaa cctcaagat gatgatcctc  1020
ttgggagtga ttgcgcac catctcctc atcatcatg titacttcag cacttaa   1077
  
```

20 <210> 4
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Proteína recombinante codificada por pMD0034 YFP

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) ..(239)
 <223> Proteína Fluorescente Amarilla

<220>

ES 2 576 747 T3

<221> MISC_FEATURE
 <222> (240)..(242)
 <223> SGG Enlazador

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (243)..(358)
 <223> Sitios VAMP2 de longitud completa con dominios transmembrana y de escisión

10 <400> 4

```

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1          5          10          15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20        25        30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35        40        45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50        55        60

Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65        70        75        80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85        90        95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Gln
100       105       110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115       120       125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130       135       140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145       150       155       160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165       170       175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180       185       190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu
195       200       205
  
```

ES 2 576 747 T3

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Val Pro Pro Ala Ala Pro Ala
 245 250 255

Gly Glu Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg
 260 265 270

Arg Leu Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met
 275 280 285

Arg Val Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu
 290 295 300

Leu Asp Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu
 305 310 315 320

Thr Ser Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys
 325 330 335

Met Met Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile
 340 345 350

Ile Val Tyr Phe Ser Thr
 355

- 5 <210> 5
- <211> 1077
- <212> DNA
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Secuencia codificante recombinante para construcción intermolecular con ECFP
- <220>
- 15 <221> misc_feature
- <222> (1)..(717)
- <223> Proteína Fluorescente Cian Mejorada
- <220>
- 20 <221> misc_feature
- <222> (718)..(726)
- <223> SGG Enlazador
- <220>
- <221> misc_feature
- 25 <222> (727)..(1077)
- <223> Sitios VAMP2 de longitud completa con dominios transmembrana y de escisión
- <400> 5

ES 2 576 747 T3

```

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccctcctggt cgagctggac    60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac    120
ggcaagctga ccttgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc    180
ctogtgacca ccttgacctg gggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag    240
cagcaagact tcttcaagtc cggcatgcc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc    300
ttcaaggaag acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttogaggg cgacaccctg    360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac    420

aagctggagt acaactacat cagccacaac gtctatatca ccgcgacaa gcagaagaac    480
ggcatcaagg ccaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc    540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggcccgc tgctgctgcc cgacaaccac    600
tacctgagca cccagtcgc cctgagcaaa gaccccacg agaagcgcg tcacatggtc    660
ctgctggagt tcgtgacgc cgcggggtc actctcgga tggacgagct gtacaagagt    720
ggaggcattg cggctacgc tgccaccgtc ccgcctgccc ccccggccgg cgaggggtgc    780
ccccctgac ctctccaaa tcttaccagt aacaggagac tgcagcagac ccaggcccag    840
gtggatgagg tgggtgacat catgagggtg aatgtggaca aggtcctgga gcgagaccag    900
aagctatcgg aactggatga tcgcgcagat gccctccagg caggggcctc ccagttttaa    960
acaagtgacg ccaagctcaa gcgcaaatc tggtgaaaa acctcaagat gatgatcctc   1020
ttgggagtga ttgcgccat cctctcctc atcctcctc tttacttcag cacttaa    1077

```

- 5 <210> 6
<211> 358
<212> PRT
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> Proteína Recombinante Codificada por pMD0034 ECFP
- <220>
<221> MISC_FEATURE
- 15 <222> (1) ..(239)
<223> Proteína Fluorescente Cian Mejorada
- <220>
<221> MISC_FEATURE
- 20 <222> (140) ..(242)
<223> SGG Enlazador
- <220>
<221> MISC_FEATURE
- 25 <222> (243) ..(358)
<223> Sitios VAMP2 de longitud completa con dominios transmembrana y de escisión
- <400> 6

ES 2 576 747 T3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Gln Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Gly Tyr
 130 135 140

Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Gln Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser
 225 230 235 240

ES 2 576 747 T3

Gly Gly Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Val Pro Pro Ala Ala Pro Ala
 245 250 255

Gly Glu Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg
 260 265 270

Arg Leu Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Gln Val Val Asp Ile Met
 275 280 285

Arg Val Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu
 290 295 300

Leu Asp Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu
 305 310 315 320

Thr Ser Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys
