

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 261**

51 Int. Cl.:

C12N 9/52

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2011** **E 13184864 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017** **EP 2677029**

54 Título: **Métodos para la fabricación de polipéptidos procesados proteolíticamente**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
27.09.2017

73 Titular/es:

**IPSEN BIOINNOVATION LIMITED (100.0%)
102 Park Drive Milton Park
Abingdon, Oxfordshire OX14 4RY, GB**

72 Inventor/es:

RUMMEL, ANDREAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 634 261 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

Métodos para la fabricación de polipéptidos procesados proteolíticamente

Descripción

En el presente documento se describe un nuevo polipéptido proteolíticamente activo y diversos usos del polipéptido en métodos de cribado y fabricación.

Clostridium botulinum y *Clostridium tetani* producen neurotoxinas altamente potentes, es decir, neurotoxinas botulínicas (BoNTs) y la neurotoxina tetánica (TeNT), respectivamente. Estas neurotoxinas clostridiales (CNTs) se unen específicamente a las células neuronales y alteran la liberación de neurotransmisores. *Clostridium botulinum* secreta siete serotipos antigénicamente distintos designados A a G de la neurotoxina botulínica (BoNT). Todos los serotipos junto con la neurotoxina relacionada con el tétanos (TeNT) secretada por *Clostridium tetani*, son Zn²⁺-endoproteasas que bloquean la exocitosis sináptica mediante la escisión de proteínas implicadas en la formación del complejo SNARE que controla la fusión de la membrana celular. Las CNT causan la parálisis muscular flácida que se observa en el botulismo y el tétanos. Además, se ha demostrado que la actividad de la CNT afecta a la secreción glandular. Estos efectos fisiológicos de las CNT sobre la actividad muscular y glandular se utilizan cada vez más en diversas aplicaciones terapéuticas y cosméticas. La neurotoxina botulínica del serotipo A (BoNT/A) fue aprobada para uso humano en los Estados Unidos en 1989 para el tratamiento del estrabismo, blefaroespasma y otros trastornos. Está comercialmente disponible como una preparación de proteína de toxina botulínica A, por ejemplo, bajo el nombre comercial BOTOX (Allergan Inc.) y bajo el nombre comercial DYSPORT (Ipsen Ltd). Para la aplicación terapéutica, un complejo que comprende la neurotoxina y proteínas bacterianas adicionales se inyecta directamente en el músculo a tratar. A pH fisiológico, la toxina se libera del complejo proteico (Eisele et al. 2011, *Toxicon* 57 (4): 555-65.) y tiene lugar el efecto farmacológico deseado. Una preparación mejorada de BoNT/A que está libre de proteínas complejantes está disponible con los nombres comerciales XEOMIN o Bocouture (Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt/Alemania). El efecto de la BoNT es sólo temporal, razón por la cual se requiere habitualmente la administración repetida de BoNT para mantener un efecto terapéutico.

Cada CNT se sintetiza inicialmente como un polipéptido de cadena única inactivo. En el caso de BoNT, el polipéptido de neurotoxina tiene un peso molecular de aproximadamente 150 kDa. El procesamiento postraducciona de este polipéptido de cadena única implica una proteólisis limitada en una región expuesta llamada bucle (véase la tabla 1) y la formación de un puente disulfuro próximo. La neurotoxina di-cadena activa consiste en dos productos de escisión resultantes de la hidrólisis proteolítica del polipéptido precursor de cadena sencilla: una cadena ligera N-terminal de aprox. 50 kDa y una cadena pesada de aprox. 100 kDa unidas por un enlace disulfuro. Las CNT estructuralmente consisten en tres dominios, es decir, la cadena ligera catalítica, la cadena pesada que abarca el dominio de translocación (mitad N-terminal) y el dominio de unión al receptor (mitad C-terminal) (cf. Krieglstein 1990, *Eur J Biochem* 188: 39; Krieglstein 1991, *Eur J Biochem* 202: 41; Krieglstein 1994, *J Protein Chem* 13: 49; Lacy et al., 1998, *Nat. Struct. Biol.* 5(10): 898 - 902). Dependiendo del número de sitios de escisión presentes en la cadena única entre los residuos de aminoácidos que forman el dominio catalítico y los residuos de aminoácidos que forman el dominio de translocación, la actividad de endopeptidasa puede dar lugar a dos productos de escisión grandes, es decir, la cadena ligera y la cadena pesada y, además, péptidos cortos característicos que representan la región del bucle anterior, uniendo en la cadena única de la neurotoxina lo que se convertirá en la cadena ligera y pesada (véase la tabla 1).

La purificación de las CNT a partir de la solución de fermentación es un desafío particular, puesto que las neurotoxinas están contenidas en la misma como una mezcla de polipéptidos no procesados, parcialmente procesados y completamente procesados, todos los cuales tienen propiedades bioquímicas y físicas muy similares. Las neurotoxinas procesadas parcialmente se generan típicamente, si la actividad endoproteolítica ha hidrolizado el enlace peptídico entre la cadena ligera y el bucle, mientras que el enlace peptídico entre el bucle y el extremo N de la cadena pesada está todavía intacto. Además, también puede crearse la neurotoxina parcialmente procesada si la actividad endoproteolítica ha liberado el péptido de bucle de la cadena pesada, mientras que el enlace peptídico entre el péptido de bucle y el extremo C-terminal de la cadena ligera aún no se ha hidrolizado. Dependiendo de las condiciones de fermentación y del tipo de neurotoxina, el polipéptido completamente procesado que está desprovisto del péptido del bucle puede contaminarse significativamente, con entre 5% a 90% de polipéptido parcialmente procesado o no procesado. Sin embargo, en algunos casos, la neurotoxina está principalmente sin procesar y, antes del uso terapéutico, necesita ser tratada con una endopeptidasa para ser biológicamente activa.

La técnica anterior describe varios intentos de tratar neurotoxinas clostridiales con proteasas heterólogas con el fin de reducir la cantidad de proteína precursora no procesada o parcialmente procesada. La proteasa más utilizada para la activación de neurotoxinas clostridiales, la tripsina, siendo útil para activar las neurotoxinas clostridiales de los serotipos B (BoNT/B) y E (BoNT/E) (DasGupta & Sugiyama 1972, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48:108-112; Kozaki et al., 1974, *Infect. Immun.* 10:750-756) parece producir productos secundarios, presumiblemente por acción proteolítica cerca del extremo C-terminal de la subunidad pesada de BoNT/A y, por tanto, parece destruir la unión de la toxina a su receptor celular (Shone et al., 1985, *Eur. J. Biochem.* 151:75-82). Teóricamente se esperan productos de escisión más específicos de las proteasas endógenas, aisladas del huésped nativo, tales como BoNT/A de *C. botulinum*. Por consiguiente, se han hecho varios intentos para aislar de la célula huésped nativa la proteasa

endógena implicada en la activación proteolítica de las neurotoxinas clostridiales. Dekleva & DasGupta (Dekleva y DasGupta, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comun. 162:767-772) purificaron a partir de cultivos de *C. botulinum* que producen BoNT/A una fracción capaz de escindir proteolíticamente BoNT/A en una subunidad pesada y ligera. Estudios posteriores de los mismos autores caracterizaron además la proteasa endógena aislada de *C. botulinum* (Dekleva y DasGupta, 1990, J. Bact. 172:2498-2503) y revelaron una proteína de 62 kDa, compuesta por un polipéptido de 15,5 kDa y un polipéptido de 48 kDa. Sin embargo, la observación de una fragmentación considerable de las CNT después de una exposición limitada a la proteína de 62kDa de Dekleva & DasGupta sugiere que la proteasa aislada puede no ser la enzima proteolítica no identificada responsable de la activación de las CNT en cultivos de células clostridiales y durante la infección. De hecho, otros han sugerido recientemente que el Clostripain, también designado clostridiopeptidasa B (Mitchel y Harrington, 1968, JBC 243: 4683 - 4692), podría estar implicado en la activación específica de las CNT (Sebahia et al., 2007, Genome Res. 17(7): 1082 - 1092; documento WO2009/014854). Curiosamente, la estructura y la especificidad del sustrato de esta enzima son reminiscentes de los de la secretada alfa-clostripain de *Clostridium histolyticum* (Dargatz et al., 1993), un homólogo (74% de identidad de aminoácidos) del cual está presente en *C. Botulinum* (CBO1920). El alfa-clostripain de *C. Histolyticum* es una cisteína endopeptidasa con una especificidad estricta para el enlace arginilo. Se sintetiza como una prepro-enzima inactiva que experimenta una escisión autocatalítica para generar polipéptidos de 15,4 y 43 kDa, los cuales se asocian para formar una enzima activa heterodimérica (Dargatz et al., 1993). Ambos alfaclostripain de *C. histolyticum* y la proteasa de 62-kDa de *C. Botulinum* requieren un agente reductor y calcio para la actividad completa y son susceptibles a los mismos inhibidores de la proteasa. Estos datos sugieren definitivamente que el ortólogo de *C. Botulinum* de alfa-clostripain (CBO1920) es la proteasa endógena responsable de la mella proteolítica de la neurotoxina de *C. Botulinum*. Un gen que codifica clostripain (CPE0846) también está presente en *C. Perfringens*, y se ha encontrado que se regula positivamente por el sistema de dos componentes VirR/VirS (Shimizu et al., 2002b).

Sin embargo, hasta el día de hoy, faltan pruebas experimentales concluyentes y no está todavía disponible en la técnica una proteasa capaz de convertir eficientemente las CNT precursoras de cadena sencilla en los productos de escisión maduros auténticos, es decir, la neurotoxina de cadena di.

Los medios y métodos para reducir la cantidad de polipéptidos de neurotoxina no procesados y/o parcialmente procesados y, de este modo, para mejorar la calidad de los preparados de neurotoxina son altamente deseables pero aún no están disponibles. Por lo tanto, el problema técnico subyacente a la presente invención puede verse como la provisión de medios y métodos para mejorar la fabricación de polipéptidos de neurotoxina mediante el cumplimiento de las necesidades antes mencionadas. El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y en la presente memoria.

Se describe en la presente memoria un polipéptido proteolíticamente activo que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos una identidad de secuencia del 50% con la secuencia de SEQ ID NO: 1. En el presente documento se describe un polipéptido proteolíticamente activo que consiste en una secuencia polipeptídica que tiene al menos una identidad de secuencia del 50% con la secuencia de SEQ ID NO: 1. Se describe en este documento un polipéptido proteolíticamente activo que consiste en una secuencia polipeptídica como se muestra en la SEQ ID NO: 1.

La expresión "polipéptido proteolíticamente activo", como se usa en la presente memoria, se refiere a la función catalítica del polipéptido de la presente invención y significa que el polipéptido de la presente invención es capaz de hidrolizar un enlace peptídico. Un "polipéptido proteolíticamente activo" puede referirse a un polipéptido que es capaz de hidrolizar un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 25. La expresión "polipéptido proteolíticamente inactivo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la función catalítica del polipéptido de la presente invención y significa que el polipéptido de la presente invención es incapaz de hidrolizar un enlace peptídico.

El experto en la materia puede determinar si un polipéptido de acuerdo con la definición de secuencia mencionada en este documento es un polipéptido descrito en la presente memoria, probando la actividad proteolítica de dicho polipéptido. Un sistema de ensayo o prueba para determinar la actividad proteolítica comprende poner en contacto un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1 con un sustrato de prueba. Un sustrato de prueba es típicamente un polipéptido que se sabe que es escindible por un polipéptido descrito en la presente memoria. Se describe en este documento un sustrato de prueba que es una CNT tal como BoNT o un fragmento de la misma. El sustrato de prueba puede ser p. ej. BoNT no digerido/sin transformar, designado en la presente memoria como "scBoNT" y puede ser p. ej. de serotipo A, B, C1, D, E, F o G (por ejemplo, "scBoNT/A", "scBoNTB", etc.) o el sustrato de prueba puede ser la neurotoxina tetánica. Alternativamente, el sustrato de prueba puede ser un fragmento de una neurotoxina clostridial, comprendiendo dicho fragmento una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 25. El fragmento puede ser un polipéptido de 50 o más residuos de aminoácidos o un péptido de hasta 49 restos de aminoácidos. Tal como se utiliza a lo largo de la presente memoria descriptiva, el término "polipéptido" se refiere a moléculas con 50 o más residuos de aminoácidos, mientras que el término "péptido" se refiere a moléculas con de 2 a 49 residuos de aminoácidos. El sustrato de prueba puede ser un fragmento de neurotoxina soluble llamado LHN que comprende el polipéptido de cadena ligera, la región de péptido de bucle expuesto y la mitad N-terminal del polipéptido de cadena pesada, el dominio de translocación H_N. El sustrato de prueba puede ser o puede comprender

un péptido seleccionado de cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 25 (véase la tabla 1). El sustrato de prueba puede ser una neurotoxina quimérica que comprende residuos de aminoácidos derivados de dos o más serotipos.

Un ensayo para determinar la actividad proteolítica comprendería típicamente una etapa de determinar el grado de conversión del sustrato de prueba en su(s) producto(s) de escisión. La observación de uno o más productos de escisión generados después de ponerse en contacto el polipéptido con el sustrato de ensayo o la observación de un aumento en la cantidad de producto(s) de escisión es indicativa de la actividad proteolítica del polipéptido. Dicha etapa de determinación puede implicar comparar el sustrato y el (los) producto(s) de escisión. Dicha comparación puede implicar determinar la cantidad de sustrato y/o la cantidad de uno o más productos de escisión y también puede implicar el cálculo de la relación de sustrato y producto(s) de escisión. Además, el ensayo para determinar la actividad proteolítica puede comprender una etapa de comparación de una muestra de ensayo con una muestra de referencia, en la que la muestra de referencia comprende típicamente (a) un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1 y que se sabe que es proteolíticamente activo y (b) un sustrato de ensayo conocido por ser escindible por el polipéptido de (a). El ensayo para determinar la actividad proteolítica puede comprender separar el sustrato y los producto(s) de escisión por electroforesis o por cromatografía en columna y, opcionalmente, un análisis espectrométrico. Puede ser conveniente marcar el sustrato de ensayo con uno o más marcadores con el fin de detectar con mayor facilidad la disminución del sustrato de ensayo y/o el aumento del producto(s). El término "marcador", tal como se utiliza en la presente memoria, significa marcador detectable e incluye, por ejemplo, un marcador radioactivo, anticuerpo, marcador fluorescente. La cantidad de sustrato de ensayo y/o producto de escisión se puede determinar p. ej. por métodos de autorradiografía o espectrometría, incluyendo métodos basados en la transferencia de resonancia de energía entre al menos dos marcadores. Alternativamente, se pueden usar métodos inmunológicos tales como Western blot o ELISA para la detección. Un ensayo preferido para determinar la actividad proteolítica de un polipéptido enseñado en la presente invención se describe a continuación en los Ejemplos. Un polipéptido puede ser proteolíticamente activo, si más del 20%, preferiblemente más del 95% del sustrato de ensayo se convierte en los productos de escisión tales como la cadena ligera y la cadena pesada en 120 minutos a 37°C usando un tampón seleccionado entre Tris – HCl 100 mM, pH 8,0 o PBS (NaHPO₄ 50 mM₂, NaCl 150 mM, pH 7,4). Se aplican las mismas condiciones, si el sustrato de ensayo no es una neurotoxina de longitud completa, sino, en cambio, p. ej., un fragmento de la neurotoxina de longitud completa o un derivado de la neurotoxina. Es evidente que los productos de escisión difieren en este caso. Sin embargo, el experto en la materia puede cuantificar los correspondientes productos de escisión. Típicamente, se pueden usar en el ensayo 100 ng de polipéptido proteolíticamente activo y una relación molar de 1:100 con respecto al sustrato. Se puede tomar una muestra a intervalos para seguir la actividad catalítica a lo largo del tiempo. El ensayo puede modificarse, p. ej. utilizando múltiples cantidades del polipéptido proteolíticamente activo.

La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia polipeptídica de un polipéptido proteolíticamente inactivo derivado de una cepa ATCC 3502 de *Clostridium botulinum*, n° de acceso GenBank: "CAL82988.1", que tiene una longitud de aminoácidos de 581 residuos. La SEQ ID NO: 1 muestra un derivado proteolíticamente activo de SEQ ID NO: 2, que carece de los residuos de aminoácidos 1 a 248 de SEQ ID NO: 2.

La expresión "polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos una identidad de secuencia del 50% con la secuencia de SEQ ID NO: 1" se refiere a un polipéptido que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1. Además, la expresión se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1. Dicho polipéptido puede tener aminoácidos adicionales, por ejemplo en una posición interna o N- o C-terminal a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 o en una posición interna o N- o C-terminal a una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50% idéntica con la secuencia de SEQ ID NO: 1, en el que una metionina puede estar presente en el extremo N del polipéptido. Además, la expresión se refiere a un polipéptido que carece de uno o más residuos de aminoácidos, por ejemplo en una posición interna o en el extremo N o C de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en una posición interna o el N - o C - terminal de secuencia que es al menos 50% idéntica en secuencia a SEQ ID NO: 1.

La expresión "identidad de secuencia", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la determinación de la identidad entre una secuencia de aminoácidos de referencia y una secuencia de consulta en la que las secuencias están alineadas de modo que se obtiene la coincidencia de orden más alto y que se puede calcular usando técnicas publicadas o métodos codificados en programas informáticos como, por ejemplo, BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul 1990, J Mol Biol 215: 403). Los valores de identidad porcentual están en un aspecto calculados sobre toda la secuencia de aminoácidos. La identidad de secuencia puede calcularse sobre una longitud de secuencia de hasta residuos de 50aa, hasta 100aa, hasta 150aa, hasta 250aa, 300aa, 350aa, 400aa, 450aa, 500aa o residuos de 550aa.

La identidad de la secuencia se puede calcular sobre al menos residuos de 50aa, al menos 100aa, al menos 150aa o al menos residuos de 250aa. La identidad de secuencia puede determinarse a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 1 ó 2, es decir, en una longitud de 333aa o 581aa, respectivamente. Una serie de programas basados en una variedad de algoritmos está disponible para el experto en la técnica para comparar secuencias diferentes. En este contexto, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman dan resultados particularmente fiables. Para llevar a cabo las alineaciones de secuencias y calcular los valores de identidad de secuencia en este documento

indicados, se utilizó el programa comercial DNASTAR Lasergene MegAlign versión 7.1.0 basado en el algoritmo Clustal W en toda la región de secuencias con los siguientes parámetros: Parámetros de alineación por pares: penalización de espacio: 10,00, penalización de longitud de espacio : 0,10, Matriz de peso de la proteína Gonnet 250, que, a menos que se especifique lo contrario, se utilizarán siempre como ajustes estándar para las alineaciones de secuencia.

La expresión "al menos 50% de identidad de secuencia", tal como se utiliza en la presente memoria, significa al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80% al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o el 100%.

El polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria puede tener el mismo número de aminoácidos que la secuencia polipeptídica de referencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1. También se incluyen polipéptidos que tienen residuos de aminoácidos adicionales o menos. En el presente documento se describe un polipéptido proteolíticamente activo que es o comprende un mutante truncado de la SEQ ID NO: 1 ó 2 o de un polipéptido que tiene al menos una identidad de secuencia del 50% con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 ó 2. El mutante de truncamiento de SEQ ID NO: 2 puede carecer, por ejemplo, de uno o más residuos aminoácidos N-terminales a la posición de aminoácidos 249. Un mutante de truncamiento puede ser un mutante de truncamiento N o C-terminal y/o un mutante de truncamiento interno que es proteolíticamente activo. En la presente memoria descriptiva se describe un mutante de truncamiento de SEQ ID NO: 2 que carece de las posiciones de aminoácidos 1 a 248 de SEQ ID NO: 2. Se describe en este documento un mutante truncado de la SEQ ID NO: 2 que es un mutante de truncamiento C-terminal. En este documento se describe un mutante de truncamiento que carece de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 100, 150 o hasta 170 residuos de aminoácidos consecutivos. En el presente documento se describe un polipéptido proteolíticamente activo que tiene una longitud de aminoácidos de al menos residuos de 200aa, de al menos residuos de 250aa, de al menos residuos de 300aa o de al menos residuos de 333aa. En el presente documento, se describe un polipéptido proteolíticamente activo que tiene residuos de hasta 333aa, residuos de hasta 350aa, residuos de hasta 573, residuos de hasta 581aa, residuos de hasta 592aa, residuos de hasta 600aa o hasta 617aa.

En el presente documento se describe un polipéptido proteolíticamente activo que abarca un polipéptido que comprende residuos de aminoácidos adicionales en el extremo N o C y/o en una posición interna de la cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 1 o una secuencia polipeptídica que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1. Estos residuos de aminoácidos adicionales pueden comprender hasta 5, hasta 10 o incluso hasta 200, 300 o hasta 400 residuos de aminoácidos consecutivos. Los residuos de aminoácidos adicionales pueden funcionar como un inhibidor de la actividad proteolítica. Los residuos de aminoácidos adicionales pueden eliminarse mediante una proteasa. Pueden excluirse residuos adicionales que inhiban la actividad proteolítica del polipéptido. Los residuos de aminoácidos adicionales pueden estar flanqueados por uno o más sitios de escisión de proteasas. La secuencia de aminoácidos adicional puede funcionar como un marcador detectable y/o permite la unión a un soporte sólido.

