

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 314**

51 Int. Cl.:

C07K 14/33 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2009 PCT/EP2009/006272**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.03.2010 WO10022979**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2009 E 09778201 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2337790**

54 Título: **Neurotoxinas clostridiales con persistencia modificada**

30 Prioridad:

29.08.2008 EP 08015287
29.08.2008 US 190558 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FREVERT, JUERGEN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 592 314 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

Neurotoxinas clostridiales con persistencia modificada

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a neurotoxinas clostridiales, por ejemplo, neurotoxinas botulínicas, que están alteradas con respecto a su estructura proteica en comparación con las correspondientes neurotoxinas de tipo natural. Dicha diferencia en la estructura proteica da como resultado, entre otros, un periodo de actividad cambiado temporalmente, por ejemplo, una persistencia o actividad prolongada.

Antecedentes de la invención

15 Quimiodenervación se refiere al uso de un agente para impedir que un nervio estimule su tejido diana, por ejemplo, un músculo, una glándula u otro nervio. La quimiodenervación se realiza, por ejemplo, con fenol, alcohol etílico o toxina botulínica. La quimiodenervación es adecuada, por ejemplo, en pacientes con espasticidad localizada en uno o dos músculos grandes o varios músculos pequeños. Puede usarse para aliviar síntomas tales como espasmo muscular y dolor, e hiperreflexia.

20 Los agentes quimiodenervantes bloquean la transmisión neuromuscular en la unión neuromuscular, causando parálisis o paresia de los músculos esqueléticos afectados. El término "paresia" se define a continuación en el presente documento como un estado caracterizado por pérdida de movimiento parcial o movimiento afectado. Esto se consigue o bien actuando presinápticamente a través de la inhibición de la síntesis o liberación de acetilcolina (ACo), o bien actuando postsinápticamente en el receptor de acetilcolina. Ejemplos de fármacos que actúan presinápticamente son toxina botulínica, tetrodotoxina y toxina tetánica.

30 El término "quimiodenervación" también abarca los efectos que se inducen directa o indirectamente por el agente quimiodenervante, comprendiendo por tanto también efectos anteriores, posteriores o a largo plazo de dicho agente quimiodenervante. Por tanto, se abarcan también efectos presinápticos así como efectos postsinápticos, efectos en el tejido y/o efectos indirectos a través de neuronas espinales o aferentes.

Un agente quimiodenervante, toxina botulínica, a pesar de ser uno de los compuestos más tóxicos conocidos hasta la fecha, se ha usado en el pasado para el tratamiento de un gran número de estados y trastornos, algunos de los cuales se describen en, por ejemplo, el documento PCT/EP2007/005754. Además, están disponibles formas comerciales de toxina botulínica tipo A basadas en el complejo de proteína de toxina botulínica A con el nombre comercial Botox® (Allergan Inc.) y con el nombre comercial Dysport (Ipsen® Ltd.), respectivamente. Una composición farmacéutica basada en una preparación de toxina más altamente purificada y que comprende el componente neurotóxico de toxina botulínica tipo A libre de proteínas complejantes en forma aislada está disponible comercialmente en Alemania de Merz Pharmaceuticals GmbH con el nombre comercial Xeomin®.

40 La bacteria Gram-positiva aerobia, *Clostridium botulinum*, produce una potente neurotoxina polipeptídica, toxina botulínica, que causa una enfermedad neuromuscular en seres humanos y animales denominada botulismo. Las esporas de *Clostridium botulinum* se encuentran en el suelo y pueden crecer en envases para alimentos indebidamente esterilizados y sellados de conservas domésticas, que son la causa de muchos de los casos de botulismo. La toxina botulínica A (BoNT/A) es el agente biológico natural más letal conocido por el hombre. Aproximadamente 50 picogramos de toxina botulínica (complejo de neurotoxina purificada) serotipo A es una DL₅₀ en ratones. Sin embargo, a pesar de sus efectos tóxicos, se han usado complejo de toxina botulínica así como la neurotoxina pura como agente terapéutico en un gran número de enfermedades.

50 Las toxinas botulínicas se liberan de cultivos de *Clostridium* lisados, generalmente en forma de una proteína responsable de las propiedades tóxicas de la toxina botulínica (el componente neurotóxico) en asociación con otras proteínas bacterianas (las "proteínas complejantes" no tóxicas o "proteínas clostridiales"), que juntas forman un complejo de toxina denominado también "complejo de toxina botulínica". El complejo de toxina botulínica es de naturaleza metaestable, dado que su estabilidad parece depender de diversos factores tales como, por ejemplo, concentración de sal y/o pH. El peso molecular del complejo puede variar desde aproximadamente 300.000 hasta aproximadamente 900.000 Da, es decir, desde 300 kDa hasta aproximadamente 900 kDa. Las proteínas complejantes son, por ejemplo, diversas hemaglutininas. Las proteínas de este complejo de toxina no son tóxicas por sí mismas pero se cree que proporcionan estabilidad al componente neurotóxico y son responsables de la toxicidad oral en intoxicaciones por *Botulinum*. Hay siete serotipos antigénicamente distintos de toxina botulínica, concretamente toxina botulínica A, B, C1, D, E, F y G. Siempre que se mencionen las toxinas botulínicas serotipo A, B, C1, D, E, F o G, también se abarcan variantes conocidas de los serotipos, como los serotipos A1, A2, A3, A4, etc.

65 El componente de las toxinas clostridiales responsable de su alta toxicidad es la proteína o componente neurotóxico (Mw ≈ 150kD, peso molecular exacto según el serotipo). Los varios serotipos diferentes difieren en su secuencia de aminoácidos, pero todos poseen una estructura parecida: una cadena ligera (LC) de aproximadamente 50 kDa y una cadena pesada (HC) de aproximadamente 100 kDa, que pueden unirse por uno o más enlaces disulfuro (para una

revisión véase, por ejemplo, Simpson LL, *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44:167-93). El componente neurotóxico del complejo de toxina botulínica se forma inicialmente como una única cadena de polipéptido. En el caso del serotipo A, por ejemplo, el procesamiento proteolítico del polipéptido da como resultado un polipéptido activado en forma de un polipéptido de cadena doble que consiste en una cadena pesada y una cadena ligera, que se unen por un enlace disulfuro. En seres humanos, la cadena pesada media en la unión a terminaciones nerviosas colinérgicas presinápticas e internalización de la toxina en la célula. Se cree que la cadena ligera es responsable de los efectos tóxicos, actuando como endopeptidasa de zinc y escindiendo proteínas específicas responsables de la fusión con la membrana (complejo SNARE) (véase, por ejemplo, Montecucco C., Shiuvo G., Rosetto O: The mechanism of action of tetanus and Botulinum neurotoxins. *Arch Toxicol.* 1996; 18 (Suppl.): 342-354).

El término "toxina botulínica" tal como se usa en toda la presente solicitud se refiere al componente neurotóxico desprovisto de cualquier otra proteína clostridial, pero también al "complejo de toxina botulínica". El término "toxina botulínica" se usa en el presente documento en casos en los que no es necesaria o deseada la discriminación entre el complejo de toxina y el componente neurotóxico. "BoNT" o "NT" son abreviaturas comunes usadas para neurotoxina botulínica o neurotoxina, respectivamente. La subunidad neurotóxica del complejo de toxina botulínica se denomina en este documento "componente neurotóxico" o el "componente neurotóxico libre de proteínas complejantes". La producción del componente neurotóxico de toxina botulínica tipo A y B se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional de patente WO 00/74703.

Los varios serotipos difieren en la duración de su efecto terapéutico: el periodo normal de actividad de fármacos de toxina botulínica A es, si se inyecta de forma intramuscular en seres humanos, de entre 3 y 4 meses. En casos individuales el periodo puede incluso extenderse hasta más de 12 meses. Durante el tratamiento de glándulas sudoríparas, se ha notificado una actividad de incluso 27 meses (Bushara K., *botulinum toxin and rhinorrhea*, *Otolaryngol. Head. Neck. Surg.*, 1996; 114(3):507 y *The Laryngoscope* 109: 1344 1346:1999). El periodo de actividad para la toxina botulínica tipo C1 es comparable con el periodo de actividad de la toxina botulínica A (Eleopra *et al.*, 1997 & 2002). Sorprendentemente, el periodo de acción es mucho más corto en roedores (por ejemplo, ratones) en comparación con seres humanos: aproximadamente 1-2 meses para la toxina botulínica A, 21 días para la toxina botulínica B y sólo 4 días para la toxina botulínica E (DePaiva *et al.*, 1999, Juradinski *et al.*, 2001).

Foran *et al.* analizaron en 2003 el periodo de tiempo de acción *in vitro* sobre neuronas del cerebelo de ratas y encontraron semitiempos de la inhibición de exocitosis de glutamato para la toxina botulínica A de más de 31 días; para la toxina botulínica tipo C1 de más de 25 días; para la toxina botulínica tipo B de aproximadamente 10 días; para la toxina botulínica tipo F de aproximadamente 2 días y para la toxina botulínica tipo E de sólo 0,8 días.