 325 330 335

Met Met Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile
 340 345 350

Ile Val Tyr Phe Ser Thr
 355

- 5 <210> 7
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> Rattus norvegicus

- 10 <400> 7

Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Val Pro Pro Ala Ala Pro Ala Gly Gln
 1 5 10 15

Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu
 20 25 30

Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Gln Val Val Asp Ile Met Arg Val
 35 40 45

Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp
 50 55 60

ES 2 576 747 T3

Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser
 65 70 75 80

Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met Met
 85 90 95

Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val
 100 105 110

Tyr Phe Ser Thr
 115

- 5 <210> 8
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

- 10 <400> 8

Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Val Pro Pro Ala Ala Pro Ala Gly Glu
 1 5 10 15

Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu
 20 25 30

Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val
 35 40 45

Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp
 50 55 60

Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser
 65 70 75 80

Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met Met
 85 90 95

Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val
 100 105 110

Tyr Phe Ser Thr
 115

- 15 <210> 9
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 576 747 T3

Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Ala Pro Pro Ala Ala Pro Ala Gly Glu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu
20 25 30

Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val
35 40 45

Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp
50 55 60

Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser
65 70 75 80

Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met Met
85 90 95

Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val
100 105 110

Tyr Phe Ser Thr
115

Reivindicaciones

1. Procedimiento basado en células de medición de la actividad proteasa de una proteasa BoNT, que comprende:
 - 5 proporcionar una célula transfectada que produce (I) una proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D o (II) dos proteínas híbridas que tienen una estructura de A-C-B y A-C-D, respectivamente; en la que A es un dominio transmembrana que no es escindible por la proteasa BoNT y que inserta a través de una membrana lipídica de forma tal que B, C y D se encuentran en el mismo lado de la membrana lipídica, B es una primera proteína fluorescente, C es una secuencia de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT y D es una segunda proteína fluorescente;
 - 10 poner en contacto la célula transfectada con una proteasa BoNT en condiciones que permiten a la célula tomar la proteasa BoNT; y medir la fluorescencia de al menos una de las primera y segunda proteínas fluorescentes en la célula transfectada.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1 en la que A comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste de sinaptobrevina, sinaptofisina, sinapsina I, sinapsina II, y III sinapsina.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que C comprende al menos dos de un sustrato de BoNT/B, de BoNT/G, de BoNT/D, y de BoNT/F de una secuencia de reconocimiento y de escisión de proteasa.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 en la que A y C son porciones de sinaptobrevina.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que un péptido enlazador está dispuesto entre al menos uno de A y C, A y B, C y B, y C y D, y en el que el enlazador tiene una longitud igual o menor que 12 aminoácidos.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende además una etapa para poner en contacto la célula transfectada con un inhibidor putativo BoNT antes de la etapa que pone en contacto la célula transfectada con la proteasa BoNT.
- 30 7. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la célula transfectada produce las dos proteínas híbridas.
8. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la proteína híbrida que tiene la estructura de A-B-C-D tiene una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:2, o en el que la proteína híbrida que tiene la estructura de A-C-B tiene una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:4, y en el que la proteína híbrida que tiene la estructura de la A-C-B tiene una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:6.
- 35 9. Ácido nucleico recombinante que comprende:
 - 40 una secuencia que codifica (I) una proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D o (II) dos proteínas híbridas que tienen una estructura de A-C-B y A-C-D, respectivamente; en la que A es un dominio transmembrana que no es escindible por la proteasa BoNT y que se inserta a través de una membrana lipídica de forma que B, C y D se encuentran en el mismo lado de la membrana lipídica, B es una primera proteína fluorescente, C es una secuencia de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT, y D es una segunda proteína fluorescente.
 - 45
- 50 10. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 9 en el que A comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste de sinaptobrevina, sinaptofisina, sinapsina I, sinapsina II, y III sinapsina.