Se describe en este documento una cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de un polipéptido que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1 que se modifica intercambiando uno o más residuos de aminoácido. El término "intercambio", tal como se utiliza en este documento, significa reemplazar un aminoácido por un aminoácido diferente. Por ejemplo, se pueden sustituir hasta 1aa, 2aa, 3aa, 4aa, 5aa, 6aa, 7aa, 8aa, 9aa, 10aa, 15aa, 20aa o hasta 50aa dentro de la secuencia polipeptídica. Los intercambios pueden implicar cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, dirigidos, p. ej. al aumentar o disminuir la unión al sustrato o la actividad proteolítica del polipéptido descrito en el presente documento.

Se describe en este documento un polipéptido proteolíticamente activo que abarca un polipéptido que es capaz de hidrolizar un sustrato en dos o más productos de escisión nativos. Se describe en este documento un polipéptido que hidroliza el sustrato en dos o más productos de escisión que difieren de los productos de escisión nativa. La expresión "productos de escisión nativa" o "productos nativos", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a productos, que son idénticos en la secuencia de aminoácidos cuando se comparan con productos generados a partir del mismo sustrato en cultivos de células de tipo salvaje, de los cuales se origina el sustrato. En el presente documento se describe un producto de escisión que es la neurotoxina de cadena doble de una neurotoxina botulínica o una neurotoxina tetánica, una neurotoxina de di-cadena que es una neurotoxina aislada de *C. botulinum* del serotipo A, B, C1, D, E, F o G. En otra descripción más, dicha neurotoxina de di-cadena es una neurotoxina nativa de di-cadena.

La tabla 1 muestra el precursor, la neurotoxina di-cadena nativa de TeNT y de BoNT/A-G e identifica el bucle expuesto que comprende la secuencia de aminoácidos escindida por el polipéptido descrito en el presente documento.

ES 2 634 261 T3

Toxina	Bucle expuesto	LC	H _N	H _{CN}	H _{CC}
BoNT/A1	SEQ ID NO: 4	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A2	SEQ ID NO: 5	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A3	SEQ ID NO: 6	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A3	SEQ ID NO: 7	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A4	SEQ ID NO: 8	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A5	SEQ ID NO: 9	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A6	SEQ ID NO: 5	M1-K438	A449-N872	I873-S1093	N1094-L1297
BoNT/A7	SEQ ID NO: 10	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/B1	SEQ ID NO: 11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B2	SEQ ID NO: 12	M1-R441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B3	SEQ ID NO: 12	M1-R441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B4bv	SEQ ID NO: 11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B5nP	SEQ ID NO: 13	M1-K441	V442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B6	SEQ ID NO: 11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/C1	SEQ ID NO: 14	M1-R444	T450-I868	N869-L1092	Q1093-E1291
BoNT/CD	SEQ ID NO: 14	M1-R444	T450-I868	N869-Q1083	I1084-E1280
BoNT/D	SEQ ID NO: 15	M1-K442	D446-I864	N865-Q1079	I1080-E1276
BoNT/DC	SEQ ID NO: 16	M1-R442	D446-I864	N865-L1088	Q1089-E1285
BoNT/E1-E5	SEQ ID NO: 17	M1-K419	S424-I847	K848-P1067	N1068-K1252
BoNT/E6	SEQ ID NO: 18	M1-K419	S424-I847	K848-P1067	N1068-K1252
BoNT/F1	SEQ ID NO: 19	M1-R435	A440-I866	K867-P1085	D1086-N1278
BoNT/F2	SEQ ID NO: 20	M1-R435	Q440-I866	K867-P1088	D1089-E1280
BoNT/F3	SEQ ID NO: 20	M1-R435	Q440-I866	K867-P1088	D1089-E1279
BoNT/F4	SEQ ID NO: 21	M1-R435	A440-I866	K867-P1085	D1086-E1277
BoNT/F5	SEQ ID NO: 22	M1-K434	P440-I863	K864-P1085	D1086-E1277
BoNT/F6	SEQ ID NO: 19	M1-R435	A440-I866	K867-P1088	D1089-E1275

Toxina	Bucle expuesto	LC	H _N	H _{CN}	H _{CC}
BoNT/F7	SEQ ID NO: 23	M1-K427	N432-I857	I858-P1076	D1077-E1268
BoNT/G	SEQ ID NO: 24	M1-K442	S447-I865	S866-S1086	S1087-E1297
TeNT	SEQ ID NO: 25	M1-R449	T456-K883	S884-L1109	S1110-D1315

Debe entenderse que las definiciones y explicaciones de los términos y expresiones anteriores y siguientes se aplican mutatis mutandis para todos los aspectos descritos en esta memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario.

- 5 El polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria es adecuado para diversas aplicaciones. Una aplicación comercialmente relevante es su uso en la producción de neurotoxinas terapéuticas, tales como las aisladas de *C. botulinum*. En la actualidad, los cultivos celulares de *C. botulinum* utilizados para la preparación de preparaciones comercialmente disponibles de neurotoxina botulínica están contaminados con cantidades significativas de neurotoxina parcialmente procesada y/o sin procesar, que alteran negativamente, es decir, reducen la actividad específica de estas composiciones farmacéuticas. Usando el polipéptido proteolíticamente activo o activado descrito en este documento, por ejemplo, después de la lisis de *C. botulinum*, ahora será posible tratar composiciones que comprenden la neurotoxina no procesada y/o parcialmente procesada y, por tanto, convertir estos contaminantes en neurotoxina completamente procesada. En consecuencia, los productos comerciales pueden proporcionarse con una actividad específica incrementada de la neurotoxina, en la que la cantidad total de proteína bacteriana puede reducirse, reduciendo aún más el riesgo de los pacientes de la formación de anticuerpos.

Se describe en este documento una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente invención y, opcionalmente, elementos reguladores. La expresión "elementos reguladores", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a elementos reguladores de la expresión génica, incluyendo la transcripción y la traducción, e incluye elementos tales como caja tata, promotor, potenciador, sitio de unión a ribosomas, secuencia Shine-Dalgarno, región IRES, señal de poliadenilación, estructura de terminación terminal y similares. Dicho elemento regulador puede comprender uno o más elementos reguladores heterólogos o uno o más elementos reguladores homólogos. Un "elemento regulador homólogo" es un elemento regulador de una célula de tipo salvaje, a partir de la cual se deriva la molécula de ácido nucleico de la presente invención, que está implicada en la regulación de la expresión génica de la molécula de ácido nucleico o del polipéptido en dicha célula de tipo salvaje. Se describen en este documento moléculas de ácido nucleico que comprenden elementos reguladores heterólogos. La expresión "elemento regulador heterólogo" es un elemento regulador que no está implicado en la regulación de la expresión génica de la molécula de ácido nucleico o del polipéptido en dicha célula de tipo salvaje. También se incluyen elementos reguladores para la expresión inducible, tales como promotores inducibles. La molécula de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, hnRNA, mRNA, ARN, ADN, PNA, LNA y/o moléculas de ácido nucleico modificadas. La molécula de ácido nucleico puede ser circular, lineal, integrada en un genoma o episomal. También se incluyen los concatémeros que codifican proteínas de fusión que comprenden tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez polipéptidos de la presente invención. Además, la molécula de ácido nucleico puede contener secuencias que codifican secuencias señal para el transporte intracelular tales como señales para el transporte a un compartimento intracelular o para el transporte a través de la membrana celular.

Se enseña un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria. Un vector puede ser adecuado para la expresión in vitro y/o in vivo del polipéptido descrito en la presente memoria. El vector puede ser un vector para la expresión génica transitoria y/o estable. En la presente memoria se describe un vector que comprende además elementos reguladores y/o marcadores de selección. En el presente documento se describe un vector de origen viral, de origen de fago o de origen bacteriano.

Se describe en este documento una célula que comprende la molécula de ácido nucleico o el vector que se enseña en la presente memoria. El término "célula", tal como se utiliza en la presente memoria, abarca células procarióticas y/o eucariotas adecuadas para expresar dicha molécula de ácido nucleico o dicho vector y en particular el polipéptido descrito en la presente memoria. Dicha célula puede ser una célula huésped que no expresa el polipéptido descrito en la presente memoria o un homólogo del mismo. El término "homólogo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos una identidad de secuencia del 50% con la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Sin embargo, también se describen en este documento células, en particular células de tipo salvaje, que expresan el polipéptido descrito en la presente memoria o un homólogo del mismo. La célula descrita en este documento puede seleccionarse de *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* y *C. tetani*. La célula puede ser *C. botulinum* del serotipo A, B o F. La célula puede ser la cepa Hall (ATCC 3502) de *C. botulinum*. La célula puede ser la cepa productora de BoNT/A ATCC 19397, también conocida como NCTC 4587 y NCTC 7272 de *C. botulinum*.

La célula puede ser la cepa productora de BoNT/A NCTC 2916 de *C. botulinum*. Dicha célula puede ser las cepas productoras de BoNT/A2 Kyoto-F y Mauritius/NCTC 9837 de *C. botulinum*. Dicha célula puede ser la cepa productora de BoNT/A3 A254 Loch Maree/NCTC 2012 de *C. botulinum*. Dicha célula puede ser la cepa productora de BoNT/A4 y B CDC657 de *C. botulinum*. Dicha célula puede ser la cepa productora de BoNT/A5 y B3' H04402 065 de *C. botulinum*. Dicha célula puede ser la cepa productora de BoNT/B1 Okra/NCTC 7273 de *C. botulinum*. Dicha célula puede ser la cepa productora de BoNT/B y F CDC4013/NCTC 12265 de *C. botulinum*. Dicha célula puede ser la cepa productora de BoNT/F1 Langeland/NCTC 10281 de *C. botulinum*. Dicha célula puede ser *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium acetobutylicum*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. thermoproteolyticus*, *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli* o una célula de levadura. El polipéptido descrito en este documento puede modificarse dentro de la célula (es decir, glicosilado, fosforilado, procesado por proteasas, etc.). La modificación también incluye la adición de cofactores no proteináceos incluyendo iones metálicos. Se describen en este documento células que comprenden el polipéptido proteolíticamente inactivo descrito anteriormente, cualquier producto polipeptídico intermedio, así como el polipéptido proteolíticamente activo final descrito en la presente memoria. También se describen en este documento células que comprenden un inductor de la expresión del polipéptido descrito en la presente memoria. Tal inductor de la expresión puede ser una molécula de ácido nucleico o un polipéptido o una entidad química, incluyendo una pequeña entidad química, que tiene el efecto de incrementar la cantidad o actividad del polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria en cultivos celulares o lisados de los mismos. El inductor de la expresión puede, p. ej., aumentar la transcripción o traducción de una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido descrito en el presente documento. Alternativamente, el inductor de la expresión puede ser un compuesto capaz de activar el polipéptido proteolíticamente inactivo SEQ ID NO: 2 o un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 2. Se describe en este documento una célula que comprende un inductor que es un polipéptido proteolíticamente activo capaz de eliminar residuos de aminoácidos inhibidores del extremo N de dicho polipéptido. El inductor puede expresarse, por ejemplo, por medios recombinantes conocidos por los expertos en la técnica. Alternativamente, el inductor puede aislarse de una célula, p. ej., de una celda clostridial.

En la presente memoria se describe el uso de la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento para la fabricación del polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria.

Se describe en la presente memoria un método para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente activo, que comprende las etapas de: (a) sintetizar químicamente o traducir a partir de una secuencia de nucleótidos un polipéptido, que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1; y (b) purificar el polipéptido de la etapa (a).

La expresión "sintetizar químicamente" significa sintetizar polipéptidos por medios químicos. Estos métodos se revisan, por ejemplo, en Nilsson et al., Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2005. 34: 91-118. La expresión "purificar el polipéptido" significa retirar de una mezcla que comprende el polipéptido descrito en este documento compuestos distintos a dicho polipéptido. La expresión también significa retirar el polipéptido descrito en el presente documento de una mezcla que comprende compuestos distintos de dicho polipéptido. La expresión puede significar separar el polipéptido proteolíticamente activo de su precursor proteolíticamente inactivo.

El ácido nucleico puede traducirse en una célula o en un sistema libre de células. Varios sistemas para la traducción libre de células están disponibles para los expertos en la técnica. La traducción en un sistema de traducción de proteínas sin células que comprende lisados de reticulocitos de conejo, lisados de germen de trigo, lisados de *E. coli* u otros lisados celulares, por ejemplo, lisados generados a partir de *C. botulinum* y similares se describe en la presente memoria. También se describe en este documento traducir el polipéptido descrito en el presente documento a partir de la secuencia de nucleótidos o del vector descrito en el presente documento. La transcripción puede ser regulada o controlada por uno o más elementos reguladores heterólogos o por elementos reguladores homólogos. También se describe en este documento la traducción en una célula de tipo salvaje, es decir, una célula aislada de la naturaleza, tal como cualquier aislado conocido de *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* y *C. tetani*. Dicha célula puede ser la cepa Hall de *C. botulinum* (ATCC 3502). Están disponibles para el experto en la técnica diversos medios y métodos estándar para llevar una molécula de ácido nucleico o un vector a la célula y para expresar el polipéptido descrito en la presente memoria como proteína recombinante en una célula. Además, el experto en la técnica conoce muchas técnicas estándar para aislar polipéptidos de células o lisados celulares o sistemas de expresión libres de células (p. ej., Recombinant DNA Principles and Methodologies, J. Green, Marcel Dekker Inc., 1998; The Condensed Protocols: From Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al, Cold Spring Harbor Laboratory, 2006; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 2000). Cualquiera de estos medios y métodos se pueden utilizar en los métodos descritos en la presente memoria.

El primer polipéptido descrito en la presente memoria puede traducirse a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido proteolíticamente activo. La SEQ ID NO: 26 es un ejemplo de dicha molécula de ácido nucleico. Alternativamente, dicha molécula de ácido nucleico puede codificar un polipéptido precursor que es proteolíticamente inactivo, pero que puede convertirse en el polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. La SEQ ID NO: 27 es un ejemplo de dicha molécula de ácido nucleico. El precursor proteolíticamente inactivo también se denomina "BoNTHydrolase inactiva", abreviado iBH. Este polipéptido

proteolíticamente inactivo puede, p. ej., ser activado durante o después de la traducción o poniendo en contacto, por ejemplo, dicho polipéptido proteolíticamente inactivo con una proteasa capaz de eliminar los residuos de aminoácidos inactivantes en el extremo N del polipéptido proteolíticamente inactivo. Un ejemplo de un polipéptido proteolíticamente inactivo es el polipéptido representado por SEQ ID NO: 2. Otro ejemplo es un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 2. La expresión "inactivar residuos de aminoácidos en el extremo N" en un aspecto se refiere a los primeros restos de 248aa de dicho polipéptido. Esta expresión puede referirse a un fragmento de hasta 10aa, 50aa, 100aa, 150aa, 200aa, 250aa residuos de dicho polipéptido. Cualquiera de estos polipéptidos es útil en el método para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. Se describe en este documento una proteasa capaz de eliminar los residuos de aminoácidos inactivos del extremo N de este polipéptido que se aísla, p. ej., de *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium baratii* y *Clostridium tetani*. En el presente documento se describe una proteasa capaz de eliminar dicho aminoácido inactivante proporcionando un lisado fraccionado o no fraccionado de dichas células. Los residuos de aminoácidos inactivantes se pueden eliminar poniendo en contacto el polipéptido proteolíticamente inactivo con dicho lisado e incubando hasta que el polipéptido proteolíticamente inactivo se transforme en el polipéptido proteolíticamente activo.

En el presente documento se describe un método en el que el polipéptido se traduce en una célula. La célula puede ser una célula procariota o eucariótica. Se describe en este documento una célula seleccionada entre *E. coli*, *B. subtilis* o levadura. También se describe en este documento la traducción del polipéptido descrito en el presente documento en una célula de tipo salvaje, es decir, una célula aislada de la naturaleza, tal como cualquier aislado conocido de *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium baratii* y *Clostridium tetani*. Dicha célula puede ser la cepa Hall de *C. botulinum* (ATCC 3502). Dicha célula puede ser la célula descrita anteriormente en este documento.

Los productos de traducción obtenidos por el método pueden purificarse por diversos medios, todos los cuales son conocidos por los expertos en la técnica (p. ej., *Recombinant DNA Principles and Methodologies*, J. Green, Marcel Dekker Inc., 1998; *The Condensed Protocols: From Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al, Cold Spring Harbor Laboratory, 2006; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 2000). Los métodos típicos de purificación del polipéptido descrito en la presente invención pueden implicar la centrifugación de lisado celular, la precipitación de proteínas con sulfato de amonio, la resuspensión de proteínas, la centrifugación de proteínas resuspendidas, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de exclusión por tamaños, la cromatografía de interacción hidrófoba y similares. Varias combinaciones de tales etapas, en orden diferente, pueden ser útiles para purificar el polipéptido. Un método para purificar el polipéptido se describe en los Ejemplos.

En una descripción, la etapa de purificación comprende la unión del polipéptido a un soporte sólido. La expresión "soporte sólido" se refiere a una matriz que abarca, p. ej., sílice, dextrano reticulado, poli(acrilamida) reticulada o agarosa reticulada y similares. También se incluyen, en particular, polipéptidos, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, polietilenglicol (PEG), dextrano, nilón, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas), gabros y magnetita. Un soporte sólido puede ser una matriz de polisacárido seleccionada del grupo que consiste en: sepharose, sephadex, agarosa, sephacell, microcelulosa y perlas de alginato. Dicho soporte sólido puede consistir en perlas de vidrio y/o matrices de polipéptidos.

En una descripción, el soporte sólido está unido al anticuerpo descrito en la presente memoria. El término "enlazado" significa, en una descripción, establemente unido o establemente asociado. En otra descripción, enlazado incluye interacciones tales como enlaces indirectos o directos, no reversibles o reversibles, físicos y químicos, electrostáticos y/o covalentes. En una descripción, el anticuerpo está unido covalentemente, directamente o a través de una molécula enlazadora, al soporte sólido. El anticuerpo puede unirse a dicho soporte sólido a través de un enlazante, incluyendo compuestos moleculares pequeños y moléculas enlazadoras de péptidos (o polipéptidos). El soporte sólido puede tener prácticamente cualquier configuración o disposición estructural posible siempre que el anticuerpo acoplado sea capaz de unirse a su antígeno. Por lo tanto, la matriz o soporte sólido puede ser esférico, como en una perla, o cilíndrico, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser irregular o plana tal como una hoja o tira de ensayo.

Dicho anticuerpo enlazado al soporte sólido puede usarse p. ej., en un método de fabricación o en un método de diagnóstico. Dicho método de fabricación puede comprender una etapa de cromatografía de afinidad, en la que dicha cromatografía de afinidad se basa en un anticuerpo unido a un soporte sólido. Dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. Dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido proteolíticamente inactivo descrito en la presente memoria.

Se describe en este documento un método para fabricar el polipéptido proteolíticamente activo que comprende purificar el polipéptido a partir de una mezcla que contiene componentes adicionales. La purificación puede basarse, p. ej., en la polaridad, la carga eléctrica y el tamaño. Por lo tanto, el método puede comprender una o más etapas de separación seleccionadas del grupo que consiste en: HPLC en fase normal, HPLC en fase inversa, cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio iónico

(IEC), incluyendo cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), cromatografía de permeación de gel (GPC).

Se describe en este documento una purificación que comprende las etapas de: (a) separación por cromatografía de intercambio aniónico; (b) separación por cromatografía de exclusión por tamaños; (c) separación por cromatografía de interacción hidrofóbica; y (d) separación por cromatografía de exclusión por tamaños.

Una o más fracciones recogidas de una columna de cromatografía pueden concentrarse, p. ej., por precipitación o ultrafiltración.

En el presente documento se describe una composición que comprende el polipéptido proteolíticamente activo. Utilizando el método descrito en la presente memoria, es posible fabricar un polipéptido proteolíticamente activo, que está sustancialmente libre de polipéptido proteolíticamente inactivo. En otras palabras, el método proporciona un polipéptido proteolíticamente activo y una composición que no comprende contaminación sustancial con proteína precursora inactiva del polipéptido. Se considera que una composición no contiene contaminación sustancial o está sustancialmente libre de polipéptido precursor proteolíticamente inactivo si, mediante un método de detección basado en Western Blot, se puede detectar menos del 5% de precursor proteolíticamente inactivo, en donde dicho 5% se refiere a la cantidad de precursor proteolíticamente inactivo en relación con la suma de polipéptido proteolíticamente activo e inactivo. Dicha composición puede ser sustancialmente pura y comprender al menos un 50% de polipéptido proteolíticamente activo, en donde dicho 50% se refiere a la cantidad de precursor proteolíticamente activo en relación con la cantidad total de proteína contenida en la composición. Dicha composición sustancialmente pura puede comprender al menos 75%, 80%, 90% o al menos 98% de polipéptido proteolíticamente activo.