El periodo de tiempo de actividad de toxina botulínica tipo A durante, por ejemplo, el tratamiento de distonías (por ejemplo, tortícolis, blefaroespasmos) en seres humanos es de entre 3 a 4 meses. Tras este periodo, el paciente tiene que recibir otra inyección de un fármaco que contiene toxina botulínica. Sería de gran ventaja para el paciente prolongar el periodo de tiempo de acción de la neurotoxina. Haciendo esto, el número de inyecciones necesarias al año se reduciría así como la cantidad global de proteínas clostridiales. Esto de nuevo reduciría el riesgo de la producción de anticuerpos frente a la proteína foránea. Por tanto, la provisión de una toxina botulínica con persistencia prolongada sería deseable.

Sin embargo, no siempre se desea paralización a largo plazo. Por ejemplo, en determinados tratamientos cosméticos a veces sólo se requieren "ajustes finos" temporales. Para lograr una reducción de la persistencia el médico se veía restringido por los métodos de la técnica anterior o bien a la reducción del volumen o bien al cambio de serotipo. Estas técnicas demostraron producir resultados insatisfactorios y requerían un conocimiento profundo de tanto la cinética de la actividad así como de la antigenicidad de los diferentes serotipos de la neurotoxina. Por tanto, la provisión de una neurotoxina con un ajuste "acoplado" de la persistencia sería una mejora importante.

Fernández-Salas *et al.* (*Mov. Disord.* 19: S23-S34, 2004) notificaron que la LC contribuye a la persistencia de toxina botulínica y sugirieron que la compartimentalización dentro de células neuronales puede desempeñar un papel en la duración de la acción de la toxina botulínica. Además, Wang *et al.* (*J. Biol. Chem.* 283:16993-17002, 2008) dan a conocer una toxina botulínica quimérica EA causante de la escisión de SNAP-25 persistente *in vitro*. Sin embargo, ninguno de estos documentos da a conocer la adición de un segundo dominio de LC para modificar la persistencia de la toxina botulínica.

Además, los documentos US 2003/0219462, EP 1849801 y WO 02/08268 dan a conocer toxinas botulínicas modificadas con motivos basados en tirosina o leucina añadidos a la neurotoxina nativa.

La idea para estas alteraciones se basa en la observación de que determinados motivos basados en tirosina o leucina permiten la localización de la cadena ligera del componente neurotóxico de determinados subtipos en la membrana interna de la célula diana. Se planteó la hipótesis de que este mecanismo cambiaba la persistencia de determinadas cadenas ligeras. Sin embargo, hasta ahora los autores no pudieron proporcionar ninguna evidencia de tal efecto, y experimentos más recientes sugieren que toda la hipótesis es incorrecta.

Además, incluso si en determinados casos una adición de motivos condujera a una localización en la membrana, tal

enfoque no es aplicable a modificaciones de toxina botulínica A. Esto se debe a que la cadena ligera nativa de la toxina botulínica tipo A ya se localiza en la membrana interna de la célula, por tanto, un anclaje adicional a la membrana no proporciona ningún beneficio adicional.

5 Por tanto, la presente invención siguió un camino diferente. Tal como se ha encontrado, tal como se describe en esta solicitud, la adición de una segunda cadena ligera a la neurotoxina, que todavía posee su actividad proteolítica, conduce a una alteración del periodo de tiempo de actividad. Dependiendo de la combinación de serotipos usados, el periodo de tiempo puede prolongarse, permitiendo la producción de neurotoxinas confeccionadas a medida. Se prevé proporcionar al médico una gama de neurotoxinas, cuyo serotipo es independiente de su persistencia, permitiendo un tratamiento más estandarizado.

Sumario de la invención

15 La presente invención se refiere una neurotoxinas clostridiales, en una realización toxinas botulínicas, con actividad aumentada o prolongada, es decir, persistencia. Por tanto, en un primer aspecto, la presente solicitud se refiere a un polipéptido que comprende:

(a) un dominio de cadena pesada (HC), o fragmento del mismo, del componente neurotóxico de una toxina clostridial,

20 (b) un primer dominio de cadena ligera (LC), o fragmento del mismo, del componente neurotóxico de una toxina clostridial, y

25 (c) al menos un dominio de cadena ligera (LC) adicional, o fragmento del mismo, del componente neurotóxico de una toxina clostridial;

en el que los dominios están conectados mediante un enlace covalente, un ligador peptídico, un ligador químico, un enlace disulfuro, o una combinación de dos o más de los mismos,

30 en el que el primer y el al menos un dominio de LC adicional pueden ser iguales o diferentes entre sí, y

en el que cada uno de dichos fragmentos de dicho primer y de dicho al menos un dominio de LC adicional presenta actividad proteolítica de más del 10% del correspondiente dominio de LC de tipo natural en un ensayo de SNAP-25, y el fragmento del dominio de HC puede unirse al receptor del dominio de HC nativo del que se deriva, y también puede translocar un dominio de LC unido al mismo.

35 En una realización, la secuencia de aminoácidos de dicho(s) dominio(s) de LC y/o de HC es al menos el 50% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un componente neurotóxico de toxina botulínica de serotipo A1 depositada en la base de datos GenBank con el número de registro AAA23262.

40 En una realización, el polipéptido es uno seleccionado del grupo que consiste en:

LCBoNT/A-LCBoNT/A-HCBoNT/A, LCBoNT/C-LCBoNT/A-HCBoNT/A,

45 LCBoNT/B-LCBoNT/A-HCBoNT/A, LCBoNT/A-LCBoNT/C-HCBoNT/C,

LCBoNT/C-LCBoNT/C-HCBoNT/C, LCBoNT/B-LCBoNT/C-HCBoNT/C, y

50 LCTeNT-LCBoNT/A-HCBoNT/A.

La invención también da a conocer un ácido nucleico que codifica para el polipéptido mencionado anteriormente. La invención da a conocer además un vector que comprende dicho ácido nucleico. También se da a conocer una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico o dicho vector en el presente documento.

55 La invención también da a conocer un método para producir un polipéptido que comprende las etapas de cultivar la célula huésped tal como se mencionó anteriormente, producir y purificar dicho polipéptido codificado por dicho ácido nucleico o vector y, opcionalmente, formular dicho polipéptido en una composición farmacéutica.

60 La invención además da a conocer una composición que comprende el polipéptido mencionado anteriormente. La composición puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender además un tampón de pH, un excipiente, un crioprotector, un conservante, un analgésico, un estabilizador o cualquier combinación de los mismos. La composición puede proporcionarse como un liofilizado o como una disolución.

65 La invención también da a conocer dicha composición para uso en un tratamiento terapéutico.

El tratamiento terapéutico puede comprender tratamiento de distonía focal, espasticidad o un estado que puede tratarse suprimiendo la secreción.

5 La invención también da a conocer el uso de dicha composición para tratamiento cosmético. Dentro de tal tratamiento cosmético, puede ser perfectamente que se traten en particular mamíferos que padecen psicológicamente el estado, por ejemplo, arrugas o línea de expresión del entrecejo, que va a tratarse.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se refiere a:

(a) un dominio de cadena pesada (HC), o fragmento del mismo, del componente neurotóxico de una toxina clostridial,

15 (b) un primer dominio de cadena ligera (LC), o fragmento del mismo, del componente neurotóxico de una toxina clostridial, y

(c) al menos un dominio de cadena ligera (LC) adicional, o fragmento del mismo, del componente neurotóxico de una toxina clostridial;

20 en el que los dominios están conectados mediante un enlace covalente, un ligador peptídico, un ligador químico, un enlace disulfuro, o una combinación de dos o más de los mismos,

en el que el primer y el al menos un dominio de LC adicional pueden ser iguales o diferentes entre sí, y

25 en el que cada uno de dichos fragmentos de dicho primer y de dicho al menos un dominio de LC adicional presenta actividad proteolítica de más del 10% del correspondiente dominio de LC de tipo natural en un ensayo de SNAP-25, y el fragmento del dominio de HC puede unirse al receptor del dominio de HC nativo del que se deriva, y también puede translocar un dominio de LC unido al mismo.

30 Sorprendentemente, se ha encontrado que la adición de una o más cadenas ligeras (LC) (adicionales) a un polipéptido que comprende al menos una cadena pesada (HC) y al menos una cadena ligera (LC) del componente neurotóxico de neurotoxinas clostridiales, tal como se definió anteriormente, da como resultado un polipéptido con persistencia aumentada, es decir, persistencia prolongada de la actividad de toxina en comparación con la toxina de tipo natural.

35 Sin limitarse a la teoría, se plantea la hipótesis de que, tras la unión a la superficie de la célula, ambas cadenas ligeras se translocan al interior de la célula, aumentando la concentración de proteínas activas proteolíticas en la célula, aumentando ambas de ese modo la actividad así como la persistencia de la neurotoxina.

40 Es decir, si se desea una larga persistencia del polipéptido de la invención, el experto recibe instrucciones para usar determinadas combinaciones de dominios de HC y de LC, por ejemplo, dominios de LC derivados de serotipos con larga persistencia. En otras realizaciones, se logra una persistencia más corta combinando otros dominios o fragmentos determinados de LC, por ejemplo, los derivados de serotipos con persistencia más corta.