- 55 11. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 9, en el que C comprende al menos dos de un sustrato de BoNT/B, de BoNT/G, de BoNT/D, y de BoNT/F de una secuencia de reconocimiento y de escisión de proteasa.
12. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 9 en la que A y C son porciones de sinaptobrevina.
13. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 9 que comprende además al menos una secuencia adicional que codifica un péptido enlazador que está dispuesto entre al menos uno de A y C, A y B, C y B, y C y D, y en el que el enlazador tiene una longitud de igual o menos de 12 aminoácidos.
- 60 14. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 9 en el que la secuencia codifica las dos proteínas híbridas.
15. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 9 en el que la proteína híbrida que tiene la estructura de A-B-C-D está codificada por una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:1, o en el que la proteína híbrida que tiene la estructura de A-C-B está codificada por una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:3, y en el que la proteína híbrida que tiene la estructura de A-C-B está codificada por una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:5.
- 65

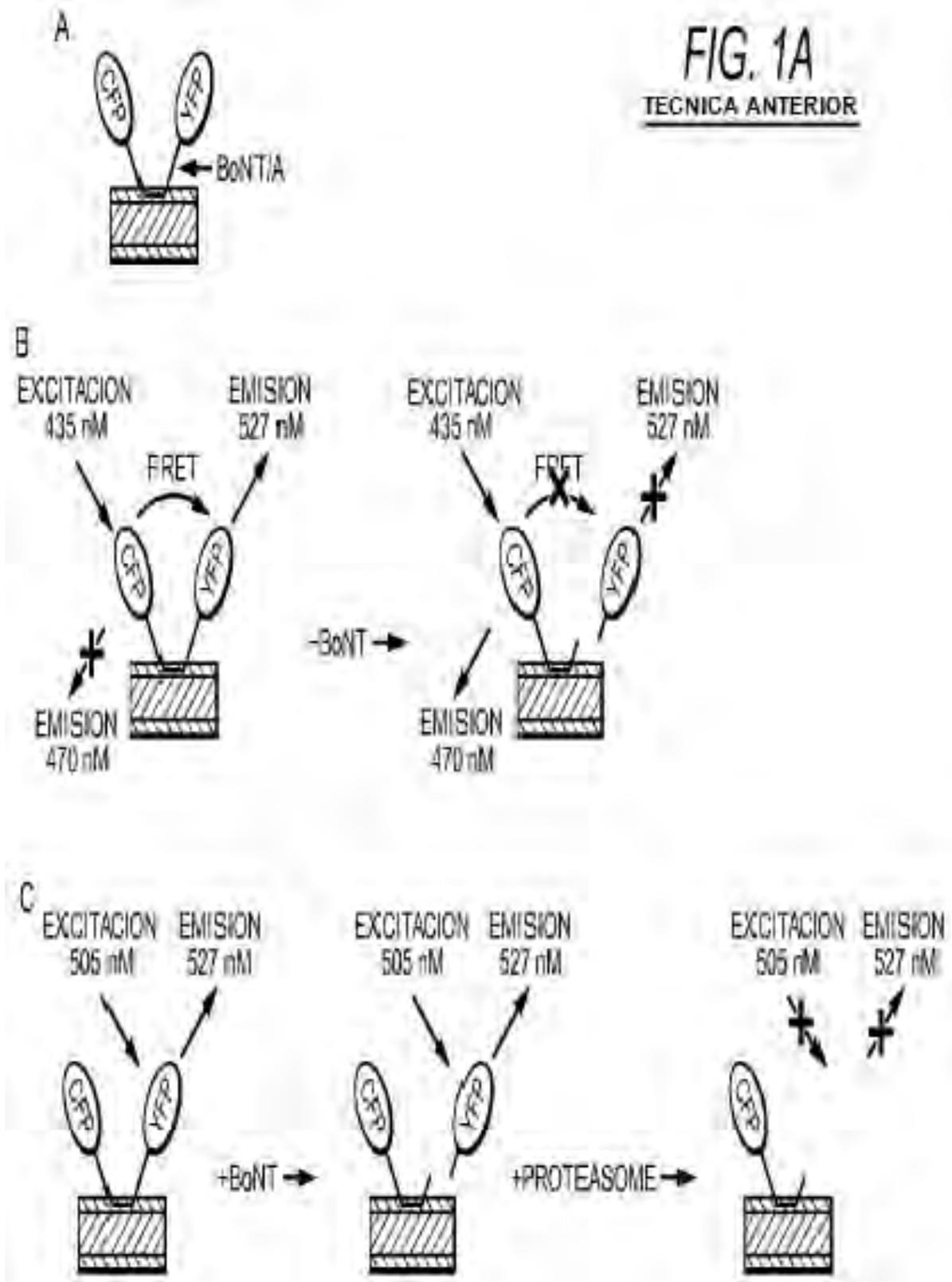


FIG. 1B
TECNICA ANTERIOR

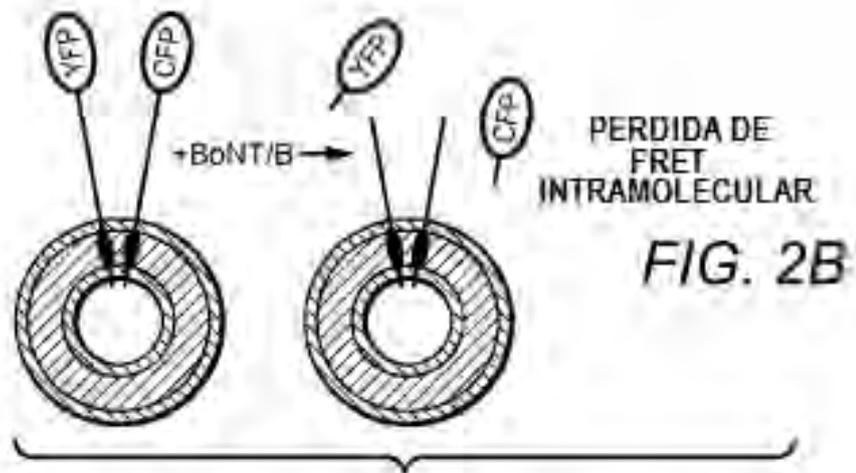
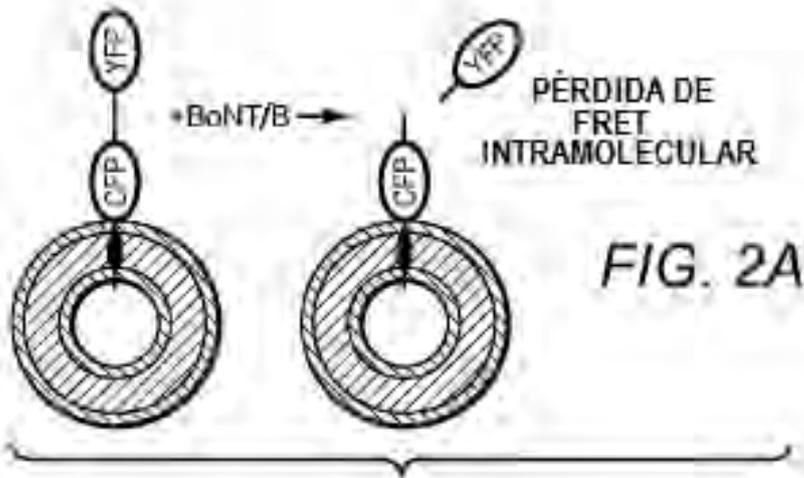
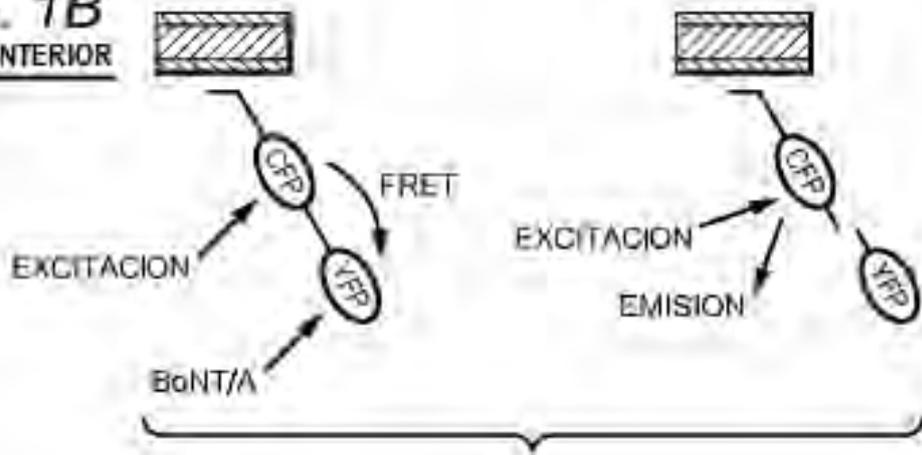


FIG. 3A

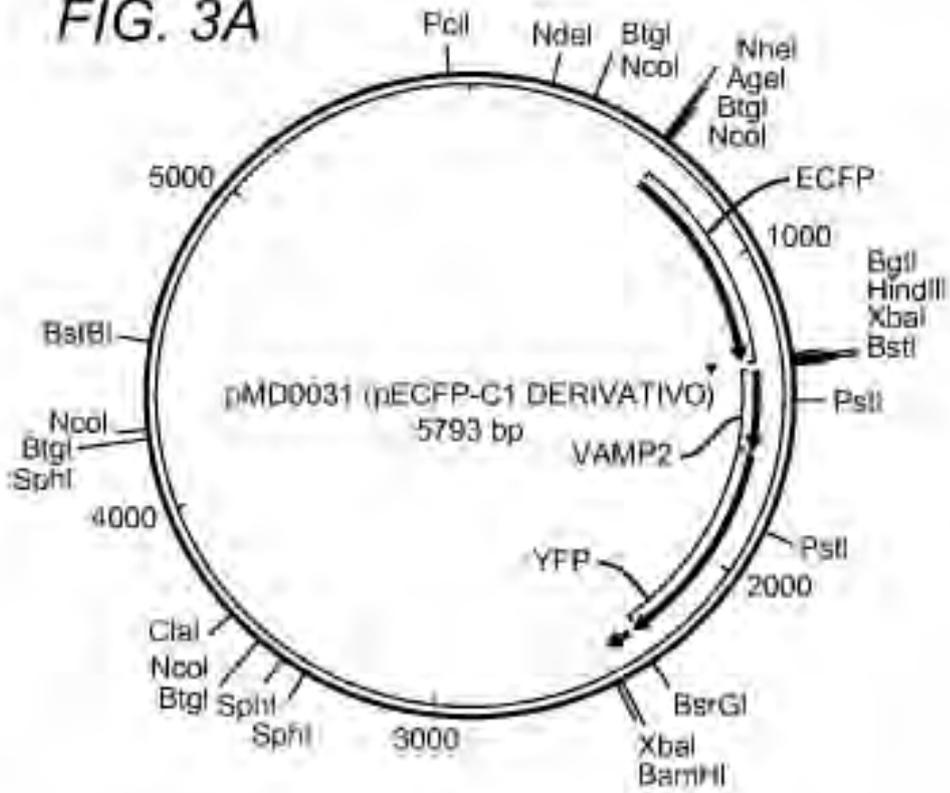


FIG. 3B

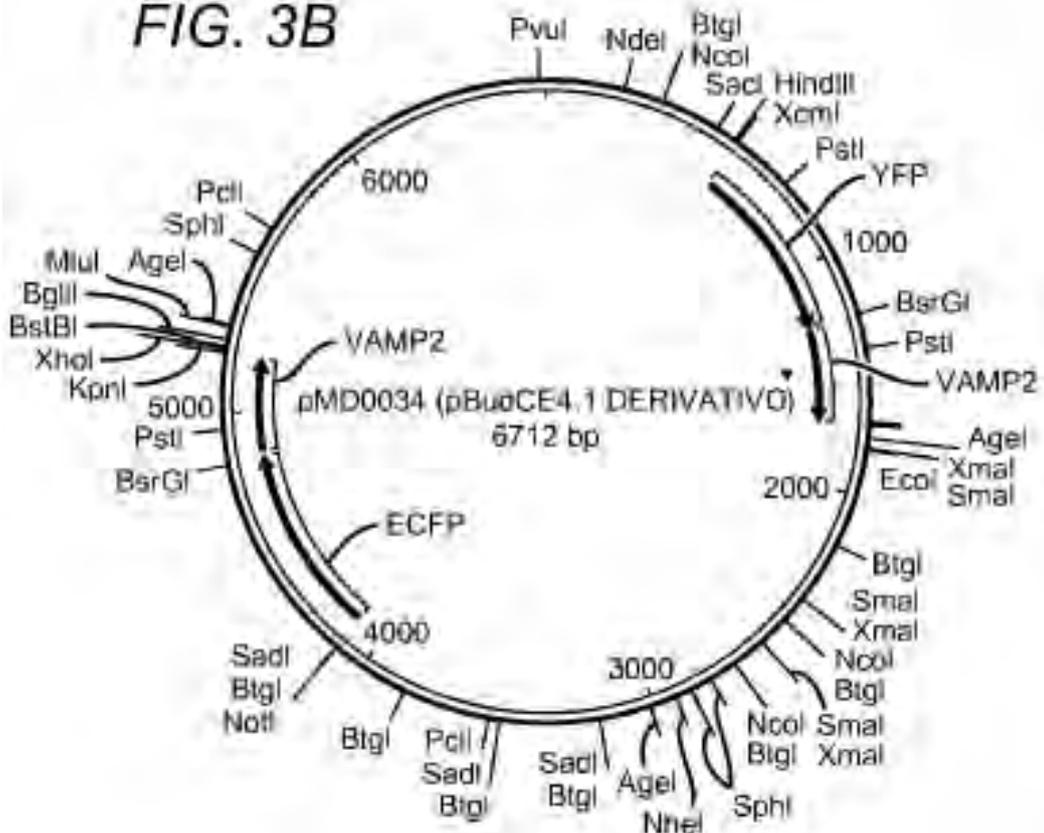


FIG. 4A

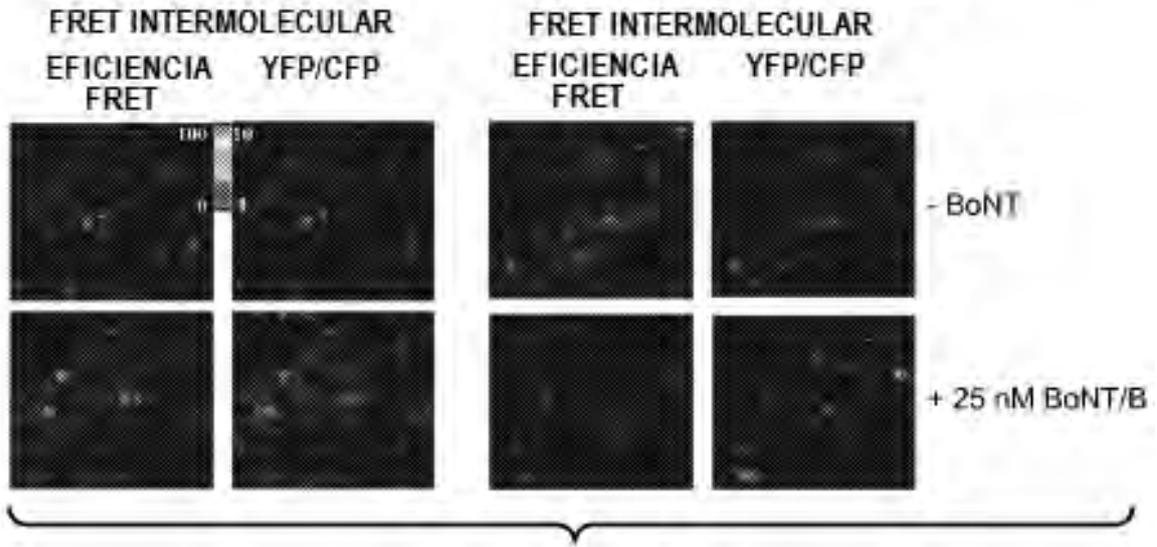


FIG. 4B