Se describe en la presente memoria un polipéptido que se puede obtener a partir del método para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente activo como se ha descrito en este documento anteriormente y como se ilustra en los Ejemplos. En el presente documento se describe un polipéptido proteolíticamente activo que es un polipéptido proteolíticamente activo con la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 1. En el presente documento se describe un polipéptido proteolíticamente activo que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1. Se describe en la presente memoria un polipéptido proteolíticamente activo que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos una identidad de secuencia del 50% con la secuencia de SEQ ID NO: 1. La expresión "polipéptido que se puede obtener", como se usa en la presente memoria, se refiere en un aspecto a un polipéptido que se traduce a partir del ácido nucleico descrito en el presente documento. El polipéptido puede posteriormente someterse a modificación postraducciona tal como acilación, alquilación, amidación, adición de aminoácidos, delección de aminoácidos, glicosilación, oxidación, S-glutacionilación, fosforilación, sulfatación, procesamiento proteolítico y similares. Además, el polipéptido puede unirse a un ion metálico tal como Li^+ , Na^+ , K^+ , Ag^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} o Zn^{2+} . Preferiblemente, dicho ion metálico es Zn^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} .

En la presente memoria se describe un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido descrito en la presente memoria. El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente memoria, abarca un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo humano, humanizado, primatizado o quimérico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo sintético, derivados modificados químicamente o enzimáticamente, un fragmento de cualquiera de dichos anticuerpos o aptámeros que consisten en ácidos nucleicos naturales y/o modificados químicamente. Los fragmentos de dichos anticuerpos incluyen fragmentos F(ab')_2 , F(ab) , Fv o scFv o derivados modificados químicamente o enzimáticamente de cualquiera de estos fragmentos.

En una descripción, el anticuerpo se unirá específicamente al polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria o a su precursor proteolíticamente inactivo. Un anticuerpo que es específico para el polipéptido proteolíticamente activo reacciona de forma cruzada con el polipéptido proteolíticamente inactivo descrito en el presente documento. Se describe en este documento un anticuerpo capaz de discriminar entre el polipéptido proteolíticamente activo y su precursor inactivo. En otra descripción, el epítipo para el cual dicho anticuerpo es específico está localizado en una región de aminoácidos que está presente en el polipéptido proteolíticamente inactivo pero no en el polipéptido proteolíticamente activo. Por ejemplo, dicho epítipo puede ser un epítipo de una región polipeptídica que consiste en los residuos de aminoácidos 1 a 248 de un polipéptido que comprende la secuencia polipeptídica que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 2.

Se describe en este documento un epítipo formado por restos de aminoácidos situados en el extremo N del aminoácido 249 de un polipéptido que comprende la secuencia polipeptídica que tiene al menos una identidad de secuencia del 50% con la secuencia de la SEQ ID NO: 2. Dicho epítipo se puede eliminar del polipéptido proteolíticamente inactivo descrito en la presente memoria mediante un procesamiento proteolítico.

En una descripción, el epítipo para el cual el anticuerpo es específico es un epítipo situado en el extremo N de un polipéptido que comprende la secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 1. El término "N-terminal", tal como se utiliza en esta descripción, se refiere a una región del polipéptido que comprende los 50 restos de aminoácidos N-terminales de dicha secuencia polipeptídica, preferiblemente los 25 residuos de aminoácidos N-terminales de dicha secuencia polipeptídica. En una descripción particular, el término se refiere a los 14 residuos de aminoácidos N-terminales. El término "epítipo", tal como se

utiliza en la presente memoria, se refiere al determinante antigénico que es reconocido por el anticuerpo descrito en la presente memoria. En una descripción, el epítipo es un epítipo lineal, en otra descripción el epítipo es un epítipo conformacional. En una descripción particular, el determinante antigénico consiste en un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos del extremo N del polipéptido proteolíticamente activo descrito en el presente documento, en el que dicho péptido puede tener una longitud de aminoácidos de 7 a 14, preferiblemente de 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 residuos de aminoácidos.

La expresión "se une específicamente" o "que se une específicamente a" en una descripción significa que el anticuerpo no reacciona de forma cruzada en una extensión significativa con otros epítopos, ya sea sobre el polipéptido descrito en la presente memoria o sobre otros polipéptidos en general. La especificidad del epítipo es una característica importante del anticuerpo. La especificidad del anticuerpo con respecto al polipéptido proteolíticamente activo frente al proteolíticamente inactivo deberá ser, en un aspecto, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%. La unión específica se puede probar mediante diversas técnicas bien conocidas que incluyen, por ejemplo, estudios de competición. Otra característica importante es la sensibilidad del anticuerpo. La sensibilidad debe ser, en una descripción, tal que al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% del epítipo comprendido por una muestra está unido. La sensibilidad se puede probar por técnicas bien conocidas. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación rutinaria. Las técnicas convencionales para estudios de unión incluyen radioinmunoensayo, ELISA, diálisis de equilibrio, microcalorimetría isotérmica, ensayos BIACORE® (resonancia de plasmón de superficie, SPR) u otros métodos de adsorción superficial. El sistema BIACORE® SPR mide la interacción anticuerpo-antígeno. La respuesta SPR refleja un cambio en la concentración de masa en la superficie del detector cuando los analitos se unen o disocian. Basado en SPR, las mediciones BIACORE® en tiempo real monitorean las interacciones directamente cuando ocurren, véase BIA Applications Handbook, versión AB (reimpreso 1998), BIACORE® código No: BR-1001-86; BIAtechnology Handbook, versión AB (reimpreso 1998), BIACORE® código No: BR-1001-84. Las propiedades de unión, tales como la sensibilidad de un anticuerpo de la presente invención, pueden determinarse en principio mediante estudios de unión utilizando un antígeno inmovilizado (el ligando) presentado en una superficie del sensor. El anticuerpo a ensayar (el analito) se proporcionará en la fase móvil, es decir, en una solución. En algunos casos, el antígeno está unido indirectamente a la superficie a través de la unión a otra molécula inmovilizada que se denomina molécula de captura. Cuando el anticuerpo se inyecta en un pulso discreto a través de la superficie con los antígenos inmovilizados, se pueden subdividir esencialmente tres fases: (i) asociación del anticuerpo con el antígeno durante la inyección de la muestra; (ii) Equilibrio o estado estacionario durante la inyección de la muestra, donde la velocidad de unión del anticuerpo se equilibra por disociación del complejo anticuerpo-antígeno; (iii) Disociación del anticuerpo de la superficie durante el flujo de tampón. Se entenderá que dicho ensayo puede realizarse alternativamente con los anticuerpos inmovilizados a investigar y una solución que contiene el antígeno como fase móvil. Las fases de asociación y disociación proporcionan información sobre la cinética de la interacción analito-ligando (k_a y k_d , las velocidades de formación y disociación del complejo, $k_d/k_a=K_D$). La fase de equilibrio proporciona información sobre la afinidad de la interacción analito-ligando (K_D). El anticuerpo puede tener una K_D de menos de 0,5 μM , en otra descripción inferior a 0,05 μM y, en otra descripción, inferior a 0,02 μM .

El anticuerpo al que se hace referencia en este documento puede fabricarse usando métodos que se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane, 1988 (Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988). Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante las técnicas descritas originalmente en Kohler y Milstein, 1975 (Kohler y Milstein 1975, Nature 256: 495) y Galfre y Milstein, 1981 (Galfre y Milstein 1981, Meth Enzymol 73: 3). Dichas técnicas comprenden la fusión de células de mieloma de ratón a células de bazo derivadas de mamíferos inmunizados. Los anticuerpos se pueden mejorar adicionalmente mediante técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la resonancia de plasmón de superficie, tal como se emplea en el sistema BIACORE®, puede usarse para aumentar la eficacia de anticuerpos fágicos que se unen al epítipo antes mencionado dentro del polipéptido de la presente invención (cf. Schier et al., 1996, Human Antibodies Hybridomas 7: 97; Malmberg et al., 1995, J. Immunol Methods 183: 7).

Se describe en este documento un anticuerpo producido usando un péptido que comprende o que consiste en el epítipo antes mencionado. El péptido se puede producir p. ej., sintéticamente o por expresión recombinante. Alternativamente, el anticuerpo puede producirse aplicando un polipéptido proteolíticamente activo o inactivo de origen natural descrito en la presente memoria. En este último caso, debe entenderse que los anticuerpos resultantes se someterán ulteriormente a prueba de especificidad con respecto al polipéptido descrito en el presente documento. Se describe en este documento un anticuerpo monoclonal producido usando un polipéptido descrito en la presente memoria que puede tratarse con un detergente con el fin de hacer que el epítipo esté inmunológicamente disponible. Sin embargo, se entenderá que en un caso en que el anticuerpo se dirija contra un epítipo conformacional, no se llevará a cabo dicho tratamiento con detergente. Los agentes de estimulación inmune tales como la hemocianina de lapa californiana (KLH) también se pueden aplicar en tal procedimiento, especialmente cuando se usa un péptido sintético.

El anticuerpo puede utilizarse, por ejemplo, para cromatografía de afinidad, inmunoprecipitación e inmunolocalización del polipéptido de la presente invención, así como para la monitorización de la presencia de dicho polipéptido en muestras o en organismos recombinantes. Además, el anticuerpo puede usarse en un método

de detección o en un método de diagnóstico. En una descripción particular, el anticuerpo se usa en Western Blot o ELISA. Además, el anticuerpo se puede usar en aplicaciones terapéuticas. En particular, el anticuerpo puede usarse para inhibir la actividad del polipéptido proteolíticamente activo descrito en el presente documento. Por lo tanto, el anticuerpo también tiene diversas aplicaciones terapéuticas descritas en este documento más adelante.

En el presente documento se describe el uso del polipéptido proteolíticamente activo descrito en el presente documento en un método para procesar proteolíticamente un polipéptido. Se describe en este documento un método para la fabricación de un polipéptido procesado proteolíticamente, que comprende la etapa de poner en contacto: (a) un primer polipéptido, siendo dicho primer polipéptido el polipéptido descrito en la presente memoria, con (b) un segundo polipéptido, siendo dicho segundo polipéptido susceptible de proteólisis por dicho polipéptido, en el que dicho contacto da como resultado el procesamiento proteolítico de dicho segundo polipéptido en al menos dos productos de escisión.

El uso de Lys-N o Lys-C y arginil endopeptidasa (endoproteinasa Arg-C, LeR) de *Lysobacter enzymogenes* (ATCC 29487) (Wright DS, Graham LD, Jennings PA. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Dic 22; 1443 (3): 369 - 74) se describe en la presente memoria. El uso de plasmina y/o omptina (OmpT), una serina proteasa unida a la membrana que escinde en motivos (Arg/Lys) - (Arg/Lys) (K. Sugimura y T. Nishihara. *J. Bacteriol.* 170 (1988), pp. 5625-5632) en un método para procesar proteolíticamente CNT tal como BoNT/A se describe en la presente memoria. En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la fabricación de un polipéptido procesado proteolíticamente, que comprende la etapa de poner en contacto: (a) un primer polipéptido, siendo dicho primer polipéptido Lys-C, con (b) un segundo polipéptido, siendo dicho segundo polipéptido susceptible a la proteólisis por dicho primer polipéptido, donde dicho contacto da como resultado un procesamiento proteolítico de dicho segundo polipéptido en al menos dos productos de escisión, y en el que el segundo polipéptido es la cadena única de BoNT/A y en el que dicho primer polipéptido hidroliza el serotipo A de la neurotoxina botulínica de cadena sencilla (BoNT/A) para producir un serotipo A de neurotoxina botulínica di-cadena (BoNT/A). El término "Lys-C" se refiere a la serina endoproteinasa Lys-C de 33 kDa de *Lysobacter enzymogenes* (Lysyl endopeptidase, LeK, Genbank acc. Q7M135) que escinde específicamente enlaces peptídicos C-terminalmente a lisina. El término "Lys-N" se refiere a la metaloendopeptidasa Lys-N aislada de *Grifola frondosa* y *Pleurotus ostreatus* (Nonaka T et al., 1997, *J Biol Chem.* 272: 30032-30039; Nonaka T et al., 1998, *J Biochem.* 1998, 124: 157-162; Hori T y col., 2001, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 57: 361-368). También se incluyen en el término homólogos de dicha proteasa que tienen al menos un 60% de identidad de secuencia.

Se describe en este documento un método utilizado, por ejemplo, para fabricar una neurotoxina procesada proteolíticamente (CNT) o una neurotoxina botulínica (BoNT). El término "BoNT", tal como se emplea en su totalidad, significa una neurotoxina botulínica y se refiere a la neurotoxina obtenible de *C. botulinum* tal como BoNT del serotipo A, B, C1, D, E, F o G. También se incluye en el término "CNT" y "BoNT" una neurotoxina recombinante y modificada que comprende una o más modificaciones incluyendo la modificación química o la modificación genética. La expresión "modificación genética" significa supresión, sustitución o adición de uno o más residuos de aminoácidos. Usando el método de la presente invención, ahora es posible obtener composiciones de neurotoxina con una contaminación significativamente menor por neurotoxina no procesada o parcialmente procesada, ya que estos contaminantes se procesan eficientemente en la neurotoxina de di-cadena. En un aspecto, la di-cadena (BoNT/A) es una di-cadena nativa (BoNT/A), en la que el extremo C-terminal de la cadena ligera y el extremo N-terminal de la cadena pesada son idénticos a los correspondientes di-cadena (BoNT/A) aislada de clostridios naturales.

La expresión "poner en contacto", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a poner al menos dos compuestos diferentes en proximidad física para permitir la interacción física y/o química de dichos compuestos. De acuerdo con el método de esta invención, dichos dos compuestos diferentes son, en un aspecto, el primer y el segundo polipéptidos que están comprendidos por la solución. El contacto se lleva a cabo bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la interacción del primer y segundo polipéptido. La expresión "polipéptido procesado proteolíticamente", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere en un aspecto a un polipéptido, cuya cadena polipeptídica ha sido hidrolizada o escindida en uno o más enlaces peptídicos. En otro aspecto, la expresión se refiere a un polipéptido que ha sido escindido proteolíticamente por una endoproteinasa o endopeptidasa. En otro aspecto, la expresión se refiere a un polipéptido que ha sido escindido hasta un grado de al menos 50%. En otro aspecto, dicho polipéptido procesado proteolíticamente es el segundo polipéptido. En otro aspecto, al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95% se procesan proteolíticamente.

La expresión "segundo polipéptido", tal como se utiliza en este documento, se refiere al sustrato de dicho primer polipéptido. La expresión "ser susceptible a la proteólisis" se refiere a una característica o requisito del segundo polipéptido y se usa en la presente memoria significando que el segundo polipéptido es escindible proteolíticamente por dicho primer polipéptido. En otras palabras, la expresión "ser susceptible a la proteólisis" significa que el segundo polipéptido comprende un sitio de reconocimiento y escisión de proteasa que le permite funcionar como un sustrato del primer polipéptido. El "segundo polipéptido" es un sustrato del primer polipéptido y se procesa proteolíticamente en dos o más productos de escisión. Usando el ensayo descrito anteriormente, el experto en la materia puede probar si un polipéptido dado es un sustrato del primer polipéptido y, por lo tanto, un "segundo polipéptido" de acuerdo con la definición de la presente invención. La expresión "al menos dos productos de escisión" incluye, por ejemplo, hasta dos, tres, cuatro, cinco y hasta seis productos de escisión.

Este método puede usarse, por ejemplo, para preparar una composición farmacéutica que comprende neurotoxina clostridial o para generar fragmentos polipeptídicos usados en un método de espectrometría de masas. El primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden ponerse en contacto en diversas etapas en el proceso de fabricación del polipéptido procesado proteolíticamente. En un aspecto, la etapa de poner en contacto el primer polipéptido y el segundo polipéptido es dentro de una célula. En un aspecto particular de esta realización, el primer y el segundo polipéptidos se expresan en dicha célula.

En otro aspecto, dicha etapa de contacto es en un lisado celular o en un lisado celular purificado. Este aspecto abarca la adición del primer polipéptido al lisado o al lisado purificado. El primer polipéptido se puede añadir en varias etapas durante la purificación del segundo polipéptido a partir del lisado celular. Por ejemplo, se puede añadir el primer polipéptido antes o después de la precipitación de proteínas, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y/o cromatografía de exclusión por tamaños. Además, también se incluye la adición del primer polipéptido a una composición farmacéutica. En este aspecto, el polipéptido de la presente invención se utiliza p. ej., para la escisión proteolítica del segundo polipéptido, p. ej., para activar un segundo polipéptido que es un agente terapéutico contenido en la composición farmacéutica. También se prevé la administración del primer polipéptido a un sujeto, con el fin de procesar proteolíticamente un segundo polipéptido en el sujeto. La administración también incluye la coadministración del primer y segundo polipéptidos. También se abarca por este método una etapa de incubación en condiciones y durante un tiempo suficiente para escindir el segundo polipéptido. En un aspecto, las condiciones pueden comprender la adición de un tampón seleccionado del grupo que consiste en Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 o PBS (NaHPO₄ 50 mM₂, NaCl 150 mM, pH 7,4). Las condiciones de tampón preferidas incluyen Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. El "tiempo suficiente para escindir" se puede determinar usando el ensayo descrito anteriormente en este documento. En un aspecto, dicho "tiempo suficiente para escindir" depende del grado de escisión que debe tener el polipéptido procesado proteolíticamente o una composición que lo comprende. En un aspecto, el método comprende una etapa de incubar el primer y el segundo polipéptidos durante al menos 30 min, 60 min, 120 min o al menos 240 min. En otro aspecto, el primer y el segundo polipéptidos se incuban durante hasta 30 min, 60 min, 120 min, 240 min, 480 min o hasta 600 min. En otro aspecto, el método comprende una etapa de incubar el primer y el segundo polipéptidos a 4°C o a 37°C. En otro aspecto, el método comprende una etapa de incubación durante hasta 1 h, hasta 2 h, 4 h, 6 h, 10 h o hasta 16 h.

En un aspecto, la cadena polipeptídica de dicho segundo polipéptido comprende una secuencia seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 25. En un aspecto más particular, la cadena polipeptídica de dicho segundo polipéptido comprende una secuencia seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 25 y en la que el segundo polipéptido es escindido en C-terminal en un resto de aminoácido básico dentro de dicha secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 4 a 25. Dichas secuencias representan secuencias de aminoácidos de sustratos conocidos del polipéptido proteolíticamente activo de la presente invención. Como se muestra en este documento, dichos sustratos se escinden en C-terminal a un residuo de aminoácido básico contenido en la secuencia, comparar la Tabla 1, la columna LC y HN. En un aspecto preferido, dicho segundo polipéptido comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 4 a 10. En otro aspecto preferido, dicho segundo polipéptido es BoNT/A o un derivado del mismo, incluyendo p. ej., el polipéptido de SEQ ID NO: 3 y sus derivados. El término "derivado", tal como se usa con respecto a este y otros aspectos de la invención, comprende mutaciones de aminoácidos tales como adición, sustitución, delección o truncamiento de uno o más residuos de aminoácidos.

En un aspecto, el segundo polipéptido comprende un derivado de cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 25, o de SEQ ID NO: 3, en el que dicho derivado tiene una o más mutaciones puntuales y/o uno o más residuos de aminoácidos adicionales. En otro aspecto, dicho derivado tiene hasta 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, hasta 10, hasta 15 mutaciones puntuales. Usando el ensayo de actividad para determinar la actividad de proteasa, como se describe en la presente memoria, el experto en la materia puede determinar si un derivado dado se procesa por el polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. En otro aspecto, el derivado contiene una mutación puntual que cambia un residuo de aminoácido básico en un resto de aminoácido no básico. En otro aspecto, el derivado tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 25. En otro aspecto, dicho derivado o un polipéptido que comprende el derivado es un sustrato del primer polipéptido y es proteolíticamente escindible por el primer polipéptido. Un ejemplo típico es un derivado de la SEQ ID NO: 3 que comprende, por ejemplo, una o más mutaciones puntuales en la cadena ligera o pesada.

Se describe en este documento un segundo polipéptido que comprende (a) una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 30% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 3 [(BoNT/A de ATCC 3502, Genbank ac. AAA23262)]; o (b) una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en neurotoxina tetánica, proteína del Factor X de coagulación o Protrombina (Factor II), enzimas digestivas del páncreas como la tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína. Al menos el 30% significa al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 85%. En un aspecto particular, la identidad de secuencia de dicha segunda secuencia polipeptídica que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 3 se determina basándose en la posición de aminoácido 420 a 466 de SEQ ID NO: 3, en otro aspecto, dicha identidad de secuencia se determina basándose en cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 25. Se describe en el presente documento un segundo polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene, p. ej., una identidad de secuencia de al menos el 30% con respecto a la secuencia polipeptídica encontrada entre las posiciones de aminoácidos 420 y 466 de SEQ ID NO: 3 o al menos 30% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica de cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 25. Un polipéptido según esta definición es, p. ej., obtenible de *C. botulinum*, *C. tetani* o *C. sporogenes*. Se describe en este

documento un segundo polipéptido que puede ser, por ejemplo, una neurotoxina natural tal como BoNT/A, B, C1, D, E, F o G o un derivado de la misma que comprende una o más mutaciones de aminoácidos tales como adición, sustitución, delección o truncamiento de uno o más residuos de aminoácidos. Se incluyen, por ejemplo, los derivados que carecen de, p. ej., el dominio nativo de neurotoxina HC o partes de los mismos o derivados con otros residuos de aminoácidos que reemplazan el dominio de neurotoxina HC así como derivados con una cadena ligera adicional u otra molécula de carga proteínica fusionada en N terminal a la cadena ligera de BoNT.