45 El término "persistencia" tal como se usa en el presente documento describe el periodo de tiempo de acción de un componente neurotóxico. En general, éste es el periodo de tiempo hasta que el agente activo muestra sólo la mitad de su actividad en comparación con su actividad de partida. Por tanto, el término "persistencia" puede usarse como sinónimo del término "semivida de actividad" o el término "semivida de estabilidad metabólica" que define el punto de tiempo donde sólo una mitad de la concentración de proteína de partida está activa debido a procesos metabólicos, es decir, la semivida hasta que la proteína se metaboliza. Dado que la semivida de la proteína se correlaciona con la duración del efecto terapéutico, el término "persistencia" también abarca indirectamente la duración de tiempo de interferencia o influencia causado por un componente neurotóxico con una función celular.

50 El experto conoce distintos ensayos para determinar la persistencia. Según las enseñanzas de la presente invención, la persistencia puede determinarse con un ensayo de ratón que corre (Keller JE., 2006, Neuroscience. 139(2):629-37). Este ensayo permite correlacionar la persistencia con la actividad de movimiento. Alternativamente, la persistencia puede determinarse con un ensayo de escisión de SNAP-25, que permite correlacionar la actividad proteolítica con la persistencia. El efecto de una persistencia aumentada se cumple si puede determinarse un aumento en la persistencia en uno de los ensayos descritos anteriormente, en los que se prefiere el ensayo de escisión de SNAP-25.

55 El término persistencia aumentada y persistencia prolongada se usan en el presente documento de manera intercambiable.

60 Para determinar el impacto de una cadena LC adicional o fragmento de cadena LC sobre el polipéptido de la

invención con respecto a la persistencia, el polipéptido de la invención se compara con un polipéptido correspondiente que carece de dicha cadena LC (adicional). Éste puede ser, por ejemplo, un polipéptido de la invención del que se ha delecionado la cadena LC adicional. Cualquiera de los ensayos de persistencia conocidos por el experto en la técnica puede usarse para determinar la persistencia. En una realización, la persistencia se determina tal como se describió anteriormente en el presente documento o en los ejemplos que ilustran la invención.

En otra realización, se prevé la prolongación de la persistencia de serotipos de neurotoxina de actuación corta. Por ejemplo, la persistencia del serotipo E puede prolongarse añadiendo cadenas ligeras de serotipos activos más largos como, por ejemplo, serotipo A, creando de ese modo una neurotoxina con una persistencia similar a la toxina botulínica A de tipo natural. Dado que la mayoría de los epítopos antigénicos de la neurotoxina se sitúan en la subunidad de cadena pesada, esta modificación puede usarse para aplicar una neurotoxina en pacientes que han desarrollado una respuesta inmunitaria frente a un serotipo determinado. Combinando de ese modo la ventaja de proporcionar un serotipo diferente manteniendo el periodo de tiempo de actividad previo.

Tal como se indicó anteriormente, los términos “dominio de HC” y “dominio de LC” se refieren a la cadena pesada y cadena ligera respectivamente del componente neurotóxico de la neurotoxina o bien de tipo natural o bien de origen recombinante. Además, en algunas realizaciones los dominios de HC y/o de LC se derivan de serotipos diferentes y/o toxinas diferentes. Dentro de esta definición, también se abarcan fragmentos de cadena ligera y cadena pesada. El dominio de HC y de LC puede subdividirse adicionalmente además en subdominios.

El término “dominio o fragmento de LC adicional” del mismo, tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más, por ejemplo, un segundo dominio de LC. Según las enseñanzas de la presente invención, el polipéptido de la invención puede contener además dominios o fragmentos de LC adicionales del mismo. Por ejemplo, el polipéptido de la invención puede comprender el dominio de HC del componente neurotóxico de una toxina clostridial y un primer dominio o fragmento de LC del mismo y un segundo dominio o fragmento de LC del mismo y un tercer dominio o fragmento de LC del mismo.

En una realización, dicho fragmento de dicho primer y dicho dominio de LC adicional presenta la actividad proteolítica de la LC de tipo natural.

Para lograr dicho efecto de persistencia aumentada no se necesita ni se desea un motivo basado en tirosina o leucina adicional (tal como se da a conocer en los documentos US 2003/0219462, EP 1849801 y WO 02/08268). Por tanto, en una realización, la cadena ligera adicional no posee ninguno de dichos motivos.

En una realización, la neurotoxina modificada no contiene un motivo basado en leucina que comprende siete aminoácidos, en el que los primeros cinco aminoácidos partiendo del extremo amino del motivo basado en leucina forman un “quinteto de aminoácidos” y los siguientes dos aminoácidos forman un “doblete de aminoácidos” y en el que el quinteto de aminoácidos comprende al menos un aminoácido seleccionado de un grupo que consiste en glutamato y aspartato; y el doblete de aminoácidos comprende al menos un aminoácido seleccionado de un grupo que consiste en isoleucina y leucina.

En otra realización la neurotoxina modificada no contiene ninguna de las secuencias FEFYKLL, EEKRAIL, EEKMAIL, SERDVLL, VDTQVLL, AEVQALL, SDKQNLL, SDRQNLI, ADTQVLM, SDKQTLL, SSIKRL, ADTQALL y NEQSPLL.

El término “igual que” usado en el presente documento, se refiere a un dominio de LC con secuencia de aminoácidos idéntica, es decir con el 100% de identidad de secuencia de aminoácidos. Por tanto, por ejemplo, un segundo dominio de LC, tal como se usa en el presente documento, que es “igual” significa que es idéntico en secuencia de aminoácidos a dicho primer dominio de LC. Por otro lado, un segundo dominio de LC que es “diferente” se refiere a un segundo dominio de LC que tiene una identidad de secuencia de menos del 100%, es decir por ejemplo el 99,95% o menos en comparación con el primer dominio de LC. Un “dominio de LC diferente” es un dominio de LC de un serotipo diferente o un dominio de LC con una secuencia de aminoácidos que es diferente del primer dominio de LC, por ejemplo, uno con una sustitución de aminoácido. Otro ejemplo de un dominio de LC diferente es un dominio de LC con un truncamiento en el extremo N o C terminal o con una deleción interna. Aún otro ejemplo de un dominio de LC diferente es un dominio de LC con una modificación química. Un “dominio de LC diferente” puede, por tanto, derivarse de un serotipo igual o diferente, respectivamente en comparación con el primer dominio de LC. Lo anterior también se aplica a un “tercer” o cualquier otro dominio de LC adicional.

En una realización los serotipos de todos los dominios de HC y de LC son de toxina botulínica tipo A, en otra realización la segunda cadena ligera es de serotipo C1. Sin embargo, está claro para el experto en la técnica que todas las posibles combinaciones de serotipos A, B, C1, D, E, F y G se cubren por esta solicitud y el experto puede elegir una combinación apropiada basándose en la persistencia publicada de los diferentes serotipos. Ni la combinación de serotipos ni el número de cadenas ligeras y pesadas usadas se restringen por esta invención. Por tanto, en otra realización se prevén proteínas de fusión más largas, es decir, proteínas de fusión con más de tres subunidades, por ejemplo, concatémicos de proteína que comprenden tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez dominios de LC.

Los dominios de HC y de LC de, por ejemplo, la neurotoxina A de *C. botulinum* comprenden diferentes subdominios. El dominio de HC, por ejemplo, comprende tres subdominios, es decir, el subdominio de translocación de 50 kDa HC_N en el extremo amino con el posterior subdominio de HC_{CN} de 25 kDa y el subdominio de HC_{CC} de 25 kDa ubicados en el extremo carboxilo. Conjuntamente, los dominios de HC_N, HC_{CN} y HC_{CC} se designan como dominio de HC.

Los respectivos intervalos de aminoácido de los respectivos dominios se muestran para los diferentes serotipos de BoNT/A y sus variaciones en la tabla 1.

Tabla 1: Números de registro de la base de datos de las secuencias de aminoácidos de neurotoxina botulínica A subtipos 1-4 e intervalos de aminoácidos de los respectivos dominios.

Subtipo de BoNT/A	N.º de Genbank	N.º de aminoácidos	HC		
			HC _N	HC _C	
				HC _{CN}	HC _{CC}
A1	AAA23262 AAM75961 AAQ06331 BTCLAB ABP48105 ABP48106 ABO68834 ABO68833 ABD65472 AAQ06331	1296	449-866	867-1091	1092-1296
	P10845	1296	449-866	867-1091	1092-1296
	CAA36289	1296	449-866	867-1091	1092-1296
A2	CAA51824 I40645 Q45894 AAX53156	1296	449-866	867-1091	1092-1296
	ABC26002	1296	449-866	867-1091	1092-1296
A3	ABA29017	1292	445-862	863-1087	1088-1292
A4	ABA29018	1296	449-866	867-1091	1092-1296

El término “fragmento del dominio de LC”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento del dominio de LC con actividad biológica. Tal como se usa en el presente documento, un fragmento con actividad biológica es un fragmento que (todavía) presenta la actividad proteolítica preferiblemente de la LC de tipo natural, es decir, que puede escindir un polipéptido del complejo SNARE tal como, por ejemplo, sintaxina, SNAP-25 o sinaptobrevina. La actividad biológica puede someterse a prueba, por ejemplo, mediante un ensayo de proteasa de SNAP-25, ensayo de DL₅₀, ensayo de la HDA y similares. Dentro del alcance de esta invención, cualquier dominio de LC, que muestra actividad proteolítica de más del 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% y hasta el 100% del correspondiente dominio de LC de tipo natural en un ensayo de SNAP-25 se considera “activo biológicamente” o “que presenta actividad proteolítica”.

Un ensayo de SNAP-25 adecuado es, por ejemplo, el “ensayo de liberación de fluorescencia de GFP-SNAP25” (documento WO 2006/020748) o el “inmunoensayo de endopeptidasa mejorado de SNAP25” (Jones *et al.*, Journal of Immunological Methods, volumen 329, tomos 1-2, 1 de enero de 2008, páginas 92-101).

Un “fragmento del dominio de HC”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento del dominio de HC con actividad biológica. De manera más específica, éste es un fragmento que todavía puede unirse al receptor del dominio de HC nativo del que se deriva. Además, dicho fragmento es también un fragmento que puede translocar un dominio de LC unido al mismo.

Los fragmentos, por tanto, son por ejemplo polipéptidos de los cuales 1, 2, 3, 5 o hasta 10, 50 ó 100 aminoácidos se han delecionado. En los que la delección puede ser un truncamiento en el extremo C o N terminal o una delección interna.

En algunas realizaciones los dominios de HC y/o de LC se modifican adicionalmente, por ejemplo, mediante una mutación, una delección, una inserción, una adición o un intercambio de aminoácidos. En realizaciones adicionales la

5 HC y/o LC adicionalmente se modifican químicamente, por ejemplo, mediante una fosforilación, una pegilación, una glicosilación, una fosforilación, una sulfatación, una metilación, una acetilación, una lipidación (miristoilación, palmitoilación, isoprenilación, unión de glicosilfosfatidilinositol), una hidroxilación, una amidación o cualquier otra modificación adecuada. Adicionalmente, el dominio de unión a glangióside y/o el dominio de unión de la neurotoxina se modifican, en una realización, de manera que se potencia la capacidad de unión en comparación con la neurotoxina de tipo natural de la que se deriva el dominio de HC. En algunas realizaciones, la HC y/o LC comprenden una secuencia de etiqueta, es decir, otra secuencia de aminoácidos, que permite un procedimiento de purificación simplificado.

10 El término "método de purificación" abarca todos los métodos conocidos en la técnica para la purificación de proteínas. Ejemplos de métodos de purificación de neurotoxinas son las publicaciones de DasGupta & Sathyamoorthy y el documento WO 2000074703. Para una orientación adicional de métodos de purificación de proteínas útiles para la purificación de componentes neurotóxicos recombinantes, se hace referencia a los documentos de Walquer *et al.*, 2002; Harris *et al.* 1989 y Scopes *et al.*, 1994, que se citan en la sección "Bibliografía" más adelante.

20 El término "producción del polipéptido" abarca todas las etapas necesarias para la producción del polipéptido, es decir, por ejemplo, creación del ácido nucleico codificante, incorporación dicho ácido nucleico en un vector, expresión del polipéptido *in vitro* y/o una célula huésped, modificaciones del polipéptido *in vivo* y/o *in vivo*, purificación del polipéptido y/o producción de una composición que contiene dicho polipéptido. De ese modo, el término "expresión" o "expresión génica" se define en el presente documento como el procedimiento por el que la información heredable en un gen, tal como la secuencia de ADN, se convierte en un producto génico funcional, tal como proteína o ARN.

25 En una realización, se prevé incorporar en el polipéptido de la presente invención sitios de unión al receptor adicionales para proporcionar una neurotoxina que posee, además de una persistencia aumentada, características adicionales que permiten nuevas aplicaciones, por ejemplo, una neurotoxina con sitios de unión específicos de célula adecuados, por ejemplo, para el tratamiento de alergias o dolor (documento WO 2007/13839). Alternativamente, el sitio de unión nativo ubicado en el dominio de HC puede alterarse con el fin de dirigir el polipéptido de la presente invención a tipos de célula específicos.

35 En una realización, la segunda cadena ligera se conecta al extremo N terminal de la primera cadena. Esta conexión puede ser o bien directamente a través de un enlace o bien indirectamente a través de un ligador. En general, en la presente invención, la unión entre los dominios se logra a través de enlace directo o enlace a través de un ligador peptídico, a través de un ligador químico o a través de un enlace disulfuro. Dicho enlace puede ser o no un enlace escindible. Un enlace escindible es un enlace que puede escindirse, por ejemplo, por una proteasa de específica de secuencia. Un enlace no escindible es un enlace que es estable tras captación celular, en otras palabras, varios dominios de LC conectados por un enlace no escindible permanecen unidos entre sí, incluso tras translocación al citoplasma.

40 El término "enlace" se refiere a un enlace químico, es decir, enlace covalente (por ejemplo, enlace disulfuro). Tal como se mencionó anteriormente, esta definición abarca enlaces directos así como enlaces indirectos a través de ligadores químicos.

45 Un "ligador químico" se define en el presente documento como una entidad de molécula producida por medios químicos, que es adecuada para conectar las diferentes subunidades del polipéptido de la presente invención. Estas uniones químicas pueden lograrse, por ejemplo, por agentes bifuncionales conocidos en la técnica. En otra realización, la unión química se logra por enlaces disulfuro, de manera similar a la conexión entre cadena ligera y pesada en el tipo natural. En aún otra realización, la introducción de un enlace disulfuro se logra introduciendo una secuencia que contiene cisteína de la cadena pesada (por ejemplo, aa 449-459 de BoNT/A) en la cadena ligera. Ejemplos no limitativos adicionales para tales ligadores químicos son ácidos carboxílicos, alcohol polihidroxilado etoxilado, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, etc.

55 Un "ligador peptídico" se define en el presente documento como un péptido de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 o hasta 100 aminoácidos de longitud, que conecta las diferentes subunidades del polipéptido de la presente invención entre sí. En una realización dicho ligador peptídico comprende al menos dos cisteínas. En otra realización el ligador comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o hasta 20 histidinas. En otra realización el ligador es un sitio de escisión de proteasa. En una realización adicional el ligador permite la producción de la proteína de fusión completa mediante métodos recombinantes.

60 En otra realización puede introducirse un sitio de escisión de proteasa entre la primera y la segunda cadena ligera, por ejemplo, un sitio que puede cortarse por proteasas de *E.coli* tal como se enumeran, por ejemplo, en el documento DE 102005002978 pero sin restricción a estas proteasas. En otra realización, el sitio de escisión de proteasa es cualquiera de los sitios de reconocimiento para o bien serina proteasas (por ejemplo, quimotripsina, tripsina, elastasa, subtilisina), treonina proteasas, cisteína proteasas (por ejemplo, papaína, catepsina, caspasa, calpaína), ácido aspártico proteasas (por ejemplo, proteasa de VIH, quimosina, renina, catepsina, pepsina,

plasmepsina), metaloproteasas o ácido glutámico proteasas o cualquier combinación de las mismas.

El experto en la técnica entenderá que esta invención no sólo es adecuada para el uso de cadena(s) ligera(s) y pesada(s) de tipo natural, sino que también se abarcan péptidos recombinantes y/o componentes neurotóxicos híbridos por esta invención. Por tanto, en una realización, se prevé una proteína de fusión de al menos una cadena pesada, al menos una primera cadena ligera y al menos una segunda cadena ligera, en la que al menos uno, algunos o todos los dominios usados se producen de manera recombinante, en otra realización se usan péptidos híbridos, es decir, péptidos compuestos por subdominios de serotipos diferentes (por ejemplo, una cadena pesada que comprende un dominio de translocación y unión de serotipos diferentes o incluso de una toxina diferente, por ejemplo, toxina tetánica, toxina colérica o toxina Pertussis).

En otra realización, puede(n) usarse la(s) cadena(s) ligera(s) de otras toxinas clostridiales, por ejemplo, *Clostridium bif fermentans*, *Clostridium botulinum* de un serotipo diferente, *Clostridium difficile*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium novyi*, *Clostridium oedematiens*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Clostridium tertium* o *Clostridium welchii*, por ejemplo, en una realización, se usa toxina tetánica (también denominada tetanoespasmina o toxina espasmogénica) así como cualquier variación y serotipo de las diferentes toxinas. Además, la parte de unión a la célula de la cadena pesada puede intercambiarse por una secuencia de polipéptido que dota a la proteína de fusión de otro dominio de direccionamiento, es decir, otra especificidad celular (por ejemplo, documento WO 2007/13839). Además, aún otra realización de la invención hace uso de cadenas ligeras y pesadas, que se han alterado por métodos bioquímicos o moleculares, más preferiblemente delecciones, inserciones, intercambio de aminoácidos o elongación.

En una realización, el serotipo del subdominio de translocación de HC (es decir, la parte del N-terminal de la cadena pesada) es el mismo serotipo que el de la primera LC.

En realizaciones adicionales, la presente invención también se refiere a neurotoxinas que están modificadas químicamente, por ejemplo, por pegilación, glicosilación, sulfatación, fosforilación o cualquier otra modificación, en particular de uno o más aminoácidos expuestos al disolvente o a la superficie.

Además, en otra realización, la neurotoxina posee una secuencia de etiqueta que permite métodos de purificación simplificados. Tales métodos conocidos de marcaje hacen uso de moléculas o péptidos pequeños, por ejemplo, biotina, estreptavidina, etiqueta de estrep., etiqueta de His, antígenos, fragmentos de anticuerpo, etc. que se unen de manera covalente o no covalente al polipéptido de la presente invención y permiten la purificación a través de cromatografía de afinidad, perlas u otros métodos de separación.