En otro aspecto, el segundo polipéptido puede contener residuos de aminoácidos adicionales en el extremo N o C o en una posición interna. Los residuos de aminoácidos adicionales pueden estar flanqueados por uno o más sitios de escisión de proteasas. En otro aspecto, la secuencia de aminoácidos adicional funciona como un marcador detectable y/o permite la unión a un soporte sólido. Un ejemplo es una marcador his o un marcador GST. Otro ejemplo es la secuencia de aminoácidos VPPTPGSAWSHPQFEK que contiene Streptag, preferiblemente añadido al extremo C-terminal.

Se describe en este documento un segundo polipéptido que es un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica como se muestra en GenBank no: CBZ04958.1, YP_002805603.1, ZP_001788403.1, YP_001782718.1, ZP_02616437.1, ZP_02614241.1, YP_001392361.1, YP_001255575.1 o un homólogo de la misma que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia.

En otro aspecto, la actividad biológica de dicho segundo polipéptido está modulada por la escisión proteolítica. Es bien conocido por los expertos en la materia que la función de muchos polipéptidos puede ser modulada por procesamiento proteolítico. "Modulado", tal como se usa en la presente memoria, significa aumento o disminución, activación o inactivación. Por ejemplo, la actividad biológica de muchas neurotoxinas clostridiales se incrementa o se desencadena mediante el procesamiento proteolítico de una neurotoxina de cadena única en una neurotoxina di-cadena, en donde la neurotoxina di-cadena se compone de una cadena polipeptídica ligera y una pesada, que están unidas covalentemente a través de un puente disulfuro. La actividad biológica de la neurotoxina abarca al menos tres actividades separadas: la primera actividad es una "actividad proteolítica" que reside en la cadena ligera de la neurotoxina y es responsable de hidrolizar el enlace peptídico de uno o más polipéptidos implicados en la regulación de la fusión de la membrana celular. Una segunda actividad es una "actividad de translocación", que reside en el extremo N-terminal de la cadena pesada de la neurotoxina procesada y está implicada en el transporte de la cadena ligera a través de la membrana lisosomal y en el citoplasma. Una tercera actividad es una "actividad de unión al receptor", que reside en el extremo C-terminal de la cadena pesada de la neurotoxina procesada y que participa en la unión y absorción de la neurotoxina a una célula diana. En un aspecto preferido, la expresión "actividad biológica", como se usa en la presente memoria, significa actividad proteolítica. En un aspecto más preferido, la expresión significa actividad proteolítica incrementada.

La actividad biológica de la neurotoxina clostridial se puede medir mediante diversos ensayos, todos conocidos por los expertos en la técnica. Estas pruebas permiten determinar una o más de las actividades mencionadas anteriormente. Por ejemplo, el ensayo LD50 de ratón o el ensayo de hemidiafragma de nervio frénico de ratón ex vivo (MPN) como se describe por Pearce et al., 1994 (Pearce LB, Borodic GE, First ER, MacCallum RD (1994), Toxicol Appl Pharmacol 128: 69 - 77) y Habermann et al., 1980 (Habermann E, Dreyer F, Bigalke H. (1980), Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol. 311: 33-40) permiten determinar el efecto tóxico de una preparación de neurotoxina en un organismo vivo o en una preparación neuromuscular aislada. Para establecer el efecto tóxico en un ensayo LD50, la neurotoxina debe ser biológicamente activa en cada una de dichas tres actividades mencionadas anteriormente. Además, están disponibles otros diversos ensayos, que permiten, por ejemplo, determinar si una neurotoxina o la cadena ligera de la neurotoxina es proteolíticamente activa. Dichos ensayos se basan, p. ej., en poner en contacto BoNT/A con SNAP-25. Alternativamente, se puede usar un péptido que represente el sitio de escisión de SNAP-25, donde el péptido puede marcarse para facilitar la detección. En un aspecto preferido, la actividad biológica se determina usando el ensayo de MPN descrito anteriormente en esta memoria.

Se describe en el presente documento un primer polipéptido activado mediante procesamiento proteolítico de un polipéptido precursor inactivo, comprendiendo dicho polipéptido precursor inactivo una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 60% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 2. Esto descansa en la observación de que un polipéptido que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 2 es proteolíticamente inactivo, mientras que los truncamientos N - terminales de los mismos son proteolíticamente activos. En la presente memoria se describe el uso del polipéptido proteolíticamente inactivo en los métodos descritos en la presente memoria. El polipéptido proteolíticamente inactivo descrito en la presente memoria puede activarse, p. ej., mediante la eliminación de un fragmento del extremo N-terminal o de todo el extremo N que comprende los residuos de aminoácidos 1 a 248 de la SEQ ID NO: 2. En una descripción, el extremo N-terminal se elimina por una proteasa, en otra descripción, el extremo N-terminal se elimina por autoproteólisis de SEQ ID NO: 2. El 60% de identidad de secuencia se refiere a una alineación de secuencia con NT02CB1447 de longitud completa.

En otro aspecto, el método de la presente invención para la fabricación de un polipéptido procesado proteolíticamente comprende la etapa de purificar el segundo polipéptido procesado proteolíticamente o al menos uno o dos o más productos de escisión de los mismos. La purificación de BoNT/A expresado por *C. botulinum* puede hacerse p. ej., como se describe esencialmente en el estado de la técnica (DasGupta 1984, Toxicon 22, 415;

Sathyamoorthy 1985, J Biol Chemistry 260, 10461). En particular, la purificación de la neurotoxina puede contener una o más etapas de precipitación y extracción, una o más etapas de concentración y otras etapas cromatográficas distintas. El BoNT/A de cadena sencilla recombinante y su purificación se describen en la técnica anterior (Rummel et al., 2004, Mol Microbiol. 51: 631-43).

- 5 En una realización preferida, la cepa de Clostridium es C. botulinum, que produce BoNT/A, o un derivado de la misma. Para la fermentación, el proceso descrito por DasGupta B. R. et al. en Toxicon, vol. 22, No. 3, pág. 414 a 424, 1984, se puede usar. Por lo tanto, se añaden 0,5% de extracto de levadura y 0,6% de pasta de levadura esterilizada en autoclave a 2% del medio NZ-amina tipo A, y un pH de 7,2 se ajustará con ayuda de NaOH 4N y el medio preparado de tal manera después se someterá a autoclave. A este medio se puede añadir por separado
- 10 glucosa sometida a autoclave (20% en peso por volumen), para llegar a una concentración final de glucosa de 0,5% en el medio. La incubación puede ocurrir, p. ej., a 37°C sin agitación, en el que la fermentación se interrumpe, p. ej., después de 96 horas. Está dentro del alcance de la presente invención que además de la fermentación discontinua descrita antes también de la fermentación semi- discontinua, se puede realizar una fermentación discontinua repetida o una fermentación continua.
- 15 Después de la fermentación y separación reales del medio de fermentación de las células, el medio de fermentación puede someterse a una primera precipitación con el objetivo de eliminar grandes proteínas. La precipitación es preferiblemente una precipitación ácida. Las condiciones de reacción para tal precipitación ácida son conocidas por los expertos en la técnica. Típicamente, puede usarse H₂SO₄ 1,5 M para acidificar el sobrenadante a un pH de 3,5. La centrifugación ocurre usualmente durante 20 minutos a 2400 x g a 4°C. El gránulo recibido a través de la
- 20 centrifugación se puede lavar con agua, preferiblemente repetidamente. Posteriormente, el gránulo puede extraerse con un tampón de ácido cítrico y citrato de trisodio 0,1 M, pH 5,5, p. ej., durante una hora. Posteriormente, se puede realizar una etapa de centrifugación adicional, p. ej., a 9800 x g durante 20 minutos a 4°C. El gránulo así obtenido puede extraerse de nuevo opcionalmente como se ha descrito anteriormente. El sobrenadante de la extracción, y ambos sobrenadantes en caso de repetición de la extracción, pueden ser sometidos a precipitación con sulfato de
- 25 protamina. La precipitación puede continuar durante la noche, p. ej., a 8°C. Posteriormente, el precipitado puede centrifugarse, p. ej., durante 20 minutos a 4°C y a 12.000 x g. El sobrenadante de la centrifugación puede someterse a una precipitación tal como una precipitación con sulfato de amonio, por lo que se pueden eliminar otras proteínas más grandes. Después de la etapa de precipitación con sulfato de amonio, se puede añadir otra etapa de centrifugación y posteriormente se puede volver a disolver el sedimento así obtenido y, opcionalmente, someterse a
- 30 una diálisis. El extracto que se dializa preferentemente y se centrifuga de nuevo, puede someterse a una sucesión de etapas de cromatografía con el objetivo de purificar la neurotoxina. Cada una de las etapas de cromatografía sirve para eliminar contaminantes tales como sulfato de protamina, ADN restante, partes de proteínas más pequeñas y proteínas de tamaño medio, así como las hemaglutininas del complejo de proteína de neurotoxina botulínica. Para este propósito, se puede usar una o más etapas de cromatografía en una realización preferida.
- 35 Opcionalmente, el eluato de, p. ej., la última etapa de cromatografía, se puede filtrar para reducir gérmenes. Opcionalmente, el eluato se puede diluir antes de la filtración y se pueden añadir adyuvantes adecuados. Durante los pasos adicionales puede realizarse otra filtración estéril después de la adición de los adyuvantes. En un aspecto, la filtración se lleva a cabo en recipientes de reacción que pueden someterse luego a una etapa de liofilización.

- Se describe en este documento una composición que puede obtenerse mediante el método de la presente invención
- 40 para la fabricación de un polipéptido procesado proteolíticamente. Se describe en la presente memoria una composición que comprende una mezcla del segundo polipéptido procesado y no procesado, en el que dicha mezcla puede contener menos del 5%, 4%, 3%, 2% o menos del 1% del segundo polipéptido no procesado. Una composición, en la que dicho segundo polipéptido es BoNT o un derivado del mismo se describe en la presente memoria. Se describe en este documento un BoNT, p. ej., seleccionado del grupo que consiste en BoNT del serotipo
- 45 A, B, C, D, E, F y G, incluyendo un derivado del mismo. La composición puede ser, p. ej., una composición líquida o sólida y puede contener uno o más vehículos, coadyuvantes y/o excipientes.

- Se describe en la presente memoria un método para la fabricación de un medicamento, es decir, una composición farmacéutica, que comprende las etapas del método anteriormente mencionado y la etapa adicional de formular la neurotoxina di-cadena purificada como medicamento. En una descripción, dicho medicamento comprende una
- 50 mezcla del segundo polipéptido procesado y no procesado, en el que dicha mezcla contiene menos del 5% del segundo polipéptido sin procesar.

En el presente documento se describe una mezcla que contiene menos del 4%, 3%, 2% o menos del 1% del segundo polipéptido sin procesar.

Se describen diversos usos médicos de los compuestos descritos en la presente memoria:

- 55 un polipéptido proteolíticamente activo descrito en este documento para su uso como un medicamento o en una composición farmacéutica.

una composición descrita en la presente memoria para su uso como medicamento o en una composición farmacéutica.

un anticuerpo descrito en este documento para su uso como un medicamento o en una composición farmacéutica.

un inhibidor descrito en este documento para su uso como medicamento o en una composición farmacéutica.

una composición farmacéutica que comprende el polipéptido descrito en el presente documento, el anticuerpo descrito en el presente documento, la composición descrita en la presente memoria o el inhibidor descrito en la presente memoria.

El término "composición", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier composición formulada en forma sólida, líquida, en aerosol (o gaseosa) y similares. Dicha composición comprende, p. ej., un compuesto terapéuticamente activo descrito en el presente documento opcionalmente junto con compuestos auxiliares adecuados tales como diluyentes o vehículos o ingredientes adicionales. En una descripción, el compuesto terapéuticamente activo es el polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. Un compuesto terapéutico descrito en la presente memoria es el segundo polipéptido procesado proteolíticamente como se ha descrito anteriormente, tal como la neurotoxina di-cadena. Se enseña en la presente invención un compuesto terapéuticamente activo que es el anticuerpo descrito en la presente memoria. Se enseña en la presente invención un compuesto terapéuticamente activo que es el inhibidor del polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria.

En este contexto, se distingue entre compuestos auxiliares, es decir, compuestos que no contribuyen a los efectos provocados por el compuesto descrito en la presente invención durante la aplicación de la composición para su finalidad deseada, e ingredientes adicionales, es decir, compuestos que contribuyen a un efecto adicional o modulan el efecto del compuesto descrito en la presente memoria. Los diluyentes y/o vehículos adecuados dependen del propósito para el cual se va a usar la composición y de los otros ingredientes. Los expertos en la materia pueden determinar tales diluyentes y/o vehículos adecuados sin más dilación.

El o los vehículos deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser nocivos para el receptor de los mismos. El vehículo farmacéutico empleado puede incluir un sólido, un gel o un líquido. Ejemplos de vehículos sólidos son lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Ejemplos de vehículos líquidos son solución salina tamponada con fosfato, jarabe, aceite, agua, emulsiones, diversos tipos de agentes humectantes y similares. De manera similar, el vehículo o diluyente puede incluir un material de retardo de tiempo bien conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera. Dichos vehículos adecuados comprenden los mencionados anteriormente y otros bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania.

El o los diluyentes se seleccionan de manera que no afecten a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank, además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, coadyuvantes o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

Una composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende la neurotoxina biológicamente activa obtenida por el método, y opcionalmente, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. La neurotoxina activa puede estar presente en forma líquida o liofilizada. Dicho compuesto puede estar presente junto con glicerol, estabilizadores de proteínas (por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA)) o estabilizantes no proteínicos tales como polivinilpirrolidona o ácido hialurónico. La composición farmacéutica se puede administrar tópicamente. La administración de fármacos de uso convencional se administra por vía intramuscular, subcutánea (cerca de las glándulas). Sin embargo, dependiendo de la naturaleza y el modo de acción de un compuesto, la composición farmacéutica puede administrarse también por otras vías. El polipéptido de neurotoxina de di-cadena es el ingrediente activo de la composición y está en un aspecto administrado en formas de dosificación convencionales preparadas combinando el fármaco con vehículos farmacéuticos estándar según procedimientos convencionales. Estos procedimientos pueden implicar la mezcla, la granulación y la compresión, o la disolución de los ingredientes según sea apropiado para la preparación deseada. Se apreciará que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable está dictado por la cantidad de ingrediente activo con la que se va a combinar, la vía de administración y otras variables bien conocidas.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad del compuesto, la neurotoxina, que se utilizará en una composición farmacéutica descrita en el presente documento que previene, mejora o trata los síntomas que acompañan a una enfermedad o afección referida en esta memoria descriptiva. La eficacia terapéutica y la toxicidad del compuesto se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la relación, LD₅₀/ED₅₀.

El régimen de dosificación será determinado por el médico de cabecera y otros factores clínicos. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, la superficie corporal, la edad, el compuesto particular a administrar, el sexo, el tiempo y la

vía de administración, la salud general y de otros fármacos que se administren simultáneamente. El progreso se puede monitorear mediante una evaluación periódica. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones a las que se hace referencia en la presente memoria se administran al menos una vez con el fin de tratar o mejorar o prevenir una enfermedad o afección descritas en esta memoria descriptiva. Sin embargo, dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse más de una vez.

En una descripción, la composición antes mencionada es un medicamento o una composición cosmética. En una descripción, dicho medicamento, que comprende la neurotoxina biológicamente activa, puede usarse para la prevención y/o el tratamiento de al menos una de las siguientes enfermedades y trastornos: fuerza muscular voluntaria, distonía focal, incluyendo distonía cervical, craneal y blefaroespasmo esencial benigno, espasmo hemifacial y espasticidad focal, trastornos gastrointestinales, hiperhidrosis y corrección cosmética de las arrugas, en otro aspecto también blefaroespasmo, distonía oromandibular, tipo de apertura de mandíbula, cierre de mandíbula, bruxismo, síndrome de Meige, distonía lingual, apraxia del párpado, abertura de distonía cervical, antecolis, retrocolis, laterocolis, tortícolis, distonía faríngea, distonía laríngea, disfonía espasmódica/tipo aductor, disfonía espasmódica/tipo abductor, disnea espasmódica, distonía de los miembros, distonía de brazo, distonía específica de la tarea, calambre del escritor, calambre del músico, codo de golfista, distonía de la pierna, aducción del muslo, flexión de la rodilla de abducción del muslo, extensión de la rodilla, flexión del tobillo, extensión del tobillo, pie zambo, deformidad, distonía del pie, dedo del pie estriado, flexión del dedo del pie, extensión del dedo del pie, distonía axial, síndrome de pisa, distonía del vientre, distonía segmentaria, hemidistonia, distonía generalizada, distonía Parkinsonismo ligado al cromosoma X, distonía en la degeneración corticobasal, distonía en Parkinsonismo ligado al cromosoma X, distonía tardía, distonía en la ataxia espinocerebelosa, distonía en la enfermedad de Parkinson, distonía en la enfermedad de Huntington, distonía en la enfermedad de Hallervorden Spatz, disquinesias inducidas por dopa/distonía inducida por dopa, discinesias tardías/distonías tardías, discinesias/distonías paroxísticas, mioclonía palatina inducida por acción cinesigénica no cinesigénica, mioclonía mioquímica, rigidez, calambres musculares benignos, temblor hereditario de la barbilla, actividad de los músculos mandibulares, espasmos hemimilásticos, hipertrofia de miocardiopatía, hipertrofia meseterica, hipertrofia tibial anterior, nistagmo, oscilopsia, parálisis visual supranuclear, , epilepsia, partialis continua, planificación de la operación torácica espasmódica, parálisis de la cuerda vocal del abductor, disfunción mutacional recalcitrante, disfunción esfínter esofágico superior, granuloma del pliegue vocal, tartamudeo Gilles del síndrome de Tourette, mioclonía del oído medio, cierre protector de la laringe, postlaringectomía, fallo del habla, ptosis protectora, disfunción de Oddi del esfínter entropión, trastornos motores del esófago pseudoacalásicos, no acalásicos, , vaginismo, temblor por inmovilización postoperatoria, disfunción de la vejiga, disinergia detrusor-esfínter, espasmo de esfínter-vejiga, espasmos hemifaciales, discinesias de reinervación, patas de gallo de uso de cosméticos, asimetrías faciales con ceño fruncido, hoyuelos de mentón, síndrome de persona rígida, hiperplasia de próstata tetánica, adipositas, tratamiento del estrabismo con parálisis cerebral infantil, paralítico mixto concomitante, después de cirugía de desprendimiento de retina, después de cirugía de catarata, en estrabismo miosítico de afaquia, estrabismo miopático, desviación vertical disociada, como un complemento a la cirugía de estrabismo, esotropía, exotropía, acalasia, fisuras anales, hiperactividad de glándula exocrina, síndrome de Frey, Síndrome de las lágrimas de cocodrilo, hiperhidrosis, rinorrea plantar palmar axilar, hipersalivación relativa en accidente cerebrovascular, en Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, afecciones espásticas, en encefalitis y procesos autoinmunes de la mielitis, esclerosis múltiple, mielitis transversa, síndrome de Devic, infecciones virales, infecciones bacterianas, infecciones parasitarias, infecciones fúngicas, en la paraparesia espástica hereditaria, síndrome postapopéctico, infarto hemisférico, infarto del tronco encefálico, infarto miélnico, migraña, traumatismos del sistema nervioso central, lesiones hemisféricas, lesiones del tronco encefálico, lesión miélnica, en hemorragias del sistema nervioso central, hemorragia intracerebral, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraspinal, en neoplasias, tumores hemisféricos, tumores del tronco encefálico, tumores miélnicos, ronquidos (documento WO 2000/033863). Para detalles y síntomas, véase, por ejemplo, Jost 2007, Drugs 67 (5), 669 o Dressler 2000 en Botulinum Toxin Therapy, Thieme Verlag, Stuttgart, Nueva York.

Se describe en este documento una composición que es una composición cosmética que se puede formular como se describe para una composición farmacéutica anterior. Para una composición cosmética, asimismo, se prevé que el compuesto descrito en la presente memoria se pueda usar en forma sustancialmente pura. Las composiciones cosméticas pueden aplicarse por vía intramuscular. Como se describe en este documento, las composiciones cosméticas que comprenden la neurotoxina pueden formularse como una solución antiarrugas.