Tal como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones la proteína de fusión contiene dominios recombinantes o se produce de manera recombinante en secuencias de ADN completas de todas las cadenas ligeras y pesadas de todos los serotipos de toxina botulínica que están disponibles de bases de datos públicas. Por tanto, se prevé construir vectores que portan los genes deseados para las cadenas ligeras y pesadas basándose en esta información de bases de datos. Entonces el vector se expresa en, por ejemplo, *E. coli* para producir una proteína de fusión. En otra realización, el vector puede expresarse en otros sistemas de expresión, como por ejemplo, levadura, células de insecto o células CHO. En otra realización, los dominios de proteína se producen por separado y luego se conectan posteriormente por métodos químicos. La proteína resultante se aísla entonces mediante métodos conocidos de purificación de proteínas, luego, si es necesario, se procesa adicionalmente (por ejemplo, escisión, unión o tratamiento químico) y se usa como agente activo en una formulación farmacéutica.

En una realización, la neurotoxina modificada se modifica adicionalmente para alterar (es decir, aumentar y disminuir) su afinidad de unión a su receptor. La afinidad de unión puede determinarse en comparación con una neurotoxina nativa, es decir, una neurotoxina derivada de *C. botulinum* y que tiene una secuencia de aminoácidos de tipo natural. Alternativamente, pueden realizarse ensayos de unión con un fragmento de dicha neurotoxina. Preferiblemente dicha neurotoxina puede obtenerse de *C. botulinum*. Una afinidad aumentada significa que la neurotoxina según la invención tiene una constante de disociación inferior en comparación con la neurotoxina no modificada. Preferiblemente, la neurotoxina nativa es neurotoxina botulínica de serotipo A incluyendo cualquier subtipo A, que se define en detalle a continuación. Una neurotoxina botulínica de serotipo A producida de manera recombinante, cuya secuencia de aminoácidos es idéntica o similar a la neurotoxina botulínica nativa obtenida de *C. botulinum*, se comporta farmacológicamente de manera idéntica o similar a la neurotoxina botulínica nativa obtenida de *C. botulinum*. Una neurotoxina recombinante de este tipo puede producirse en, por ejemplo, *E. coli* y se denomina comúnmente "neurotoxina botulínica recombinante". Pueden realizarse ensayos de unión con una neurotoxina aislada de *C. botulinum* o una neurotoxina obtenida por expresión de proteína recombinante. Preferiblemente, el polipéptido, el fragmento activo o derivado según la presente invención se une específicamente a moléculas asociadas a la membrana plasmática, proteínas transmembrana, proteínas de vesículas sinápticas, una proteína de la familia de sinaptotagminas o glicoproteínas de vesículas sinápticas 2(SV2), preferiblemente sinaptotagmina I y/o sinaptotagmina II y/o SV2A, SV2B o SV2C, particularmente preferida sinaptotagmina I humana y/o sinaptotagmina II humana y/o SV2A, SV2B o SV2C humanas. La unión se determina preferiblemente *in vitro*. El experto conoce diversos ensayos para determinar afinidades de unión entre una primera proteína (la neurotoxina) y una segunda proteína (el receptor). Cualquier ensayo de este tipo puede ser útil para determinar el efecto de una mutación sobre

la unión al receptor. Un ensayo de este tipo es un ensayo de co-inmunoprecipitación de GST, que se prefiere según las enseñanzas de la presente invención. Este ensayo se describe en los ejemplos de la presente invención. También puede usarse resonancia de plasmón superficial para estudiar la afinidad de unión. Se describen condiciones experimentales para la misma, por ejemplo, en Yowler *et al.*, *Biochemistry* 43 (2004), 9725-9731.

5 Además, la afinidad de unión puede evaluarse usando microcalorimetría isotérmica. En una realización, el dominio de unión a gangliósido y/o el dominio de unión al receptor de proteína de la neurotoxina se modifican para potenciar la capacidad de unión en comparación con la neurotoxina de tipo natural de la que se deriva el dominio de HC. Como referencia se hace referencia a los documentos WO 2006/027207 A1, WO 2006/114308 A1 y PCT/EP2008/006151 (EP 07014785.5).

10 También se describen en el presente documento isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos de toxina botulínica, que muestran al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% y hasta el 60%, hasta el 70%, hasta el 80%, hasta el 90%, hasta el 100% de identidad de secuencia. La identidad de secuencia puede calcularse por cualquier algoritmo adecuado para producir resultados fiables, por ejemplo, usando el algoritmo FASTA (W.R. Pearson & D.J. Lipman PNAS (1988) 85:2444-2448). La identidad de secuencia puede calcularse comparando dos polipéptidos o dos dominios tales como dos dominios de LC o fragmentos del mismo.

15 En una realización, el polipéptido de la invención es uno de los siguientes: LCB_oNT/A-LCB_oNT/A-HCB_oNT/A, LCB_oNT/C-LCB_oNT/A-HCB_oNT/A, LCB_oNT/B-LCB_oNT/A-HCB_oNT/A, LCB_oNT/A-LCB_oNT/C-HCB_oNT/C, LCB_oNT/C-LCB_oNT/C-HCB_oNT/C, LCB_oNT/B-LCB_oNT/C-HCB_oNT/C y LCT_eNT-LCB_oNT/A-HCB_oNT/A.

De estas neurotoxinas modificadas mencionadas anteriormente, han de mencionarse especialmente los constructos con una cadena ligera adicional tipo A, debido a su excelente actividad proteolítica y estabilidad.

25 La invención también abarca ácidos nucleicos que codifican para el polipéptido de la invención. En una realización, dicho ácido nucleico contiene secuencias adicionales conocidas en la técnica como, por ejemplo, promotores, potenciadores, elementos bacterianos, regiones IRES, estructuras de caperuza terminal, etc. El ácido nucleico puede ser circular, lineal o integrado en un genoma. Además, se abarcan concatémeros de ADN que codifican para proteínas de fusión que comprenden tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez dominios de LC.

30 La invención también abarca un vector adecuado para la expresión *in vitro* del polipéptido de la presente invención. En una realización, el vector comprende además elementos reguladores y/o marcadores de selección. En una realización, dicho vector se basa en origen vírico, en otra realización es de origen de fago, en aún otra realización es de origen bacteriano.

35 La invención también abarca células huésped procariotas y/o eucariotas adecuadas para expresar dicho vector y, en particular, el polipéptido de la invención. En una realización, dicha célula huésped es de origen clostridial, en otra realización dicha célula se deriva de células patrón para expresión recombinante, por ejemplo, *E. coli*, etc. En una realización, el polipéptido se modifica dentro de la célula huésped (es decir, se glicosila, se fosforila, se procesa por proteasas, etc.), Por tanto, se abarcan tanto el prepolipéptido, cualquier producto de proteína intermedio así como el polipéptido final por esta invención.

45 El polipéptido de la invención puede ser parte de una composición o una composición farmacéutica. Una "composición farmacéutica" es una formulación en la que está contenido o comprendido un principio activo para su uso como medicamento o diagnóstico. Tal composición farmacéutica puede ser adecuada para administración terapéutica o de diagnóstico (es decir, mediante inyección intramuscular o subcutánea) a un paciente humano.

50 La composición farmacéutica que va a usarse en el presente documento puede comprender el polipéptido de la invención (es decir, el componente neurotóxico modificado) como único componente activo o puede contener componentes adicionales farmacéuticamente activos, por ejemplo, ácido hialurónico o polivinilpirrolidona o polietilenglicol, teniendo opcionalmente tal composición el pH estabilizado por un tampón de pH adecuado, en particular por un tampón acetato de sodio y/o un polialcohol crioprotector.

55 En una realización de la presente invención se prevé que la formulación farmacéutica no contenga proteínas encontradas en el complejo de toxina botulínica aparte del componente neurotóxico que es parte del polipéptido de la presente invención. El precursor del polipéptido de la presente invención puede estar escindido o no, sin embargo, en una realización de particular interés, el precursor se ha escindido para dar las cadenas ligera y pesada. Tal como se indicó anteriormente, los polipéptidos pueden ser de secuencia de tipo natural o pueden modificarse en uno o más residuos. La modificación comprende modificación química, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, acilación o similares, que pueden ser beneficiosas, por ejemplo, para la captación o estabilidad del polipéptido. Sin embargo, la cadena polipeptídica del polipéptido de la invención puede, modificarse alternativa o adicionalmente por adición, sustitución o delección de uno o más residuos de aminoácido.

65 En una realización, el polipéptido de la invención tiene una actividad biológica de 10 a 500 unidades de DL₅₀ por ng de polipéptido de la invención, tal como se determina en un ensayo de DL₅₀ en ratón. En otra realización, el polipéptido de la invención tiene una actividad biológica de aproximadamente 150 unidades de DL₅₀ por nanogramo.

Generalmente, la composición farmacéutica de la presente invención comprende el polipéptido de la invención en una cantidad de aproximadamente 6 pg a aproximadamente 30 ng.

5 Una composición farmacéutica que comprende el componente neurotóxico de toxina botulínica tipo A en forma aislada está disponible comercialmente en Alemania de Merz Pharmaceuticals GmbH con la marca comercial Xeomin®. La producción del componente neurotóxico de toxina botulínica tipo A y B se describe, por ejemplo, en las solicitudes internacionales de patente WO 00/74703 y WO 2006/133818. El experto puede adaptar dichas composiciones al polipéptido de la invención al que se hace referencia en el presente documento.

10 En una realización, dicha composición es una disolución reconstituida del polipéptido de la invención. En otra realización la composición comprende además sacarosa o albúmina sérica humana o ambas, todavía en otra realización la razón de albúmina sérica humana con respecto a sacarosa es de aproximadamente 1:5. En otra realización, dicha albúmina sérica humana es albúmina sérica humana recombinante. Alternativamente, dicha composición está libre de proteínas derivadas de mamíferos tales como albúmina sérica humana. Cualquier
15 disolución de este tipo puede proporcionar suficiente estabilidad de neurotoxina reemplazando la albúmina sérica por estabilizadores no proteicos (a continuación).

En la presente solicitud de patente, puede usarse el uso de un medicamento basado en el componente neurotóxico modificado mencionado anteriormente.

20 Con respecto a la composición y dosificación del medicamento basado en la toxina botulínica, y con respecto a la composición, dosificación y frecuencia de administración del medicamento basado en el componente neurotóxico de toxina botulínica, se hace referencia al documento PCT/EP2007/005754.

25 La composición farmacéutica puede liofilizarse o secarse a vacío, reconstituirse, o puede permanecer en disolución. Cuando se reconstituye, en una realización la disolución reconstituida se prepara añadiendo solución salina fisiológica estéril (NaCl al 0,9%).

30 Tal composición puede comprender excipientes adicionales. El término "excipiente" se refiere a una sustancia presente en una composición farmacéutica aparte del principio farmacéutico activo presente en la composición farmacéutica. Un excipiente puede ser un tampón, portador, antiadherente, analgésico, aglutinante, disgregante, carga, diluyente, conservante, vehículo, ciclodextrina y/o agente de carga tal como albúmina, gelatina, colágeno, cloruro de sodio, conservante, crioprotector y/o estabilizador.

35 Un "tampón de pH" se refiere a una sustancia química que puede ajustar el valor del pH de una composición, disolución y similar a un determinado valor o a un intervalo de pH determinado. En una realización este intervalo de pH puede ser de entre pH 5 y pH 8, en otra realización de pH 7 a pH 8, en aún otra realización de 7,2 a 7,6, y en aún una realización adicional un pH de 7,4. En otra realización, la composición farmacéutica tiene un pH de entre aproximadamente 4 y 7,5 cuando se reconstituye o tras inyección, en aún otra realización aproximadamente pH 6,8
40 y pH 7,6 y en una realización adicional entre pH 7,4 y pH 7,6.

En una realización la composición también contiene 1-100 mM, en otra realización 10 mM de tampón acetato de sodio.

45 Los intervalos de pH facilitados mencionados anteriormente son sólo ejemplos típicos y el pH real puede incluir cualquier intervalo entre los valores numéricos facilitados anteriormente. Según las enseñanzas de la presente invención tampones adecuados son, por ejemplo, tampón e fosfato de sodio, tampón acetato de sodio, tampón TRIS o cualquier tampón, que sea adecuado para tamponar dentro de los intervalos de pH anteriores.

50 "Que estabiliza", "estabiliza" o "estabilización" significa que el principio activo, es decir, el polipéptido de la invención en una composición farmacéutica de disolución acuosa o reconstituida tiene más de aproximadamente el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, y hasta aproximadamente el 100% de la toxicidad que el polipéptido biológicamente activo de la invención tenía antes de incorporarse a la composición farmacéutica.

55 Ejemplos de tales estabilizadores son gelatina o albúmina, en una realización de origen humano u obtenidas de una fuente recombinante. También se incluyen proteínas de fuentes no humanas o no animales. Los estabilizadores pueden modificarse por medios químicos o por genética recombinante. En una realización de la presente invención, se prevé usar alcoholes, por ejemplo, inositol, manitol, como excipientes crioprotectores para estabilizar proteínas durante la liofilización.

60 En otra realización de la presente invención, el estabilizador puede ser un agente estabilizante no proteico que comprende ácido hialurónico o polivinilpirrolidona (Kollidon®), hidroxietilalmidón, alginato o polietilenglicol o cualquier combinación de los mismos, teniendo tal composición opcionalmente el pH estabilizado por un tampón de pH adecuado, en particular por un tampón acetato de sodio o un crioprotector o ambos. Dicha composición puede
65 comprender además de los estabilizadores mencionados, agua y al menos un polialcohol, tal como manitol o sorbitol o mezclas de los mismos. También puede comprender monosacáridos, disacáridos o polisacáridos superiores, tales

como glucosa, sacarosa o fructosa. Tal composición se considera una composición más segura que posee estabilidad notable.

5 El ácido hialurónico en la presente composición farmacéutica se combina en una realización con el polipéptido de la invención en una cantidad de 0,1 a 10 mg, especialmente 1 mg de ácido hialurónico por ml en una disolución de toxina botulínica de 200 U/ml.

10 La polivinilpirrolidona (Kollidon®), cuando está presente en la presente composición, se combina con el polipéptido de la invención en una cantidad tal como para proporcionar una disolución reconstituida que comprende de 10 a 500 mg, especialmente 100 mg de polivinilpirrolidona por ml en una disolución del polipéptido de la invención de 200 U/ml. En otra realización, la reconstitución se lleva a cabo en hasta 8 ml de disolución. Esto da como resultado concentraciones por debajo de 12,5 mg de polivinilpirrolidona por ml en una disolución del polipéptido de la invención de 25 U/ml.

15 El polietilenglicol en la presente composición farmacéutica se combina en una realización con el polipéptido de la invención en una cantidad de 10 a 500 mg, especialmente 100 mg de polietilenglicol por ml en una disolución de toxina botulínica de 200 U/m. En otra realización, la disolución sujeto también contiene 1-100 mM, en aún otra realización 10 mM de tampón de acetato de sodio.

20 La composición farmacéutica según la presente invención en una realización mantiene su potencia sustancialmente sin cambios durante periodos de seis meses, un año, dos años, tres años y/o cuatro años cuando se almacena a una temperatura de entre aproximadamente +8°C y aproximadamente -20°C. Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas indicadas pueden tener una potencia o porcentaje de recuperación de entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 100% tras la reconstitución.

25 “Crioprotector” se refiere a excipientes que dan como resultado un principio activo, es decir, el polipéptido de la invención en una composición farmacéutica de disolución acuosa o reconstituida que tiene más de aproximadamente el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, y hasta aproximadamente el 100% de la toxicidad que el polipéptido biológicamente activo de la invención tenía antes de secarse por congelación en la composición farmacéutica.

30 En otra realización, la composición puede contener un compuesto de polihidroxilo, por ejemplo, un polialcohol como crioprotector. Los ejemplos de polialcoholes que pueden usarse incluyen, por ejemplo, inositol, manitol y otros alcohóles no reductores. Algunas realizaciones de la composición no comprenden un estabilizador proteico, o no contienen trehalosa o maltotriosa o lactosa o sacarosa o azúcar relacionado o compuestos de hidratos de carbono que se usan a veces como crioprotectores.

35 Los términos “conservante” y “conservantes” se refieren a una sustancia o un grupo de sustancias, respectivamente, que impiden el crecimiento o la supervivencia de microorganismos, insectos, bacterias u otros organismos contaminantes dentro de dicha composición. Los conservantes también impiden que dicha composición experimente cambios químicos no deseados. Los conservantes que pueden usarse en el alcance de esta patente son todos los conservantes del estado de la técnica conocidos por el experto. Los ejemplos de conservantes que pueden usarse incluyen, entre otros, por ejemplo, alcohol bencílico, ácido benzoico, cloruro de benzalconio, propionato de calcio, nitrato de sodio, nitrito de sodio, sulfitos (dióxido de azufre, bisulfito de sodio, hidrogenosulfito de potasio, etc.), EDTA disódico, formaldehído, glutaraldehído, tierra de diatomeas, etanol, metilcloroisotiazolinona, hidroxianisol butilado y/o hidroxitolueno butilado.

40 El término “analgésico” se refiere a fármacos analgésicos que actúan de diversas formas sobre los sistemas nerviosos central y periférico e incluye, entre otros, Paracetamol® (acetaminofeno), los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como salicilatos, fármacos narcóticos tales como morfina, fármacos sintéticos con propiedades narcóticas tal como Tramadol®, y otros. También se incluye cualquier compuesto con un efecto analgésico local tales como, por ejemplo, lidocaína, alcohol bencílico, ácido benzoico y otros.

45 En una realización, el analgésico es parte de la composición, en otra realización, el analgésico se administra antes, durante o después del tratamiento con el agente quimiodenervante.

50 El término “liofilización” se usa en este documento para un tratamiento de una disolución que contiene el polipéptido de la invención, mientras que esta disolución se congela y se seca hasta que sólo quedan los componentes sólidos de la composición. El producto secado por congelación de este tratamiento se define por tanto en este documento como “liofilizado”.