Se describe en este documento una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el inhibidor descrito en la presente memoria. Dado que el polipéptido descrito en la presente memoria es responsable de activar neurotoxinas clostridiales, el anticuerpo será útil para reducir el efecto tóxico observado durante la infección con clostridios. Por lo tanto, el anticuerpo puede usarse para tratar una infección por Clostridia, incluyendo Clostridium perfringens, Clostridium difficile, Clostridium tetani, Clostridium botulinum, Clostridium baratii, Clostridium butyricum, Clostridium sporogenes, Clostridium acetobutylicum, Clostridium haemolyticum, Clostridium novyi y Clostridium oedematiens. Además, el anticuerpo puede usarse para el tratamiento de síntomas asociados con dicha infección. Además, dicho anticuerpo puede usarse en el tratamiento de una afección o un síntoma asociado con la afección, en el que la afección se selecciona entre botulismo, tétanos, colitis pseudomembranosa, gangrena, intoxicación alimentaria y similares.

Se describe en este documento una composición farmacéutica que comprende el polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. Dicha composición farmacéutica puede utilizarse para la escisión proteolítica de polipéptidos implicados en la coagulación, en particular para el tratamiento de pacientes con hipocoagulación. La composición farmacéutica puede utilizarse como fibrinolítico, en particular para tratar pacientes con infarto de miocardio, embolismo pulmonar, tromboembolismo venoso profundo, es decir, para eliminar coágulos sanguíneos. También se prevé el uso de la composición farmacéutica en el tratamiento del ictus. Además, la composición farmacéutica puede usarse en el tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina para reemplazar cualquiera de tripsina, quimiotripsina, pepsina. Además, la composición farmacéutica puede utilizarse en el tratamiento de pacientes afectados por reacciones inflamatorias, en el tratamiento de pacientes con cáncer, en particular para la segmentación proteolítica de antígenos tumorales expuestos a la superficie. Además, la composición farmacéutica se puede usar en el tratamiento del papiloma.

Se describe en este documento un método de selección de un inhibidor que comprende la etapa de (a) poner en contacto el polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria con un sustrato conocido y, opcionalmente, con un inhibidor putativo; y (b) determinar el efecto del inhibidor putativo sobre la conversión del sustrato en el producto de escisión, en el que una reducción en la cantidad de producto de escisión es indicativa del efecto inhibidor del inhibidor putativo. Se describe en la presente memoria un inhibidor putativo que es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 25, en el que al menos un aminoácido básico de dicha secuencia de aminoácidos se reemplaza con un aminoácido no básico.

Se describe en este documento un péptido que comprende una o más modificaciones químicas. Se describe en este documento cualquier inhibidor que sea un peptidomimético de dicho péptido. Se describe en este documento un inhibidor putativo que es parte de un microarray de compuesto químico, es decir, una colección de compuestos químicos orgánicos. Se enseña en la presente invención un inhibidor que es el anticuerpo descrito en la presente memoria. Este método es útil para identificar compuestos capaces de inhibir el polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. Una selección inicial puede basarse, por ejemplo, en un péptido que comprenda una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 25. Los péptidos capaces de inhibir el polipéptido descrito en la presente memoria pueden ser modificados para aumentar la inhibición. Las modificaciones incluyen sustituciones de aminoácidos o modificaciones químicas. Típicamente, este método se lleva a cabo poniendo en contacto el polipéptido en este documento descrito con un sustrato conocido en presencia y ausencia de un inhibidor putativo (etapa (a) del método) y comparando el efecto del inhibidor putativo con la conversión del sustrato en el producto de escisión. Una reducción de la tasa de conversión en presencia del inhibidor putativo es indicativa de un efecto inhibidor.

En la presente memoria se describe un inhibidor del polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria, en el que dicho inhibidor es (a) un inhibidor que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 25, en la que un aminoácido básico contenido en la misma se reemplaza con un aminoácido no básico; o (b) el anticuerpo descrito en el presente documento.

Las figuras muestran:

Figura 1: Prueba de actividad de las fracciones recogidas de HiPrep 16/10 Q FF.

5 µl de fracciones recogidas de HiPrep 16/10 Q FF se analizaron para determinar la actividad enzimática mediante la incubación de 2 µg de scBoNTA (carril 2) durante 1 h a 37°C y posterior SDS-PAGE al 10%. Carril 1: marcador de bajo peso molecular (LMW): 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa.

Figura 2: Análisis de las fracciones recogidas de SEC (HiLoad 16/60 Superdex 75) con respecto al contenido de nBH con un peso molecular de ~37,3 kDa por SDS-PAGE al 12,5%.

Las fracciones 9 a 11 contienen la mayoría de nBH. (Carril 1: LMW: 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18,4 kDa, 14,4 kDa)

Figura 3: Análisis SDS-PAGE al 12,5% para la determinación de la pureza y la concentración de proteína de tres lotes de purificación de nBH.

Carril 1, LMW (116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18,4 kDa, 14,4 kDa); Carril 2, nBH Lote TE311206 (192 ng/µl maduro NT02CB1446/CBO1444, aminoácidos 254 - 594 de Genbank ac. CAL82987,1, PM: 38,6 kDa); Carril 3, nBH Lote TIK301009 (130 ng/µl maduro NT02CB1447/CBO1445, SEQ ID NO: 1, aminoácidos 249-581 de Genbank ac. CAL82988,1, PM: 37,3 kDa); Carril 4, nBH Lote TIK280509 (114 ng/µl maduro NT02CB1447/CBO1445, SEQ ID NO: 1, aminoácidos 249 - 581 de Genbank ac. CAL82988,1, PM: 37,3 kDa).

Figura 4: Informe del análisis de espectro ESI-MS/MS.

Se identificó la banda de proteína de 38,6 kDa del lote TE311206 de nBH como NT02CB1446/CBO1444 con una puntuación de Mascot de 725 y una cobertura de secuencia de MS/MS de péptido de 29,6% sobre todo el marco de lectura abierto (ORF). No se identificó el péptido (caja gris, péptido de MS identificado, cuadrados rojos, aminoácido identificado y/-ión del péptido después de la desintegración de MS/MS) derivado de los 253 aminoácidos N-

terminales. El análisis MS/MS del lote TE311206 mostró una cobertura de secuencia del 52% de acuerdo con los aminoácidos C-terminales 254-594 que forman el nBH.

Figura 5: Informe del análisis del espectro ESI-MS/MS.

Se identificó la banda de la proteína de 37,3 kDa del lote nBH TIK301009 como NT02CB1447/CBO1445 con una puntuación de Mascot de 555 y una cobertura de secuencia de MS/MS de péptido de 28,4% sobre todo el marco de lectura abierto (ORF). Excepto uno todos los péptidos (caja gris, péptido de MS identificado, cuadrados rojos, aminoácido identificado y/-ión del péptido después de la desintegración de MS/MS) identificados derivan de los 333 aminoácidos C-terminales. El análisis MS/MS del lote TIK301009 mostró una cobertura de secuencia de 49,5% de acuerdo con los aminoácidos C-terminales 249-581 que forman el nBH.

Figura 6: Comparación de la actividad proteolítica dependiente de la concentración de nBH derivada de tres lotes de purificación.

A. Una SDS-PAGE al 12,5% de ensayo de actividad analizando nBH derivado de los lotes TIK301009, TIK280509 y TE311206 utilizando las siguientes diluciones de la concentración de nBH: 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000. El ensayo se realizó incubando 1 µg de scBoNT/A y 2 µl de dH₂O y 1 µl de nBH correspondiente diluido durante 60 min a 37°C. Para el análisis SDS-PAGE, se añadieron 3 µl de un tampón Laemmli 4x SDS reductor a un volumen final de 10 µl. scBoNT/A de 150 kDa se escindió en la cadena pesada de 100 kDa y la cadena ligera de 50 kDa.

B Se cuantificó la densidad óptica de las bandas de proteínas de cadena pesada, cadena ligera y scBoNT/A y la suma de bandas de productos de cadena ligera y pesada se dividió por la suma de las bandas de proteínas LC, HC y scBoNT/A. Una mayor dilución del primer polipéptido disminuye la velocidad de escisión. La actividad proteolítica específica de los tres lotes diferentes es casi idéntica.

Figura 7: Escisión dependiente del tiempo de scBoNT/A de tipo natural y mutantes que contienen un bucle modificado por nBH.

A Modificación de la secuencia del bucle. En scBoNTAS Throm se eliminan todos los residuos de lisina y se inserta la secuencia de reconocimiento de trombina LVPRGS mientras que en scBoNT Res el bucle carece de cualquier aminoácido básico. Acortar el bucle a ocho pequeños residuos o cinco aminoácidos con cadenas laterales voluminosas produce scBoNTAS (GGSG)₂ y scBoNTAS FQWYI, respectivamente. En scBoNTAS CGS-C se suprime todo el bucle y el puente disulfuro que forma cisteínas se reemplaza por glicina y serina.

B Análisis SDS-PAGE de la escisión dependiente del tiempo de scBoNT/A de tipo natural y mutantes.

C ScBoNTAS de tipo natural es activado por nBH de una manera dependiente del tiempo en la cadena ligera y la cadena pesada dentro de 120 min. La falta de lisinas y la inserción de un solo residuo de arginina prolonga la escisión del bucle (scBoNTAS Throm). Un bucle que carece de cualquier residuo básico es todavía escindible (scBoNTAS Res). Acortar el bucle al péptido 8mer, introducir cinco aminoácidos con cadenas laterales voluminosas o eliminar el bucle completo produce un scBoNT/A inescindible.

Figura 8: Análisis MS/MS de los productos de escisión de 50 kDa y 100 kDa tras la digestión de scBoNT/A con nBH.

A Análisis del producto de escisión de 50 kDa que se identificó como cadena ligera de BoNT/A con una puntuación de Mascot de 1460. El péptido más atribuido a C-terminal cubre los aminoácidos G433 a K438 que corresponde al extremo C-terminal fisiológicamente observado de BoNT/A LC.

B Análisis del producto de escisión de 100 kDa que se identificó como cadena pesada de BoNT/A con una puntuación de Mascot de 96. El péptido N-terminal más atribuido a N-terminal cubre los aminoácidos A449 a K456 que corresponde al extremo N-terminal fisiológicamente observado de BoNT/A HC.

Figura 9: A El contenido de proteína (mg/ml) de anti-nBH-IgY de tres grupos subsiguientes se analizó mediante SDS-PAGE al 12,5%. **B ELISA:** Las placas de microvaloración Nunc Maxisorp F96 se recubrieron con nBH de varios lotes (500 ng/ml) en PBS durante la noche a 4°C y luego se bloquearon durante 1 h con tampón de bloqueo de PBS que contenía Tween-20 al 0,1% y leche desnatada sin grasa al 2%. Después del lavado, se añadió una dilución de IgY de cada grupo (10 µg/ml en tampón de bloqueo) durante 1 h y se detectó usando IgY anti-pollo de burro marcado con biotina, estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (ambos Dianova, Hamburgo, Alemania) y 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma).

Figura 10: A Expresión recombinante y aislamiento de BH 1-581 inactivo (63 kDa) por Talon IMAC. Análisis SDS-PAGE al 10% de fracciones de Talon IMAC (LMW: 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, SS34, lisado claro, TD, flujo a través; W, fracción de lavado, E1-E7, fracciones eluidas de imidazol 1 a 7). **B** No se observa endoproteolisis de scBoNT/A en LC (50 kDa) y HC (100 kDa) con iBH recombinante (SEQ ID NO: 2; "E"; 63 kDa) a 37°C después de 1 h (carril 6) (LMW: 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa).

Figura 11: Uso de BoNTHydrolase (nBH) activa purificada para obtener polipéptido procesado proteolíticamente

A 200 µg de scBoNT/A purificado recombinante se incuban con 350 ng de BoNTHydrolase activa purificada durante 12 min a 37°C. Para detener la reacción, nBH se elimina por SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y la cantidad de escisión es analizada por SDS-PAGE al 10%. **B** La fracción 1 (1800 µl) que contiene ~ 40% de BoNT/A procesado se incuba con 350 ng de BoNTHydrolase activa purificada durante 15 min a 37°C y se concentra a 300 µl por ultrafiltración. Para detener finalmente la reacción se separa nBH por SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y la cantidad de escisión se analiza mediante SDS-PAGE al 10%. **C** Las fracciones 1 y 2 (1800 µl) que contienen ~ 80% de BoNT/A procesado se combinan y se incuban con 120 ng de BoNTHidrolasa activa purificada durante 25 min a 37°C y se concentran a 300 µl por ultrafiltración. Para detener finalmente la reacción se separa nBH por SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y la cantidad de escisión se analiza mediante SDS-PAGE al 10%. Se obtiene un BoNT/A procesado al 95% (SEQ ID NO: 3).

El listado de secuencias muestra:

SEQ ID NO: 1: polipéptido proteolíticamente activo derivado de una cepa de Clostridium botulinum ATCC 3502, nº de acceso GenBank: "CAL82988.1", que carece de 248 residuos de aminoácidos N-terminales

SEQ ID NO: 2: polipéptido proteolíticamente inactivo derivado de una cepa de Clostridium botulinum ATCC 3502, nº de acceso GenBank: "CAL82988.1"

SEC ID N°: 3: BoNT/A de ATCC 3502, Genbank ac. "AAA23262"

SEQ ID NO: 4: Bucle de BoNT/A1

SEQ ID NO: 5: Bucle de BoNT/A2/A6

SEQ ID NO: 6: Bucle de BoNT/A3

SEQ ID NO: 7: Bucle de BoNT/A3

SEQ ID NO: 8: Bucle de BoNT/A4

SEQ ID NO: 9: Bucle de BoNT/A5

SEQ ID NO: 10: Bucle de BoNT/A7

SEQ ID NO: 11: Bucle de BoNT/B1/B4bv/B6

SEQ ID NO: 12: Bucle de BoNT/B2B3

SEQ ID NO: 13: Bucle de BoNT/B5np

SEQ ID NO: 14: Bucle de BoNT/C/CD

SEQ ID NO: 15: Bucle de BoNT/D

SEQ ID NO: 16: Bucle de BoNT/DC

SEQ ID NO: 17: Bucle de BoNT/E1 - E5

SEQ ID NO: 18: Bucle de BoNT/E6

SEQ ID NO: 19: Bucle de BoNT/F1/F6

SEQ ID NO: 20: Bucle de BoNT/F2/F3

SEQ ID NO: 21: Bucle de BoNT/F4

SEQ ID NO: 22: Bucle de BoNT/F5

SEQ ID NO: 23: Bucle de BoNT/F7

SEQ ID NO: 24: Bucle de BoNT/G

SEQ ID NO: 25: Bucle de TeNT

SEQ ID NO: 26: secuencia de ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 1

SEQ ID NO: 27: secuencia de ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 2

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención y, de ningún modo, deben ser interpretados para limitar su alcance.

Ejemplos

Ejemplo 1: Purificación y caracterización de la BoNTHydrolase nativa (nBH), que escinde específicamente BoNT/A de cadena sencilla en su forma di-cadena activa

(1) Lectura del sistema/prueba de actividad: Para detectar y purificar específicamente una actividad enzimática que hidroliza la neurotoxina A botulínica (BoNT/A) en la cadena ligera de 50 kDa (LC) y la cadena pesada de 100 kDa (HC) en sobrenadantes de cultivo de *C. Botulinum* y entre los pasos cromatográficos se ha expresado el BoNT/A de 150 kDa como polipéptido de cadena sencilla (sc) en *E. coli*. La incubación del scBoNT/A recombinante con la actividad enzimática apropiada (nBH) debería producir una LC de 50 kDa y una HC de 100 kDa visualizada mediante la reducción en SDS – PAGE al 10 - 13%.

(2) Expresión de la proteasa clostridial: Una sola colonia de la cepa de *C. Botulinum* ATCC 3502 se inoculó en medio de 100 ml de infusión de corazón cerebral (BHI) y el cultivo se incubó durante la noche a 37°C en condiciones anaeróbicas. Se inocularon 10 ml de cultivo O/N en 11 medios BHI y se incubaron anaeróticamente durante 48-72 h.

(3) Precipitación con sulfato de amonio: El sobrenadante del cultivo 11 se recogió mediante centrifugación (4°C, 6500 x g, 25 min). Se añadió sulfato de amonio a una concentración final del 85% (en este caso 575 g), la suspensión se agitó durante 6 horas a 4°C y posteriormente se centrifugó (4°C, 6500 x g, 30 min). El precipitado de sulfato de amonio en forma de gránulo se disolvió en un pequeño volumen (en este caso 5 ml) de NaP 50 mM, pH 7,5, y se dializó frente a NaP 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. Finalmente, el dializado se centrifugó (4°C, 40000 x g, 60 min) y el sobrenadante se utilizó para la IEC.

(4) Cromatografía de intercambio iónico (IEC, columna HiPrep 16/10 Q FF): El sobrenadante de (3) (Figura 1, carril 3) se aplicó a una columna de intercambio aniónico HiPrep 16/10 Q FF equilibrada y se hizo funcionar con un tampón que contenía NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM. El ensayo se realizó a un caudal de 1 ml/min. Se realizó una prueba de actividad incubando 5 µl de cada otra fracción con 2 µg de scBoNTA durante 1 h a 37°C y posterior análisis en SDS-PAGE (Figura 1). Las fracciones 6-24 se combinaron y su volumen se concentró hasta 3,5 ml mediante ultrafiltración (Amicon-Ultra MWCO 10.000).

(5) Cromatografía de exclusión por tamaños (SEC, HiLoad 16/60 Superdex 200): Posteriormente, la solución de proteína concentrada de (4) se cargó en una columna HiLoad 16/60 Superdex 200, equilibrada con NaP 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM. La separación se realizó a un caudal de 1 ml/min. Las fracciones con un volumen de retención entre 80 ml y 100 ml se analizaron usando el ensayo de actividad (1) y las fracciones apropiadas que contenían la actividad enzimática (nBH) se combinaron (~ 10 ml) y se concentraron a 3 ml mediante ultrafiltración. Posteriormente, se añadió sulfato de amonio a una concentración final de 12,5% = 500 mM (+ 0,2 g).

(6) Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, HiTrap Phenyl Sepharose): NBH se unió a la Fenil Sefarosa en tampón A (NaP 50 mM, pH 7,5, sulfato amónico 500 mM). El nBH unido se eluyó reduciendo la cantidad de sulfato de amonio debido a un gradiente lineal creciente con tampón B (NaP 50 mM, pH 7,5) a un caudal de 1 ml/min. Todas las fracciones que contenían proteína se analizaron usando el ensayo de actividad (1) y las fracciones apropiadas se combinaron y concentraron por ultrafiltración a 3,5 ml. El tampón de la solución se ajustó a NaP 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM.

(7) SEC (HiLoad 16/60 Superdex 75): Finalmente, el nBH se purificó mediante SEC utilizando la columna HiLoad 16/60 Superdex 75 a NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y un caudal de 1 ml/min. Las fracciones con un volumen de retención entre 70 ml y 80 ml se analizaron mediante SDS-PAGE al 12,5% (Figura 2) y las fracciones 8-12 que contienen la nBH que migra a ~37,3 kDa se combinaron (~ 10 ml) y se concentraron a 1 ml por ultrafiltración.

(8) La proteína prominente que migra a aproximadamente 37,3 kDa (nBH) se analizó por secuenciación del péptido N-terminal de acuerdo con el protocolo de degradación de Edman. La secuencia del péptido identificado es V Q G Q S V K G V G y corresponde a los diez primeros residuos de la SEQ ID NO: 1.

(9) Se aislaron reproduciblemente dos lotes de nBH (NT02CB1447, 37,3 kDa, Figura 3, carril 3: TIK301009, carril 4: TIK280509) de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Después de las modificaciones del procedimiento de aislamiento se obtiene la isoforma nBH NT02CB1446 (38,6 kDa, Figura 3, carril 2, lote TE311206):
(i) crecimiento del cultivo de *C. botulinum* : 18 h en lugar de 48 a 72 h; (ii) variación de los pasos cromatográficos: IEC -> SEC Superdex 75 -> HIC Fenil Sepharose en lugar de IEC-> SEC Superdex 200 -> HIC Fenil Sepharose -> SEC Superdex 75.

Ejemplo 2: Identificación de secuencia de nBH de *C. botulinum* por espectrometría de masas (MS)

(1) Digestión triptica: Las bandas de proteína que emigraron a aproximadamente 38 kDa (nBH) en SDS-PAGE se cortaron para digestión triptica y se destiñeron agitando suavemente en NH_4HCO_3 , acetonitrilo al 50% durante 30 min a 37°C. Se repitió el descoloramiento hasta que los puntos de gel estaban claros. Se añadió acetonitrilo (100%) y se eliminó después de 3 min. Posteriormente, los puntos se secaron en un sistema de velocidad vac (Eppendorf, Alemania). Se añadió tripsina (10 ng/ μl) en NH_4HCO_3 y se incubó sobre hielo durante 1 h. A continuación, se retiró la solución de tripsina restante, se añadió un pequeño volumen de NH_4HCO_3 y se llevó a cabo la digestión a 37°C durante la noche. Se recogió el sobrenadante y se extrajeron las piezas de gel utilizando TFA al 5%, acetonitrilo al 10% durante dos veces. Todos los fluidos se combinaron, se secaron en una vac de velocidad y los péptidos extraídos se almacenaron a 4°C.