55 En este documento el término “reconstitución” se define como el procedimiento de solubilización de dicha composición secada por congelación del polipéptido de la invención. Esto puede hacerse añadiendo la cantidad adecuada de agua estéril, por ejemplo, si todos los componentes necesarios ya están contenidos en el liofilizado. O, si este no es el caso, puede hacerse por ejemplo añadiendo una solución salina estéril sola o, si fuera aplicable, con la adición de componentes que comprenden, por ejemplo, un tampón de pH, excipiente, crioprotector, conservante,

estabilizador analgésico o cualquier combinación de los mismos. La solución salina mencionada anteriormente, "solución salina", es una disolución de sal, por ejemplo, un disolución de cloruro de sodio (NaCl) o una disolución de cloruro de sodio isotónica (es decir, una concentración de cloruro de sodio del 0,9%). La solubilización se lleva a cabo de tal manera que la "reconstitución" final puede administrarse directa o indirectamente, es decir, por ejemplo, tras dilución, al paciente. La neurotoxina puede reconstituirse en medios isotónicos, por ejemplo, en solución salina isotónica o solución salina estéril.

Es destacable que el concepto de la presente invención, que implica la administración del polipéptido de la invención para el tratamiento de cualquier estado que esté asociado con inervación colinérgica hiperactiva de un músculo o una glándula exocrina, donde el polipéptido de la invención bloquea la secreción de acetilcolina en la hendidura sináptica. Por tanto, el tratamiento ofrecido por la presente invención puede dirigirse a cualquiera de las siguientes indicaciones, la mayoría de las cuales se describen en detalle en Dressler D (2000) (Botulinum Toxin Therapy. Thieme Verlag, Stuttgart, Nueva York):

- 15 - distonía
 - distonía craneal
 - blefaroespasmo
 - distonía oromandibular
 - o tipo apertura mandibular
 - o tipo cierre mandibular
 - bruxismo
 - síndrome de Meige
 - distonía lingual
 - apraxia de la apertura palpebral
- 35 - distonía cervical
 - antecolis
 - retrocolis
 - laterocolis
 - tortícolis
- 45 - distonía faríngea
 - distonía laríngea
 - disfonía espasmódica/tipo aductora
 - disfonía espasmódica/tipo abductora
 - disnea espasmódica
- 55 - distonía de los miembros
 - distonía del brazo
 - o distonía de tarea específica
- 60 - calambres del escribiente
 - calambres del músico
- 65 - calambres del golfista

- distonía de la pierna
 - o aducción del muslo, abducción del muslo
 - o flexión de la rodilla, extensión de la rodilla
 - o flexión del tobillo, extensión del tobillo
- distonía del pie
 - o dedo estriatal
 - o flexión del dedo
 - o extensión del dedo
- distonía axial
 - o síndrome de Pisa
- síndrome de la “danza del vientre”
- distonía segmentaria
- hemidistonía
- distonía generalizada
- distonía en Lubag
- distonía en degeneración corticobasal
- distonía en Lubag
- distonía tardía
- distonía en ataxia espinocerebelosa
- distonía en enfermedad de Parkinson
- distonía en enfermedad de Huntington
- distonía en enfermedad de Hallervorden Spatz
- discinesias inducidas por dopamina/distonía inducida por dopamina
- discinesias tardías/distonía tardía
- discinesias/distonías paroxísticas
 - cinesigénica
 - no cinesigénica
 - inducida por acción
- mioclonía palatal
- mioclonía
- mioquimia

- rigidez
- calambres musculares benignos
- 5 - temblores de barbilla hereditarios
- actividad del músculo de la mandíbula paradójica
- espasmos hemimasticatorios
- 10 - miopatía branquial hipertrófica
- hipertrofia maseterina
- 15 - hipertrofia tibial anterior
- nistagmo
- oscilopsia
- 20 - hiperhidrosis
- parálisis visual supranuclear
- 25 - epilepsia parcial continua
- planificación de operación de tortícolis espasmódica
- parálisis del abductor de las cuerdas vocales
- 30 - disfonía mutacional recalcitrante
- disfunción del esfínter esofágico superior
- 35 - granuloma del pliegue vocal
- tartamudeo
- síndrome de Gilles de la Tourette
- 40 - mioclonía del oído medio
- cierre protector de la laringe
- 45 - pérdida del habla tras laringectomía
- ptosis protectora
- entropión
- 50 - disfunción del esfínter de Oddi
- pseudoacalasia
- 55 - trastornos motores esofágicos distintos de acalasia
- vaginismo
- inmovilización postoperatoria
- 60 - temblor
- enfermedades genitourinarias
- 65 • disfunción de la vejiga

- vejiga hiperactiva
 - o incontinencia urinaria
 - 5 o retención urinaria
 - o vejiga espástica
- 10 - enfermedades gastrointestinales
- disinergia esfínter detrusor
- espasmo del esfínter de la vejiga
- 15 - espasmo hemifacial
- discinesias de reinervación
- uso cosmético
- 20 - patas de gallo
 - fruncimiento
- 25 • asimetrías faciales
- hoyuelos mentonianos
- 30 • línea de expresión del entrecejo
- líneas frontales
- platisma
- 35 • líneas de fumador
- pliegues nasolabiales
- 40 • elevación masetera
- síndrome de persona rígida
- tétanos
- 45 - enfermedades de la próstata
 - hiperplasia prostática
 - cáncer de próstata
- 50 - tratamiento de la obesidad
- parálisis cerebral infantil
- 55 - estrabismo
- mixto
- paralítico
- 60 - concomitante
- tras cirugía de desprendimiento de retina
- 65 - tras cirugía de cataratas

- en afaquia
- 5 - estrabismo miosítico
- estrabismo miopático
- desviación vertical disociada
- 10 - como complemento a la cirugía de estrabismo
- esotropía
- exotropía
- 15 - acalasia
- fisuras anales
- 20 - hiperactividad de glándulas exocrinas
- síndrome de Frey
- síndrome de lágrimas de cocodrilo
- 25 - hiperhidrosis
 - axilar
- 30 • palmar
- plantar
- rinorrea
- 35 - hipersalivación relativa
 - en accidente cerebrovascular
- 40 • en Parkinson
- en esclerosis lateral amiotrófica
- estados espásticos
- 45 • en encefalitis y mielitis
 - o procesos autoinmunitarios
- 50 - esclerosis múltiple
- mielitis transversa
- síndrome de Devic
- 55 o infecciones virales
- o infecciones bacterianas
- 60 o infecciones parasitarias
- o infecciones fúngicas
- 65 • en paraparesia espástica hereditaria

- síndrome postapopléjico
 - o infarto hemisférico
 - 5 o infarto del tronco cerebral
 - o infarto de la médula espinal
- 10 • en traumatismo del sistema nervioso central
 - o lesiones hemisféricas
 - o lesiones del tronco cerebral
 - 15 o lesión de la médula espinal
- en hemorragia del sistema nervioso central
 - o hemorragia intracerebral
 - 20 o hemorragia subaracnoidea
 - o hemorragia subdural
 - 25 o hemorragia intraespinal
- en neoplasias
 - o tumores hemisféricos
 - 30 o tumores del tronco cerebral
 - o tumores de la médula espinal
- 35 - cefalea
 - migraña
 - cefalea tensional
 - 40 • cefalea sinusal
 - cefalea crónica y/o
- 45 - pérdida de cabello.

50 La composición farmacéutica que comprende la toxina botulínica se administra, en una realización, varias veces, en una cantidad eficaz para mejorar el estado del paciente. También ha de indicarse que dependiendo de la persistencia del polipéptido de la invención se necesitan dosificaciones menores o mayores, por tanto, las siguientes referencias de dosificación solo tienen un propósito de orientación.

55 Normalmente, la dosis administrada al paciente será de hasta aproximadamente 1000 unidades, pero en general no debe exceder las 400 unidades por paciente. En una realización el intervalo se encuentra entre aproximadamente 80 y aproximadamente 400 unidades. Estos valores en una realización son válidos para pacientes adultos. Para niños, las dosis respectivas oscilan entre 25 y 800 y en otra realización entre 50 y 400 unidades.

60 Mientras que los intervalos anteriores se refieren a la dosis total máxima, el intervalo de dosis por músculo en una realización está entre 3 y 6 unidades/kg de peso corporal (p.c.), para músculos pequeños 0,5-2 U/kg de p.c., en otra realización 0,1-1 U/kg de p.c. Generalmente las dosis no deben exceder las 50 U por sitio de inyección y 100 U por músculo.

En una realización de la presente invención la cantidad eficaz de toxina botulínica administrada excede las 500 U de polipéptido de la invención en adultos o excede las 15 U/kg de peso corporal en niños.

Con respecto a la frecuencia de dosificación, el intervalo de reinyección depende en gran medida de la persistencia de la neurotoxina modificada. Por tanto, según la presente invención el medicamento que va a administrarse se readministra en intervalos de entre 3 y 6 meses, en otra realización el medicamento se readministra en intervalos de entre 2 semanas y menos de 3 meses. Sin embargo, dependiendo de las modificaciones de la neurotoxina, en otras realizaciones se prevén tratamientos de más de 6 meses hasta 12 meses o tratamientos en periodos de tiempo más cortos de 2 semanas.

Con respecto a la composición y dosificación del medicamento basado en la toxina botulínica, y con respecto a la composición, dosificación y frecuencia de administración del medicamento basado en el componente neurotóxico de toxina botulínica, se hace referencia al documento US 60/817756.