(2) Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo) (MALDI-TOF/TOF) MS: Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF (UltraflexI Bruker Daltonik GmbH) en modo lineal con una tensión de aceleración de 25 kV. Se detectaron masas desde 700 m/z hasta 4.500 m/z. Las muestras (2 μl) se cocrystalizaron con 2 μl de solución de ácido sinnapínico que contenía acetonitrilo al 50% y ácido acético trifluórico (TFA) al 0,2% directamente sobre una placa diana MALDI de acero inoxidable. 500 tomas láser se recogieron para cada muestra.

(3) Separación de péptidos por cromatografía de fase inversa: La separación de péptidos se realizó mediante cromatografía de fase inversa utilizando un sistema de nano-HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) que consistía en un muestreador automático y una bomba de gradiente. La muestra se disolvió en tampón A (acetonitrilo al 5%, ácido fórmico al 0,1%) y se inyectó una alícuota de hasta 10 μl en una columna C18 (Zorbax SB-C18, 5 μm , 300 Å, 0,5 mm de diámetro interno, longitud 15 cm) a un caudal de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Después de la carga, la columna se lavó durante 15 minutos con tampón A y los péptidos se eluyeron usando un gradiente de eluyente A y eluyente B (acetonitrilo al 70% (v/v) en ácido fórmico al 0,1% (v/v) de 0% a 100% de eluyente B en 75 min.

(4) Espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI) y trampa de iones: La salida de HPLC se conectó directamente a la fuente nanoESI de un espectrómetro de masas de trampa de iones y se utilizó el pulverizador de vaina coaxial-líquido Agilent (Agilent Technologies). El capilar de salida estaba sujeto por una aguja de acero circundante y de 0,1 a 0,2 mm fuera de ella. La pulverización se estabilizó mediante N_2 como gas nebulizador (5 l/min). El voltaje de ionización se ajustó a 4.500 V y se aplicó gas seco a 5 psi y 250°C. Los espectros se recogieron con un espectrómetro de masas de trampa de iones Esquire3000 + (Bruker Daltonik) a una velocidad de exploración de 13.000 m/z por segundo. Usando ESI en modo positivo, se adquirieron espectros de masas de 50 a 1600 m/z en modo de escaneado y conmutación dependiente de datos entre el análisis de MS y MS/MS. Para aumentar la calidad de los espectros MS/MS, sólo se seleccionaron dos iones precursores de un espectro para el análisis MS/MS y la exclusión activa se fijó en 2 min para excluir los iones precursores que ya se habían medido.

(4) Procesamiento de datos: El procesamiento de datos se realizó con los paquetes de software Data Analysis (versión 3.0) y BioTools (versión 3.0) (Bruker Daltonik). La identificación de las proteínas se realizó utilizando el software MASCOT (versión 2.1) y la base de datos MSDB (Matrix Science, Londres, Reino Unido).

(5) Resultados:

Tabla 2: nBH identificado por MS

carril	Lote nBH	Proteína concentr.	Nombre de la ORF	Genbank acc.	aa de ORF	PM [kDa]	Mascot resultado
2	TE311206	192 ng/ μl	NT02CB1446 CBO1444	CAL82987.1	254-594	38,6	725
3	TIK301009	130 ng/ μl	NT02CB1447 CBO1445	CAL82988.1	249-581	37,3	555
4	TIK280509	114 ng/ μl	NT02CB1447 CBO1445	CAL82988.1	249-581	37,3	609

La banda de proteína de 38,6 kDa del carril 2 (lote nBH TE311206) se identificó como NT02CB1446/CBO1444 con una puntuación de Mascot de 725 y una cobertura de secuencia de MS/MS de péptido de 29,6% sobre todo el marco de lectura abierto (ORF). No se identificó ningún péptido derivado de los 253 aminoácidos N-terminales (Figura 4). El análisis MS/MS del lote TE311206 mostró una cobertura de secuencia del 52% de acuerdo con los aminoácidos C-terminales 254-594 que formaban el nBH.

Las bandas de proteína de 37,3 kDa de la banda 3 (lote nBH TIK301009) y el carril 4 (lote nBH TIK280509) se identificaron como NT02CB1447/CBO1445 con una puntuación de Mascot de 555 y 609, respectivamente. Excepto uno, todos los péptidos identificados derivan de los aminoácidos C-terminales 333 (Figura 5). El análisis MS/MS del lote TIK301009 mostró una cobertura de secuencia de 49,5% de acuerdo con los aminoácidos C-terminales 249-581 que formaban el nBH.

Ejemplo 3: Caracterización de la especificidad enzimática de nBH

(1) Se comparó la actividad proteolítica dependiente de la concentración de nBH derivada de tres lotes de purificación (Figura 6). Un ensayo de actividad que analiza nBH derivado de los lotes TIK301009, TIK280509 y TE311206 usando diversas diluciones de nBH demuestra que las diluciones más altas disminuyen la velocidad de escisión. La actividad proteolítica de los tres lotes diferentes es casi idéntica, indicando que la isoforma madurada NT02CB1446 (TE311206) muestra una actividad específica similar a la NT02CB1447 madurada (SEQ ID NO: 1).

(2) La escisión dependiente del tiempo de scBoNT/A de tipo natural y los mutantes por nBH se analizaron empleando la prueba de actividad (Figura 7). ScBoNTAS de tipo natural es activado por nBH de una manera dependiente del tiempo en la cadena ligera y la cadena pesada dentro de 120 minutos en más del 95%. La secuencia de bucle se modificó para caracterizar el sitio de escisión. En scBoNTAS Throm se eliminan todos los residuos de lisina y se inserta la secuencia de reconocimiento de trombina LVPRGS que prolonga la velocidad de escisión. En scBoNT Res, el bucle carece de cualquier aminoácido básico que retrase drásticamente la hidrólisis completa, indicando una fuerte preferencia de reconocimiento de nBH por residuos básicos como lisina y arginina en el sitio de escisión. Además, la accesibilidad de nBH al bucle se ve afectada por el acortamiento del bucle en ocho residuos pequeños o cinco aminoácidos con cadenas laterales voluminosas (scBoNTAS (GGSG)₂ y scBoNTAS FQWYI).

(3) El análisis de MS/MS del producto de escisión de 50 kDa tras la digestión de scBoNT/A con nBH mostró que el péptido más C-terminal adscrito cubre los aminoácidos G433 a K438, lo que corresponde al término C fisiológicamente observado de BoNT/A LC (Figura 8A). El análisis del producto de escisión de 100 kDa que se identificó como cadena pesada de BoNT/A demostró que el péptido más atribuido en el extremo N-terminal cubre los aminoácidos A449 a K456, lo que corresponde al término N fisiológicamente observado de BoNT/A HC (Figura 8B). De este modo, el nBH aislado produce el BoNT/A fisiológicamente procesado y preferiblemente hidroliza los enlaces peptídicos C-terminales a los residuos de lisina y arginina.

Ejemplo 4: Conservación evolutiva de BoNTHydrolase y sus isoformas

El análisis de la secuencia de proteínas de SEQ ID NO: 2 (Genbank ac. CAL82988.1/YP_001253958.1) reveló tres dominios conservados. Los residuos 18-573 corresponden a una metaloproteasa de zinc (elastasa) o LasB implicada en el transporte de aminoácidos y el metabolismo con una puntuación de Blast de 738. Los residuos 148 - 212 corresponden a un propéptido de peptidasa y el dominio YPEB o PepSY (Puntuación Blast 97. Los residuos 336-573 son parte de la familia de la peptidasa M4 incluyendo termolisina, proteolisina, aureolisina y proteasas neutras (puntuación de Blast 803).

La secuenciación del genoma de *C. botulinum* ATCC 3502 ha revelado la existencia de seis ORFs que codifican isoformas de iBH (Sebaihia et al., 2007, Genome Res. 17(7): 1082 - 1092). Otros datos del genoma están disponibles para 10 cepas de *C. Botulinum* del grupo I, así como la *C. sporogenes* que secreta de no-BoNT que contienen todas entre cinco a siete ORFs que codifican iBH. La nBH (SEQ ID NO: 1) comparte una identidad de secuencia de aminoácidos del 64% como mínimo con las otras 63 isoformas.

Ejemplo 5: Generación de anticuerpos específicos para la BoNTHydrolase

(1) Generación de IgY: Pollos de dieciséis semanas (ISA Brown y Lohmann Selected Leghorn (LSL), Sreenhagener Vermehrungsbetrieb für Legehennen GmbH, Bestensee, Alemania) fueron mantenidos en jaulas individuales, construidas exclusivamente para el mantenimiento de pollos (Ebeco, Castrop-Rauxel, Alemania). Alimentos (ssniff Legehühner-Zucht 1 y 2, ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Alemania) y agua estaban disponibles *ad libitum*, y los pollos comenzaron a poner huevos entre las 23 y 25 semanas de edad. Los huevos se recogieron diariamente, se etiquetaron y se almacenaron a 4°C hasta que se procesaron después. Todo el mantenimiento de los animales y los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices de las autoridades locales, Berlín (núm. H0069/03). Los pollos se inmunizaron y se reforzaron a través de la vía i.m. (músculo pectoral, lado izquierdo y derecho) un total de 10 veces en un período de 1 año, con intervalos entre 4 y 8 semanas. El intervalo utilizado se basó en trabajos anteriores que no mostraron células de memoria demostrables hasta al menos 3 semanas después de la inmunización (Pei y Collisson, 2005). La concentración de antígeno utilizada fue de aproximadamente 20 µg por inyección (nBH). No se inyectaron más de 500 µl de solución de antígeno por inmunización. Se utilizó adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y se utilizó FIA para las inyecciones de refuerzo posteriores. El método para la purificación de IgY se adaptó de Polson et al. (1980). Brevemente, la yema de huevo se diluyó 1:2 con PBS estéril (pH 7,4, Roche, Mannheim, Alemania). Para la eliminación de lípidos y lipoproteínas, se añadió polietilenglicol 3,5% (p/v) (PEG) 6000 (Roth, Karlsruhe, Alemania). Después de agitación suave seguido de centrifugación (10.000 xg durante 20 min a 4°C), el sobrenadante se decantó y se añadió PEG 6000 sólido a una

concentración final de 12% (p/v). Esta mezcla se centrifugó entonces como anteriormente. El precipitado se disolvió en 10 ml de PBS, se añadió PEG al 12% (p/v) y se centrifugó la solución. Finalmente, el precipitado se disolvió en 1,2 ml de PBS, se transfirió a un dispositivo de microdialisis (QuixSep, Roth, Alemania) y se dializó contra PBS a 4°C. El contenido de proteína (mg/ml) se analizó mediante SDS-PAGE al 12,5% (Figura 9A) y se midió fotométricamente a 280 nm y se calculó según la ley Lambert-Beer con un coeficiente de extinción de 1,33 para IgY.

(2) ELISA: Se recubrieron placas de microvaloración Nunc Maxisorp F96 (VWR International GmbH, Darmstadt, Alemania) con nBH de varios lotes (500 ng/ml) en PBS durante la noche a 4°C y después se bloquearon durante 1 h con tampón de bloqueo de PBS que contenía Tween- 20 y 2% de leche desnatada sin grasa (Merck, Darmstadt, Alemania). Después del lavado, se añadió una dilución de IgY (10 µg/ml en tampón de bloqueo) durante 1 h y se detectó usando IgY anti-pollo de burro marcado con biotina, estreptavidina - peroxidasa de rábano picante (ambos de Dianova, Hamburgo, Alemania) y 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma). El nBH detectado se ilustra en la figura 9B.

(3) Western blot: NBH se separó por SDS-PAGE al 12,5%, y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) usando técnicas de inmunotransferencia estándar. La membrana se bloqueó durante la noche a 4°C, y se incubó con IgY (1:5.000 en tampón de bloqueo) durante 1 h. Después del lavado, la membrana se probó con IgY anti-pollo de burro marcado con biotina durante 30 minutos y se desarrolló usando fosfatasa alcalina y CDP-Star (Perkin Elmer, Waltham, MA).

Ejemplo 6: Expresión recombinante de BoNTHydrolase

(1) Construcciones de plásmidos: Las porciones génicas que codifican BH nativo (SEQ ID NO: 1) y su propéptido (SEQ ID NO: 2) se amplificaron mediante PCR usando oligonucleótidos adecuados y ADN genómico de *C. botulinum* ATCC 3502, fusionado a un oligonucleótido que codifica His6Tag e insertado en pQE3 (Qiagen) produciendo el plásmido de expresión pQ-BH1445H6-249-581 y pQ-BH1445H6-1-581, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos se verificaron por secuenciación de ADN.

(2) Purificación de proteínas recombinantes: NBH e iBH, fusionados a un His6Tag carboxilo-terminal, se produjeron utilizando la cepa de *E. coli* M15pREP4 (Qiagen) durante diez horas de incubación a temperatura ambiente, y se purificaron sobre perlas de Talon-Sepharose (Clontech Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las fracciones que contenían las proteínas deseadas se reunieron, se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C. IBH se aisló como proteína recombinante con un PM de 63 kDa (Figura 10A). La inactividad de iBH se demostró usando la prueba de actividad: después de 1 h a 37°C no se hidrolizó scBoNT/A wt en LC y HC (Figura 10b).

Ejemplo 7: Inhibición de BoNTHydrolase

(1) Selección de inhibidores peptídicos de BH: Los péptidos basados en SEQ ID NO: 4 a 25 se sintetizarán carentes de uno o más residuos básicos. Cada péptido se añadirá a la mezcla de acuerdo con el ensayo de actividad. Un péptido capaz de disminuir la cantidad de scBoNT/A procesado, prolongar la duración requerida para el procesamiento completo de scBoNT/A o el procesamiento de bloques scBoNT/A se considera un inhibidor de nBH.

(2) Selección de inhibidores basados en anticuerpos: Los anticuerpos generados contra epítopos derivados de nBH como IgY del Ejemplo 5 se incuban con nBH y posteriormente se someten al ensayo de actividad. Un anticuerpo capaz de disminuir la cantidad de scBoNT/A procesado, prolongar la duración requerida para el procesamiento completo de scBoNT/A o el procesamiento de bloques scBoNT/A se considera un inhibidor de nBH.

Ejemplo 8: Uso de BoNTHydrolase (nBH) activa purificada para obtener el polipéptido procesado proteolíticamente

(1) 200 µg de scBoNT/A purificado recombinante se incuban con 350 ng de BoNTHydrolase activa purificada durante 12 min a 37°C. Para detener la reacción, nBH se elimina por SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y la cantidad de escisión es analizada por SDS-PAGE al 10% (Figura 11A).

(2) La fracción 1 (1800 µl) que contiene ~ 40% de BoNT/A procesado se incubaba con 350 ng de BoNTHydrolase activa purificada durante 15 min a 37°C y se concentra a 300 µl por ultrafiltración. Para finalmente detener la reacción, se separa nBH por SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y la cantidad de escisión se analiza mediante SDS-PAGE al 10% (Figura 11B).

(2) Las fracciones 1 y 2 (1800 µl) que contienen ~ 80% de BoNT/A procesado se combinan y se incuban con 120 ng de BoNTHydrolase activa purificada durante 25 min a 37°C y se concentran a 300 µl por ultrafiltración. Para detener finalmente la reacción se separa nBH por SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y la cantidad de escisión se analiza mediante SDS-PAGE al 10% (Figura 11C). Se obtiene un BoNT/A procesado a >95% (SEQ ID NO: 3). Se obtiene el segundo polipéptido idéntico totalmente procesado (> 95% de BoNT/A procesado) si el segundo polipéptido se procesa en

una etapa durante 50 min a 37°C (200 µg de scBoNT/A incubado con 350 ng de nBH). Después de un tiempo de incubación de 1 hora a 37°C, se procesa más del 97% de BoNT/A.

Listado de secuencias

5 <110> Syntaxin Limited
 <120> Métodos para la fabricación de polipéptidos procesados proteolíticamente
 <130> P40008EP - D1
 10 <140> Aún no asignado
 <141> 2011-05-11
 <150> EP11004152.2
 15 <151> 2011-05-11
 <160> 27
 <170> PatentIn versión 3.5
 20 <210> 1
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum
 25 <400> 1
 Val Gln Gly Gln Ser Val Lys Gly Val Gly Lys Thr Ser Leu Asp Gly
 1 5 10 15
 Leu Val Asn Ile Asp Val Thr Tyr Gly Asn Gly Lys Tyr Tyr Leu Lys
 20 25 30
 Asp Ser Asn Lys Asn Ile Tyr Leu Tyr Asp Leu Lys Asn Gln Val Asp
 35 40 45
 Glu Tyr Asp Leu Tyr Asn Tyr Leu Ser Arg Pro Asn Tyr Lys Gln Ile
 50 55 60
 Leu Met Ser Lys Ser Glu Leu Ile Ser Asn Tyr Asn Asn Asn Phe Ile
 65 70 75 80
 Ala Asn Asn Gln Val Asn Ser Val Asp Ala Tyr Val Asn Thr Asn Lys
 85 90 95
 Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Asn Lys Leu Asn Arg Asn Ser Ile Asp Asn
 100 105 110
 Lys Gly Met Asn Ile Asn Gly Phe Val His Val Gly Arg Asn Tyr Gly
 115 120 125
 Asn Ala Phe Trp Tyr Gly Pro Tyr Asp Gly Met Phe Phe Gly Asp Gly
 130 135 140
 Asp Gly Ile Tyr Phe Ser Ser Leu Ala Lys Ser Leu Asp Val Val Gly
 145 150 155 160
 His Glu Leu Ser His Gly Val Thr Asn Lys Glu Ser Asn Leu Lys Tyr
 165 170 175

ES 2 634 261 T3

Glu Asn Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ser Phe Ser Asp Ile Met Gly
180 185 190

Val Ala Val Glu Gly Lys Asn Phe Val Leu Gly Glu Asp Cys Trp Val
195 200 205

Ala Gly Gly Val Met Arg Asp Met Glu Asn Pro Ser Arg Gly Gly Gln
210 215 220

Pro Ala His Met Lys Asp Tyr Lys Tyr Lys Thr Met Asn Asp Asp Asn
225 230 235 240

Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile Ile Asn His Ala Ala Tyr Leu
245 250 255

Val Ala Asp Gly Ile Glu Lys Thr Gly Ala Lys Asn Ser Lys Asp Ile
260 265 270

Met Gly Lys Ile Phe Tyr Thr Ala Asn Cys Tyr Lys Trp Asp Glu Thr
275 280 285

Thr Asn Phe Ala Lys Cys Arg Asn Asp Val Val Gln Val Thr Lys Glu
290 295 300

Leu Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Tyr Val Lys Ile Val Glu Lys Ala Phe
305 310 315 320

Asp Gln Val Gly Ile Thr Ala Thr Pro Gln Leu Pro Leu
325 330

<210> 2

<211> 581

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<400> 2

Met Lys Ser Lys Lys Leu Leu Ala Thr Val Leu Ser Ala Val Ile Thr
1 5 10 15

Phe Ser Thr Val Ser Ala Val Tyr Ala Ala Pro Val Gly Lys Glu Ser
20 25 30

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

Asn Thr Lys Lys Ala Ala Thr Asp Ile Thr Glu Lys Lys Phe Asn Asn
50 55 60

Ser Glu Glu Ile Thr Lys Phe Phe Glu Lys Asn Ile Ser Lys Phe Gly
65 70 75 80

Val Gln Lys Gly Ser Leu Lys Asn Thr Lys Thr Val Lys Asp Glu Lys

ES 2 634 261 T3

85										90					95				
Gly	Lys	Thr	Asn	Tyr	His	Met	Ile	Tyr	Glu	Val	Glu	Gly	Ile	Pro	Val				
			100					105					110						
Tyr	Tyr	Gly	Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Thr	Glu	Lys	Asp	Ser	Ser	Met	Asp				
		115					120					125							
Ser	Ile	Asn	Gly	Arg	Ile	Asp	Thr	Val	Phe	Glu	Asn	Gly	Asn	Trp	Lys				
	130					135					140								
Asn	Lys	Ile	Lys	Leu	Ser	Lys	Glu	Asp	Ala	Ile	Ala	Lys	Ala	Lys	Asn				
	145				150					155					160				
Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Lys	Ala	Thr	Ser	Lys	Lys	Thr	Asp	Leu	Tyr	Leu				
				165					170					175					
Tyr	Asn	Phe	Glu	Gly	Lys	Pro	Tyr	Val	Val	Tyr	Leu	Val	Asp	Leu	Ile				
			180					185					190						
Thr	Asp	Asn	Gly	Ser	Trp	Thr	Val	Phe	Val	Asn	Ala	Glu	Asp	Gly	Ser				
		195					200					205							
Ile	Val	Asn	Lys	Phe	Asn	Asn	Thr	Pro	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Lys	Asp				
	210					215					220								
Gln	Lys	Leu	Pro	Asn	Ala	Lys	Lys	Ile	Lys	Asp	Glu	Ala	Lys	Lys	Ala				
	225				230					235					240				
Ser	Asn	Ala	Asn	Asn	Val	Ile	Asp	Val	Gln	Gly	Gln	Ser	Val	Lys	Gly				
				245					250					255					
Val	Gly	Lys	Thr	Ser	Leu	Asp	Gly	Leu	Val	Asn	Ile	Asp	Val	Thr	Tyr				
			260					265					270						
Gly	Asn	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Asp	Ser	Asn	Lys	Asn	Ile	Tyr	Leu				
		275					280					285							
Tyr	Asp	Leu	Lys	Asn	Gln	Val	Asp	Glu	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asn	Tyr	Leu				
	290					295					300								
Ser	Arg	Pro	Asn	Tyr	Lys	Gln	Ile	Leu	Met	Ser	Lys	Ser	Glu	Leu	Ile				
	305				310					315					320				
Ser	Asn	Tyr	Asn	Asn	Asn	Phe	Ile	Ala	Asn	Asn	Gln	Val	Asn	Ser	Val				
				325					330					335					
Asp	Ala	Tyr	Val	Asn	Thr	Asn	Lys	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Lys				
			340					345					350						
Leu	Asn	Arg	Asn	Ser	Ile	Asp	Asn	Lys	Gly	Met	Asn	Ile	Asn	Gly	Phe				
		355					360					365							

ES 2 634 261 T3

Val His Val Gly Arg Asn Tyr Gly Asn Ala Phe Trp Tyr Gly Pro Tyr
 370 375 380
 Asp Gly Met Phe Phe Gly Asp Gly Asp Gly Ile Tyr Phe Ser Ser Leu
 385 390 400
 Ala Lys Ser Leu Asp Val Val Gly His Glu Leu Ser His Gly Val Thr
 405 410 415
 Asn Lys Glu Ser Asn Leu Lys Tyr Glu Asn Glu Ser Gly Ala Leu Asn
 420 425 430
 Glu Ser Phe Ser Asp Ile Met Gly Val Ala Val Glu Gly Lys Asn Phe
 435 440 445
 Val Leu Gly Glu Asp Cys Trp Val Ala Gly Gly Val Met Arg Asp Met
 450 455 460
 Glu Asn Pro Ser Arg Gly Gly Gln Pro Ala His Met Lys Asp Tyr Lys
 465 470 475 480
 Tyr Lys Thr Met Asn Asp Asp Asn Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly
 485 490 495
 Ile Ile Asn His Ala Ala Tyr Leu Val Ala Asp Gly Ile Glu Lys Thr
 500 505 510
 Gly Ala Lys Asn Ser Lys Asp Ile Met Gly Lys Ile Phe Tyr Thr Ala
 515 520 525
 Asn Cys Tyr Lys Trp Asp Glu Thr Thr Asn Phe Ala Lys Cys Arg Asn
 530 535 540
 Asp Val Val Gln Val Thr Lys Glu Leu Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Tyr
 545 550 555 560
 Val Lys Ile Val Glu Lys Ala Phe Asp Gln Val Gly Ile Thr Ala Thr
 565 570 575
 Pro Gln Leu Pro Leu
 580

<210> 3

<211> 1296

5 <212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<400> 3

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

ES 2 634 261 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val

ES 2 634 261 T3

290	295	300
Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys 305 310 315 320		
Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu 325 330 335		
Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp 340 345 350		
Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn 355 360 365		
Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr 370 375 380		
Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn 385 390 395 400		
Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu 405 410 415		
Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg 420 425 430		
Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys 435 440 445		
Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe 450 455 460		
Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu 465 470 475 480		
Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu 485 490 495		
Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro 500 505 510		
Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu 515 520 525		
Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu 530 535 540		
Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu 545 550 555 560		
His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu 565 570 575		

ES 2 634 261 T3

Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
 580 585 590
 Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
 595 600 605
 Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
 610 615 620
 Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
 625 630 635 640
 Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
 645 650 655
 Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
 660 665 670
 Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
 675 680 685
 Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
 690 695 700
 Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
 705 710 715 720
 Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
 725 730 735
 Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
 740 745 750
 Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
 755 760 765
 Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
 770 775 780
 Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
 785 790 795 800
 Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
 805 810 815
 Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
 820 825 830
 Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
 835 840 845

ES 2 634 261 T3

Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
 850 855 860
 Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
 865 870 875 880
 Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
 885 890 895
 Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn
 900 905 910
 Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu
 915 920 925
 Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser
 930 935 940
 Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn
 945 950 955 960
 Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
 965 970 975
 Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu
 980 985 990
 Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser
 995 1000 1005
 Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg
 1010 1015 1020
 Leu Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln
 1025 1030 1035
 Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile
 1040 1045 1050
 Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp
 1055 1060 1065
 Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu
 1070 1075 1080
 Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys
 1085 1090 1095
 Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met
 1100 1105 1110

ES 2 634 261 T3

Leu Asn 1115 Leu Tyr Asp Pro Asn 1120 Lys Tyr Val Asp Val 1125 Asn Asn Val

Gly Ile 1130 Arg Gly Tyr Met Tyr 1135 Leu Lys Gly Pro Arg 1140 Gly Ser Val

Met Thr 1145 Thr Asn Ile Tyr Leu 1150 Asn Ser Ser Leu Tyr 1155 Arg Gly Thr

Lys Phe 1160 Ile Ile Lys Lys Tyr 1165 Ala Ser Gly Asn Lys 1170 Asp Asn Ile

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Pro 1295 Leu

<210> 4

<211> 25

5 <212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220>

<221> Loop BoNT/A1

10 <222> (1)..(25)

<400> 4

Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly
1 5 10 15

15 Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys
20 25

<210> 5

<211> 25

<212> PRT

20 <213> Clostridium Botulinum

<220>

ES 2 634 261 T3

<221> Bucle BoNT/A2/A6
 <222> (1)..(25)
 <400> 5
 5 Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly
 1 5 10 15
 Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys
 20 25
 <210> 6
 <211> 25
 10 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum
 <220>
 <221> Bucle BoNT/A3
 15 <222> (1)..(25)
 <400> 6
 Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly
 1 5 10 15
 Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys
 20 25
 20 <210> 7
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum
 25 <220>
 <221> Bucle BoNT/A3
 <222> (1)..(25)
 30 <400> 7
 Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly
 1 5 10 15
 Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Tyr Leu Cys
 20 25
 35 <210> 8
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum
 <220>
 40 <221> Bucle BoNT/A4
 <222> (1)..(25)
 <400> 8
 Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly
 1 5 10 15
 Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Glu Leu Cys
 20 25
 45 <210> 9
 <211> 25
 <212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220>

<221> Bucle BoNT/A5

5 <222> (1)..(25)

<400> 9

Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly
1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys
20 25

10 <210> 10
<211> 25
<212> PRT
<213> Clostridium Botulinum

15 <220>
<221> Bucle BoNT/A7
<222> (1)..(25)

20 <400> 10

Trp Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Pro Lys Ser Leu Asp Glu Gly
1 5 10 15

Ser Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys
20 25

25 <210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Clostridium Botulinum

30 <220>
<221> Bucle BoNT/B1/B4bv/B6
<222> (1)..(10)

<400> 11

35 Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT

40 <213> Clostridium Botulinum

<220>
<221> Bucle BoNT/B2/B3
<222> (1)..(10)

45 <400> 12

Cys Lys Ser Val Arg Ala Pro Gly Ile Cys
1 5 10

50 <210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Clostridium Botulinum

55 <220>
<221> Bucle BoNT/B5np

<222> (1)..(10)
 <400> 13

5 Cys Lys Ser Val Lys Val Pro Gly Ile Cys
 1 5 10

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Bucle BoNT/C/CD
 <222> (1)..(17)
 15 <400> 14

Cys His Lys Ala Ile Asp Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Lys Thr Leu Asp
 1 5 10 15

Cys

20 <210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum

25 <220>
 <221> Bucle BoNT/D
 <222> (1)..(14)
 <400> 15

30 Cys Leu Arg Leu Thr Lys Asn Ser Arg Asp Asp Ser Thr Cys
 1 5 10

<210> 16
 <211> 14
 35 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Bucle BoNT/DC
 40 <222> (1)..(14)
 <400> 16

Cys Leu Arg Leu Thr Arg Asn Ser Arg Asp Asp Ser Thr Cys
 1 5 10

45 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum

50 <220>
 <221> Bucle BoNT/E1-E5
 <222> (1)..(15)

55 <400> 17

Cys Lys Asn Ile Val Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys
 1 5 10 15

<210> 18

ES 2 634 261 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum

5 <220>
 <221> Bucle BoNT/E6
 <222> (1)..(15)
 <400> 18

10 Cys Lys Asn Ile Val Phe Ser Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Bucle BoNT/F1/F6
 20 <222> (1)..(17)
 <400> 19

Cys Lys Ser Val Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Ala Pro Pro Arg Leu
 1 5 10 15

25 Cys
 <210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum

30 <220>
 <221> Bucle BoNT/F2/F3
 <222> (1)..(17)

35 <400> 20

Cys Lys Ser Ile Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Gln Ser Pro Ser Leu
 1 5 10 15

Cys
 <210> 21
 40 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum

<220>
 45 <221> Bucle BoNT/F4
 <222> (1)..(17)
 <400> 21

Cys Lys Ser Ile Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Ala Pro Pro Arg Leu
 1 5 10 15

50 Cys
 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220>
 <221> Bucle BoNT/F5
 5 <222> (1)..(15)

<400> 22

Cys Leu Asn Ser Ser Phe Lys Lys Asn Thr Lys Lys Pro Leu Cys
 1 5 10 15

10 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum

15 <220>
 <221> Bucle BoNT/F7
 <222> (1)..(15)

20 <400> 23

Cys Lys Ser Ile Val Ser Lys Lys Gly Thr Lys Asn Ser Leu Cys
 1 5 10 15

25 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum

30 <220>
 <221> Bucle BoNT/G
 <222> (1)..(15)

<400> 24

35 Cys Lys Pro Val Met Tyr Lys Asn Thr Gly Lys Ser Glu Gln Cys
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 29
 <212> PRT

40 <213> Clostridium Tetani

<220>
 <221> Bucle TeNT
 <222> (1)..(29)

45 <400> 25

Cys Lys Lys Ile Ile Pro Pro Thr Asn Ile Arg Glu Asn Leu Tyr Asn
 1 5 10 15

Arg Thr Ala Ser Leu Thr Asp Leu Gly Gly Glu Leu Cys
 20 25

50 <210> 26
 <211> 1005
 ADN <212>
 <213> C. Botulinum

55 <400> 26

ES 2 634 261 T3

atggttcaag gtcaaagcgt taaaggagta ggaaaaacta gcttggatgg actagtaaat	60
attgatgtaa cttatggaaa tggaaaatac tatttaaaag atagcaacaa aaatatttat	120
ctatatgact taaaaaatca agttgatgaa tatgatctat acaattatct tagtagacct	180
aactataaac aaatattaat gagcaaatct gaattaatat ctaattacaa taataatttt	240
atagccaaca atcagggttaa ttctgtagat gcttatgtaa acacaaataa aacctatgat	300
tattataaaa acaaattaaa tagaaacagt attgataata aggggatgaa tattaatggg	360
tttgttcatg taggtagaaa ttatggtaat gctttttggt acggtccata tgatgggatg	420
ttctttggcg atggcgacgg aatatacttc tcttcccttg caaaatcttt agatgttgta	480
ggccacgaat taagtcattg tgtaacaaat aaagagtcta atcttaaata tgaaaatgaa	540
tctggtgccc taaatgaatc tttctcagat attatgggag tagctgttga gggtaaaaac	600
tttgtactag gtgaagattg ctgggttgct ggaggagtaa tgagagatat ggaaaatcca	660
tccagaggag gccaaccagc tcatatgaaa gattataaat acaaaactat gaatgacgat	720
aacggtggtg ttcatacaaa ttcagggtata ataaaccatg ctgcttattt agttgcagat	780
ggaatagaaa aaactggtgc aaaaaatagt aaagatatta tgggaaaaat attctataca	840
gctaattgct ataaatggga tgaaacaaca aattttgcta agtgcagaaa tgatgtagtc	900
caagttacta aagaacttta tggcgaaaat agcaactatg taaaaattgt tgaaaaagct	960
tttgaccaag ttggaataac tgctacacct caattaccat tataa	1005

5 <210> 27
 <211> 1746
 ADN <212>
 <213> Clostridium Botulinum

10 <400> 27

ES 2 634 261 T3

atgaaaagta	aaaaattatt	agctacagtg	ctaagtgccg	tgatcacttt	ttctactgtt	60
tctgcagttt	atgctgcgcc	tgtaggaaaa	gaaagtaaag	ttgaaccaa	aactacaaca	120
ataacttggg	aaaaaaatga	acaaaatact	aaaaaagctg	ctactgatat	aactgaaaag	180
aaatttaaca	attctgagga	gataactaaa	ttctttgaaa	aaaatatatc	taaatttggg	240
gtacaaaaag	gttctcttaa	aaacaccaag	actgtaaaag	acgaaaaagg	taaaactaac	300
tatcatatga	tttatgaagt	agaagggtata	cctgtatact	atggaagaat	tgtttttaca	360
actgaaaaag	actcctccat	ggattctata	aacggtagaa	ttgatactgt	ttttgaaaat	420
gggaattgga	aaaacaaaat	caaactatca	aaagaagatg	ctatagcaaa	agctaaaaat	480
gatattaaag	atgaaaaagc	aactagtaaa	aagaccgatt	tatatctgta	taattttgag	540
ggcaaacctt	atgtagttta	tttagtagat	ctaattacag	acaacgggag	ttggacgggt	600
ttcgtaaatg	ctgaggatgg	ttctatagta	aataaattta	ataatactcc	tactttaatt	660
gatactaaag	atcaaaaatt	acccaatgct	aaaaaaatta	aagatgaagc	taaaaaagct	720
agtaatgcaa	ataatgtaat	tgatgttcaa	ggtcaaagcg	ttaaaggagt	aggaaaaact	780
agcttggaatg	gactagtaaa	tattgatgta	acttatggaa	atggaaaata	ctatttataaa	840
gatagcaaca	aaaatattta	tctatatgac	ttaaaaaatc	aagttgatga	atatgatcta	900
tacaattatc	ttagtagacc	taactataaa	caaataatta	tgagcaaata	tgaattaata	960
tctaattaca	ataataattt	tatagccaac	aatcagggtta	attctgtaga	tgcttatgta	1020
aacacaaata	aaacctatga	ttattataaa	aacaaattaa	atagaaacag	tattgataat	1080
aagggtatga	atattaatgg	gtttgttcat	gtaggtagaa	attatggtaa	tgctttttgg	1140
tacggtccat	atgatgggat	gttctttggc	gatggcgacg	gaatatactt	ctcttccctt	1200
gcaaaatcct	tagatgttgt	aggccacgaa	ttaagtcatg	gtgtaacaaa	taaagagtct	1260
aatcttaaat	atgaaaatga	atctggtgcc	ctaaatgaat	ctttctcaga	tattatggga	1320
gtagctgttg	agggtaaaaa	ctttgtacta	ggtgaagatt	gctgggttgc	tgaggaggata	1380
atgagagata	tggaaaatcc	atccagagga	ggccaaccag	ctcatatgaa	agattataaa	1440
tacaaaacta	tgaatgacga	taacgggtgg	gttcatacaa	attcagggtat	aataaaccat	1500
gctgcttatt	tagttgcaga	tggaatagaa	aaaactggtg	caaaaaatag	taaagatatt	1560
atgggaaaaa	tattctatac	agctaattgc	tataaatggg	atgaaacaac	aaattttgct	1620
aagtcagaaa	atgatgtagt	ccaagttact	aaagaacttt	atggcgaaaa	tagcaactat	1680
gtaaaaattg	ttgaaaaagc	ttttgaccaa	gttggaaata	ctgctacacc	tcaattacca	1740
ttataa						1746

REIVINDICACIONES

1. El uso de Lys-C para el procesamiento proteolítico de una neurotoxina botulínica de cadena sencilla serotipo A (BoNT/A) por hidrólisis para producir neurotoxina botulínica di-cadena serotipo A (BoNT/A).
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en el que la neurotoxina botulínica de cadena única serotipo A (BoNT/A) es una neurotoxina natural, una neurotoxina recombinante o neurotoxina modificada, tal como una neurotoxina que carece del dominio H_c natural o partes de las mismas o derivados con otros residuos de aminoácidos que sustituyen al dominio H_c de la neurotoxina.
- 10 3. El uso según la reivindicación 2, en el que la neurotoxina botulínica de cadena única serotipo A (BoNT/A) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 50% con una secuencia polipeptídica seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 25;
preferiblemente en el que la Lys-C hidroliza el serotipo A de la neurotoxina botulínica de cadena sencilla (BoNT/A) en una posición inmediatamente C-terminal a un resto de aminoácido básico dentro de dicha secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 25.
- 15 4. El método para la fabricación de un polipéptido procesado proteolíticamente, que comprende la etapa de poner en contacto:
(a) un primer polipéptido, siendo dicho primer polipéptido Lys - C;
con
(b) un segundo polipéptido, siendo dicho segundo polipéptido susceptible a la proteólisis por dicho primer polipéptido;
- 20 en donde dicho contacto da como resultado un procesamiento proteolítico de dicho segundo polipéptido en al menos dos productos de escisión;
en el que el segundo polipéptido es un serotipo A de la neurotoxina botulínica de una sola cadena (BoNT/A) y en el que dicho primer polipéptido hidroliza la neurotoxina botulínica de cadena sencilla serotipo A (BoNT/A) para producir una neurotoxina botulínica serotipo A di-cadena (BoNT/A).
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha neurotoxina botulínica de cadena única serotipo A (BoNT/A) es una neurotoxina de origen natural, una neurotoxina recombinante o neurotoxina modificada, tal como una neurotoxina que carece del dominio H_c natural o partes del mismo o derivados con otros residuos de aminoácidos que sustituyen al dominio H_c de la neurotoxina .
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con una secuencia polipeptídica seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 25;
preferiblemente en el que el primer polipéptido escinde proteolíticamente el segundo polipéptido en una posición inmediatamente C-terminal a un resto de aminoácido básico dentro de dicha secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 25.
- 35 7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, o el método según cualquiera de las reivindicaciones 4 - 6, en el que el extremo C de la cadena L y el extremo N de la cadena H de la neurotoxina botulínica di-cadena serotipo A (BoNT/A) son idénticas a la correspondiente neurotoxina botulínica di-cadena serotipo A (BoNT/A) aislada de clostridios naturales.
- 40 8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, 7 o el método según cualquiera de las reivindicaciones 4 - 7, en el que la neurotoxina botulínica di-cadena serotipo A (BoNT/A) tiene una secuencia de aminoácidos idéntica cuando se compara con el correspondiente polipéptido de la neurotoxina botulínica di-cadena serotipo A (BoNT/A) generado a partir del mismo polipéptido de serotonina A de neurotoxina botulínica de cadena única (BoNT/A) en clostridios naturales.
- 45 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 - 8, en el que dicho contacto tiene lugar dentro de una célula, en un lisado celular o en un lisado celular purificado.