Mientras que los valores indicados anteriormente deben entenderse como una directriz general para administrar el medicamento tal como se usa en la presente invención, sin embargo, en última instancia es el médico que es responsable del tratamiento el que decide acerca de tanto la cantidad de toxina administrada como la frecuencia de su administración.

El medicamento basado en toxina botulínica puede inyectarse directamente en los músculos afectados. Con el fin de encontrar el sitio de inyección apropiado, existen varios medios que ayudan al médico con el fin de encontrar el mismo. En la presente invención, son aplicables todos los métodos para encontrar el mejor sitio de inyección, tal como inyección guiada por electromiografía (EMG), inyección guiada por palpación, inyección guiada por CT/IRM, así como inyección guiada por sonografía (ultrasonidos). Entre estos métodos, en una realización este último es el método de elección en el tratamiento de niños. Con respecto a detalles adicionales referentes a la inyección guiada por sonografía, se hace referencia a Berweck "Sonography-guided injection of botulinum toxin A in children with cerebral palsy", *Neuropediatric* 2002 (33), 221-223.

El término "inyección" se define como cualquier procedimiento que permite al experto en la técnica administrar el agente activo al sitio diana penetrando en la piel. Un número incompleto de ejemplos de "inyecciones" son subcutáneas, intramusculares, intravenosas, intratecales, intraarteriales, etc.

Debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir sólo realizaciones particulares y no pretende ser limitativa. Debe indicarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Bibliografía

de Paiva A, Meunier FA, Molgo J, Aoki KR, Dolly JO. Related Articles, Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(6):3200-5.

E. L. V. Harris (Ed.), S. Angal (Ed.), "Protein Purification Methods: A Practical Approach", Oxford University Press (diciembre de 1989), ISBN-10: 019963002X, ISBN-13: 978-0199630028

Eleopra R, Tugnoli V, Quatralo R, Gastaldo E, Rossetto O, De Grandis D, Montecucco C. Botulinum neurotoxin serotypes A and C do not affect motor units survival in humans: an electrophysiological study by motor units counting. *Clin Neurophysiol*. 2002; 113(8):1258-64.

Eleopra R, Tugnoli V, Rossetto O, Montecucco C, De Grandis D. Botulinum neurotoxin serotype C: a novel effective botulinum toxin therapy in human. *Neurosci Lett*. 1997; 224(2):91-4.

Foran PG, Mohammed N, Lisk GO, Nagwaney S, Lawrence GW, Johnson E, Smith L, Aoki KR, Dolly JO. Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B, C1, E, and F compared with the long lasting type A. Basis for distinct durations of inhibition of exocytosis in central neurons. *J Biol Chem*. 2003 Jan 10; 278(2):1363-71. [pub. elec. de 14 de octubre de 2002]

John M. Walker, Humana Press; "The Protein Protocols Handbook (Methods in Molecular Biology)", volumen: 2 (febrero de 2002), ISBN-10: 0896039404, ISBN-13: 978-0896039407

Jurasinski CV, Lieth E, Dang Do AN, Schengrund CL Correlation of cleavage of SNAP-25 with muscle function in a rat model of Botulinum neurotoxin type A induced paralysis *Toxicon*. 2001; 39(9):1309-15

Robert K. Scopes, "Protein Purification: Principles and Practice", Editorial: Springer, Berlín; edición: 3 Sub (enero de 1994), ISBN-10: 0387940723, ISBN-13: 978-0387940724

La presente invención se ejemplifica ahora adicionalmente a modo de ejemplos no limitados mencionados a continuación en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Construcción de un plásmido de expresión

5 Se amplifica la secuencia de ADN de la cadena pesada de toxina botulínica A a partir de ADN cromosómico de *C. botulinum* tipo A (n.º de la base de datos AAA23262) mediante PCR. En el extremo 5' se añade una secuencia que codifica para la secuencia de reconocimiento de trombina. En el extremo 3' se añade una secuencia de ADN, que
 10 codifica para un péptido de etiqueta de afinidad, adecuado para la purificación posterior (por ejemplo etiqueta de His o etiqueta de estrep.). Se inserta el ADN en un plásmido de expresión. Las secuencias de ADN para la cadena ligera primera y segunda también son de serotipo A y se amplifican de manera similar a partir de ADN cromosómico de *C. botulinum* de tipo A (n.º de la base de datos AAA23262) mediante PCR. Entonces se introduce la secuencia de la
 15 cadena ligera dos veces de manera consecutiva en el plásmido de expresión aguas arriba de la secuencia de reconocimiento de trombina (TE). Por tanto, en total las secuencias muestran la siguiente estructura codificante: LC-LC-TE-HC-Etiqueta.

Ejemplo 2 - Producción de la proteína de fusión en *E. coli*

20 Se transfecta la proteína de fusión en *E. coli* TG1. Se realiza la inducción a 21°C durante 4 horas. Entonces se purifica la proteína de fusión mediante cromatografía en columna de StrepTactin-Sepharose (IBA GmbH, Gottingen) según el protocolo de los fabricantes. Entonces se activa la proteína de fusión mediante trombina inmovilizada (Trombina-Sepharose) que escinde la unión peptídica entre la cadena pesada y las dos cadenas ligeras. Sólo permanecen conectadas las subunidades de la proteína mediante enlaces disulfuro.

25 Ejemplo 3 - Prueba de persistencia (extensor corto de los dedos, EDB)

A una persona de prueba se le aplican 4 unidades de Xeomin® (Merz Pharmaceuticals GmbH) en el EDB derecho solubilizado en 0,1 ml de solución salina fisiológica y en el EDB izquierdo 4 unidades de una toxina botulínica
 30 modificada (proteína de fusión de toxina botulínica tipo A conjugada con una cadena ligera adicional de toxina botulínica tipo A). Cada 30 días se mide electrofisiológicamente el "potencial de acción muscular compuesto" (CMAP). Después de 90 días se reduce la amplitud del CMAP del EDB derecho aproximadamente un 40% (en comparación con la actividad de partida) mientras que en el EDB del lado izquierdo se reduce la amplitud a aproximadamente el 70%. En el lado izquierdo el CMAP alcanza el 40% después de 150 días.

35 Ejemplo 4 - Prolongación de la persistencia

Se trata un paciente que padece tortícolis espasmódica con Botox® (Allergan, Inc.) (240 unidades). Debe tratarse cada 10 a 12 semanas en un departamento neurológico debido a una actividad disminuida de la toxina botulínica.
 40 Entonces el paciente recibe una inyección de 240 unidades de una neurotoxina modificada (toxina botulínica tipo A con una cadena ligera fusionada adicional de toxina botulínica tipo A). El paciente no necesita inyecciones adicionales hasta 18 semanas después del primer tratamiento.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido que comprende:

5 (a) un dominio de cadena pesada (HC), o fragmento del mismo, del componente neurotóxico de una toxina clostridial;

(b) un primer dominio de cadena ligera (LC), o fragmento del mismo, del componente neurotóxico de una toxina clostridial; y

10 (c) al menos un dominio de cadena ligera (LC) adicional, o fragmento del mismo, del componente neurotóxico de una toxina clostridial;

15 en el que los dominios están conectados mediante un enlace covalente, un ligador peptídico, un ligador químico, un enlace disulfuro, o una combinación de dos o más de los mismos,

en el que el primer y el al menos un dominio de LC adicional pueden ser iguales o diferentes entre sí, y en el que cada uno de dichos fragmentos de dicho primer y de dicho al menos un dominio de LC adicional presenta actividad proteolítica de más del 10% del correspondiente dominio de LC de tipo natural en un ensayo de SNAP-25, y el fragmento del dominio de HC puede unirse al receptor del dominio de HC nativo del que se deriva, y también puede translocar un dominio de LC unido al mismo.

25 2. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos de dicho(s) dominio(s) de LC y/o de HC es al menos el 50% idéntica a la secuencia de aminoácidos del componente neurotóxico de toxina botulínica de serotipo A1 depositada en la base de datos GenBank con el número de registro AAA23262.

3. Polipéptido según la reivindicación 1 ó 2, seleccionado del grupo que consiste en:

30 LCB_oNT/A-LCB_oNT/A-HCB_oNT/A, LCB_oNT/C-LCB_oNT/A-HCB_oNT/A,

LCB_oNT/B-LCB_oNT/A-HCB_oNT/A, LCB_oNT/A-LCB_oNT/C-HCB_oNT/C,

LCB_oNT/C-LCB_oNT/C-HCB_oNT/C, LCB_oNT/B-LCB_oNT/C-HCB_oNT/C y

35 LCTeNT-LCB_oNT/A-HCB_oNT/A.

4. Ácido nucleico que codifica para el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

40 5. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 4.

6. Célula huésped que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 4 o el vector según la reivindicación 5.

45 7. Método para producir un polipéptido que comprende las etapas de cultivar la célula huésped según la reivindicación 6, producir y purificar dicho polipéptido codificado por dicho ácido nucleico o vector y, opcionalmente, formular dicho polipéptido en una composición farmacéutica.

8. Composición que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

50 9. Composición según la reivindicación 8, para uso en un tratamiento terapéutico.

10. Uso del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para tratamiento cosmético.