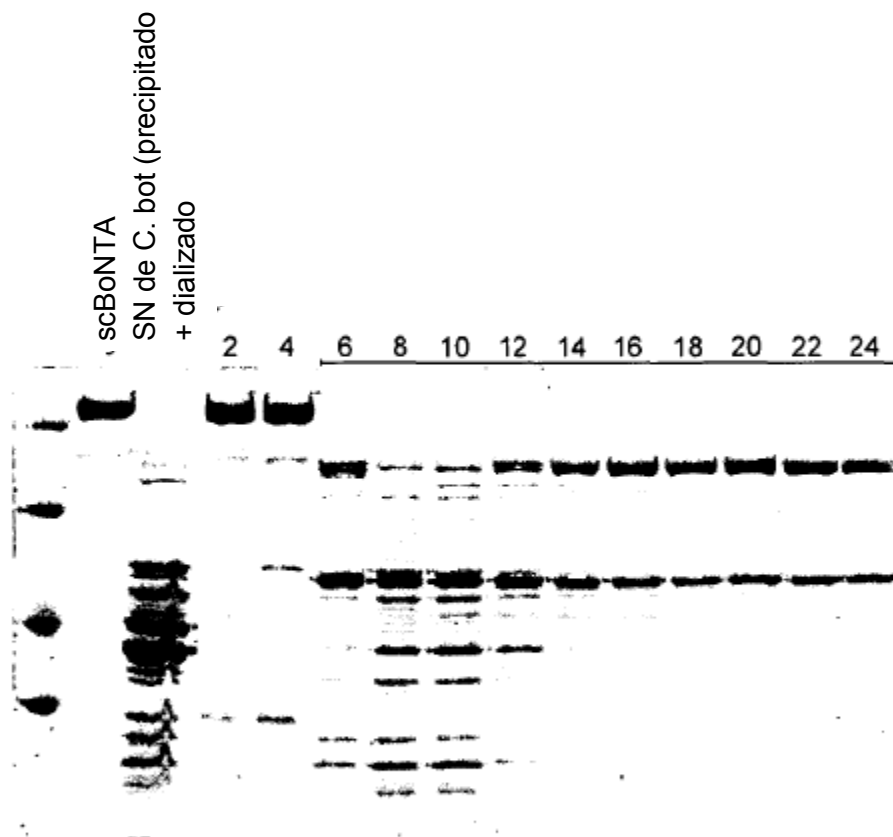


Figura 1

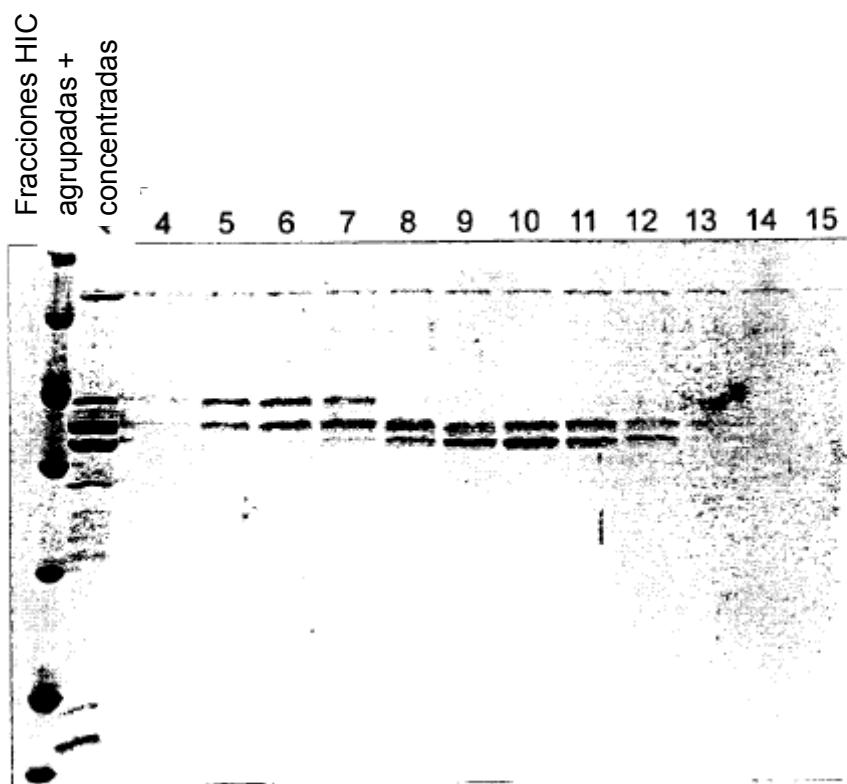


Figura 2

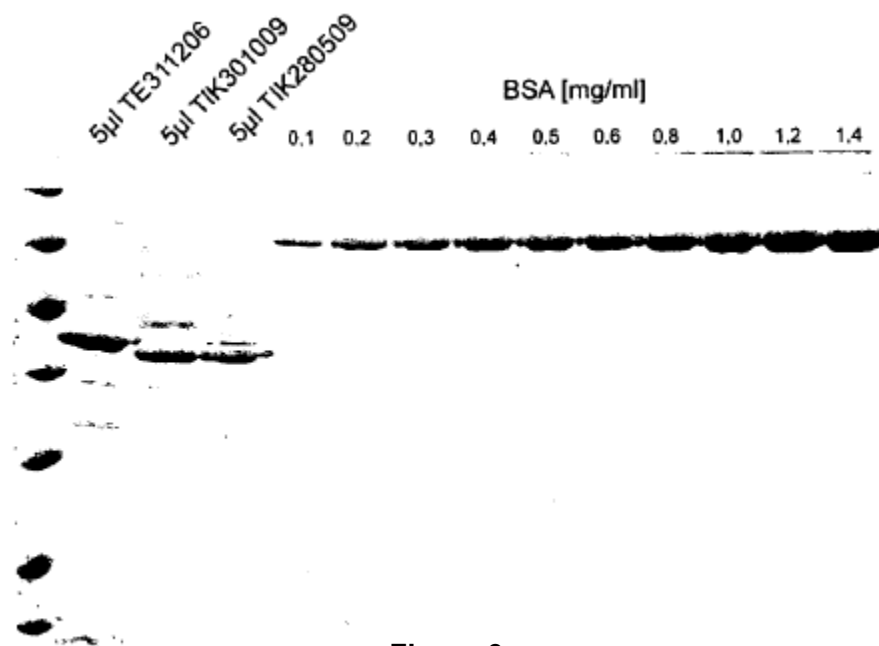


Figura 3

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
HKSEKLLATV	LSAVITTSFSAV	SAVSAAPVOK	ESKSDPKTTT	ISWDKSEQNA	KKATTDIRQK	KFDNAOEITK	FFEMNISKFG	VKKGTLSNFK	TLKDDKQKTH	YHTIYEVEGI
120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
FVYVGRIVFT	TEKDSTNDSI	NGEVDTVFEN	GNWNNKIKLS	KEDAIKAKA	DIKNEKSNKE	KAEYLTNFE	GKPYVVLVN	SITNSGNVDI	FVNAEDGSIV	NKFINIPTLL
230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
DTKAEKLPNA	EKIKDEAKN	EAKRANNDI	IIDVQGQSVK	GLQRTSLDGL	VNINLTVDNG	RYVLRDNNRK	IYLYDLKHQV	BLDDLNDFTD	SPKGGHNEEL	HRSELVSNB
340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
NDNFVDDNQV	NSVDATANNA	KSYDYVINKL	SENSLDNKGM	NIGFVHFDE	NLGNAPVQGE	YDSHFFGDD	GVRLSPLAKA	LDVVGHELSH	GVTNRQSDLK	YEKESGALNE
450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
SFSDINCTAI	EGRNFIEIGD	CMIPSDRYK	INPDNKPDR	GNOPAHMKDF	RLPVDDEDH	WGGVHTNSGI	INHAAYLIAD	GFEKHGEKDS	EDINAKIFYI	ANCYYVDQIT
560	570	580	590	600						
DFSCKPNDVV	EVARDLYGDN	SKEVQIVKHA	FDQVGITATP	QLPL						

Figura 4

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
MSSEKLLATV	LSAVITTFSTV	SAVYAAPVGK	ESKVEPKITT	ITMEKNEQNT	KKAATDITEK	KFNNSEEEITK	FFERNISKFG	VQKGLKNTK	TVKDEKGTN	YHRIYEVEGI
120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
PVYYGRIVFT	TERDSSHDSI	NGRIDTVFEN	GNVWKKIKLS	KEDAIKAKN	DIKDEKATSK	KTDLYLYNFE	GKPTVVYLVN	LITDNGSSTV	FVNAEDGSIV	NKFNNTPTLI
230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
DTKDQKLPNA	KKIKDEAKKA	SNANNVIDVQ	QGSVKGVGKT	SLDGLVNIDV	TYQNGKYTLK	DSNKNITLYD	LKHQVDEYDL	YNLSRPNYK	QILMSKSELI	SNYNNIPIAN
340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
NQVNSVDATV	NTNKTYDYK	NKLNPSIDN	KGNNGFVN	VGMNYGNFV	YGPYDGMFFG	DGDGIYFSSL	AKSLDVVGHE	LSHGVTNKS	NLKYENESGA	LNESFSDING
450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
VAVEGRNFVL	GEDCVVAGGV	NRDHENPSRG	QOPAHMEDVK	YKTHNDNDGG	VHTNSGIINH	AAYLVADGIE	KTGAKNSKDI	HGRIFTTANC	YKUDETINFA	KCRNDVVQVT
560	570	580	590							
KELYGENSNY	VKIVEKAFDQ	VGITATPQLP	L							

Figura 5

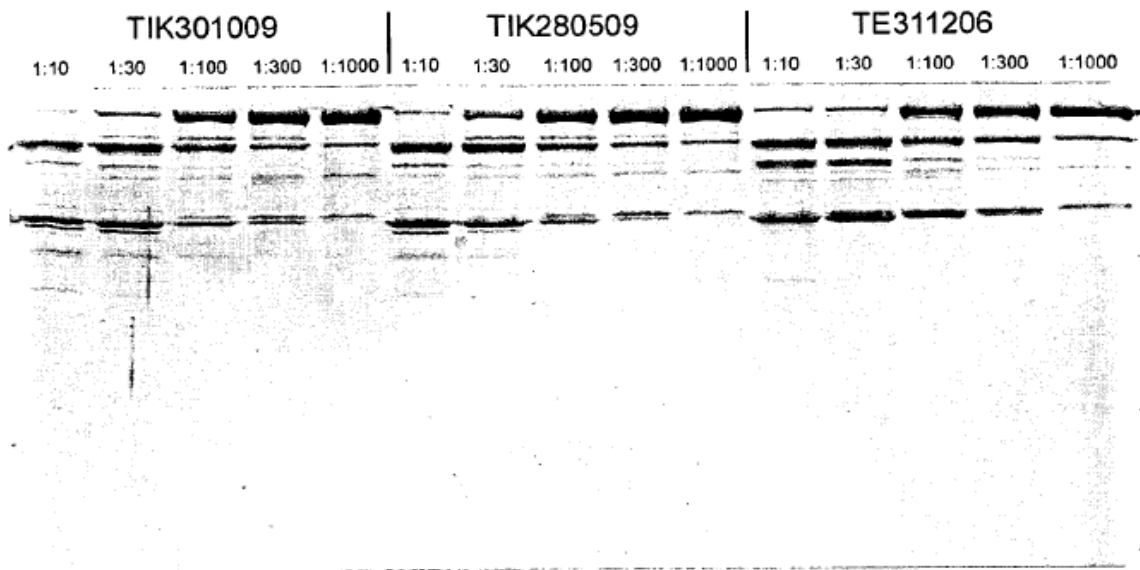


Figura 6A

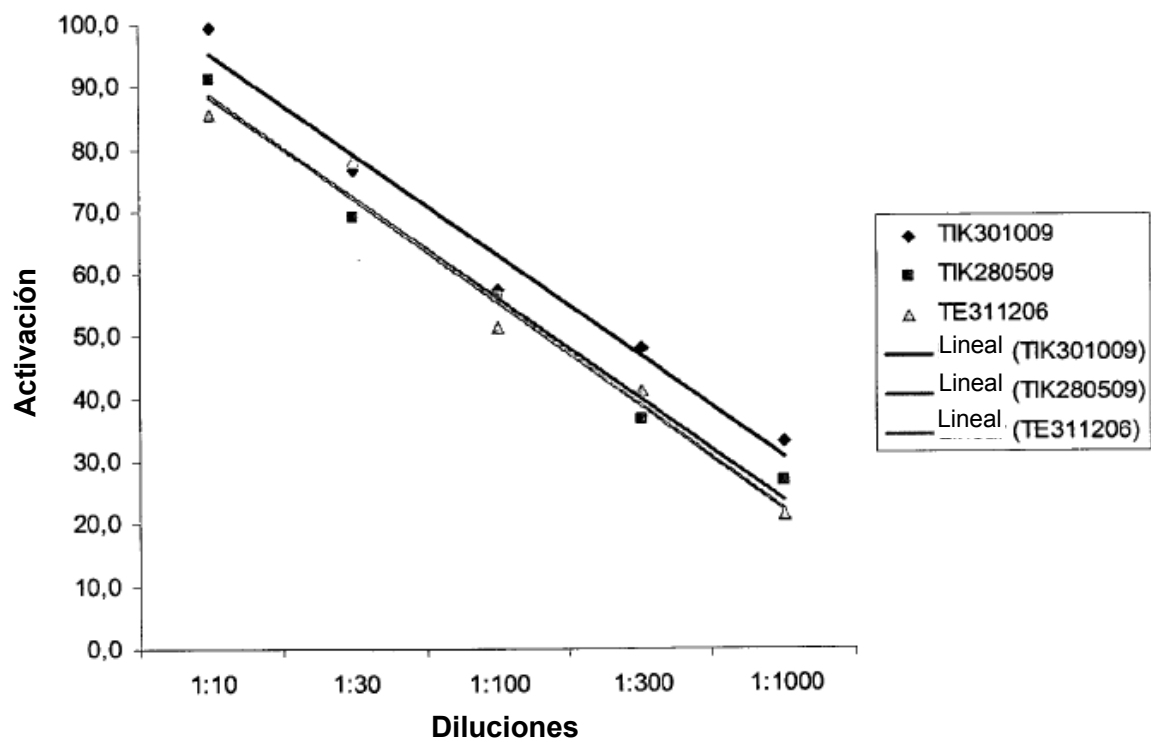


Figura 6B

A

scBoNTAS wt	KLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKV
scBoNTAS Throm	KLLCVRGIITS.T.SLVPRGS.ALNDLCIKV
scBoNTAS Res	KLLCV.GIITS.T.SLVP.GS.ALNDLCIKV
scBoNTAS (GGSG) ₂	KLLCGGSG.....GSGGCIKV
scBoNTAS CGS-C	KLL.G.....S.IKV
scBoNTAS FQWYI	KLLCFQW.....YICIKV

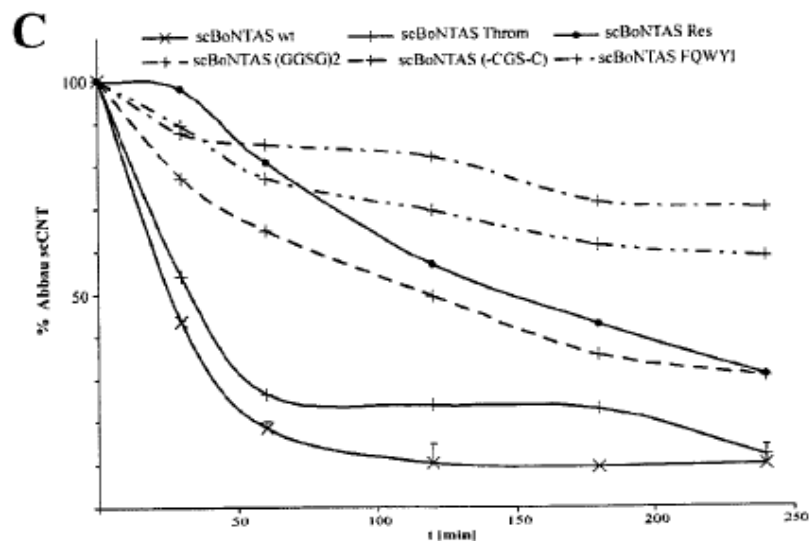
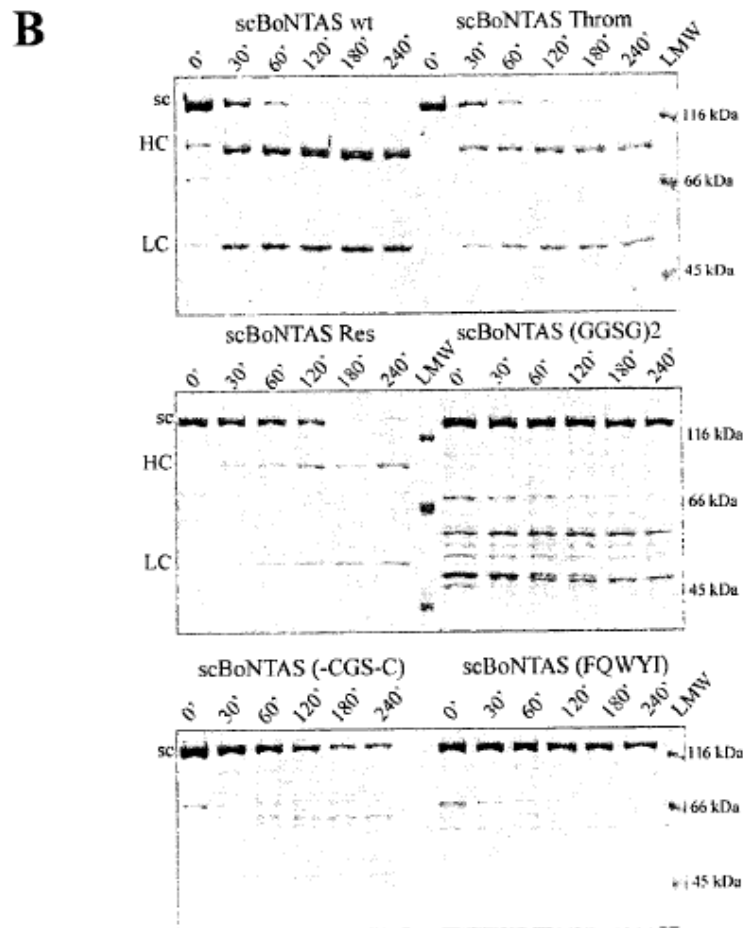


Figura 7

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
HPFVVKQIMY	KDPVNGVDIA	YIKIPNAGOR	QPUKAFKIMN	KIUVIPERDT	FINPEEGDLN	PPPEARQVPU	STYDSTYIST	ONEKSNVLEG	VTKLPRKIVS	TDLGRMLITS	IYRGIPFNGG	STIDTELKVI
140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
DTWCINVICP	DGSVRSSEELN	LVIIGPSADI	IQFECKSFCH	KULANLTHOY	OSTOTIRFSP	DFTFOFEESL	EVDTNPLIGA	GEFATDPAVT	LAHELHAGH	RLYGIANPN	RVFKVNTNAY	YERSGLEVSP
270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
EELRYFGSDH	AKFIDSLQEN	KFRLVYVNF	KDIASLTINKA	KSIVGTIASL	QTRSNVFKKK	YLLSEDTSGK	FSVDKLNFDK	LYKHLTEIYT	KIMFVVFYKV	LNRKTYLMFD	KAVFKINIVP	KVMYIYDGF
400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
HLRNTNLAAH	FNQONTYIMH	IMFTELRGFT	GLFEFYKLLC	VRGIIISRTK	SLRGKYNKAL	NOLCIKYNVW	DLFFSPSEIN	FTMDLNKKEE	ITSQTNIEAA	KENISLDLIQ	QYVLTFFNFD	EPENISIEHL
530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
SSDIIGOLEL	KPNIERFPNG	KKVELDKYTH	FHVLRAQEF	HCKSRIALTN	SUNEALLNPS	RVYVFFSSDT	VEKVNKATKA	ANFLGUVEQL	VYDFTDKTSE	VSTTDKIADI	TIIPYIGPA	LNIGNHLYKD
660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
DPVVALIFSG	AVILLEPIE	IAIPVLGTFA	LVSYIANKVL	TVQTIIDNALS	KRNEKWDDEV	KYIVTNULAK	VMTQIDLRK	KKKEALENQA	EATKAIINTQ	YNQYTEEKFN	NINPNIDDL	SKKNESINKA
790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
NININIKFLNQ	CSVSYLMSHR	IPYGVKRLD	FDASLKDALL	KYIYDNRGTL	IGQVDRKDK	VNNTLSTDIP	FQLSKYVDNQ	RLLSFTTEYI	KNIINTSILM	LRYESNHLID	LRYFASKINI	GSKVNFDPID
920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
KNOIQLFNLE	SSKIEVILKH	AIYVNSNYEN	FSTSFVIRIP	KYFNSISLNN	EYTIINCEN	MSGVKVSLNY	GEIINTLQDT	QRIKQKVVF	YSQMINISDY	INRWIFVTIT	NNRLNNSKIY	INGRLIDQKP
1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
ISNLGNIRAS	NNINFKLDC	RDERTYIIR	YFNLFDKELN	EKEIKDLYDN	QNSGILKDF	WGDYLYQDKP	YTHLMLYDPN	KYVDVNVGI	RGYNLYKPR	QSVHTNIYL	NSSLVYOTKF	IIRKYASGNK
1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
DNIVRNRDRV	YIMVYVONKE	YRLATHASQA	GVEKILSALE	IPDVGNLSQV	VVENSKNDQ	ITNKCKNMLQ	DKNQNDIGFI	GFMQNNIAK	LVASNWTNRQ	IKRSRTLOC	SUKFIPVDDG	WGERPL

Figura 8A

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MPFVNKQFNY	KDPVNGVDIA	YIKIPNACQH	QPVKAFKHH	KIWVIPERDT	FTNPTEGDLN	PPPEAKQVPV	SYDSTYLSL	DNEKDNVLCG	VTKLPERIYS
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TDLCGRLLTS	IVRGIPFWGG	STIDTELKVI	DTNCINVIQP	DGSTRSEELN	LVIIGPSADI	IQFECKSFCH	EVLNLIRNGY	GSTQYIRFSP	DFTFGFRESL
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
RVDNTPLLGA	GKFDTPPAVT	LAHELHAGH	RLYGIAINPN	RVPKVNINAY	YEMSGLEVSF	EELRTFGGHD	AKFIDSLQNN	EFRLYYYNKP	KDIASLTNKA
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
KSIUCITASL	QYBQVVPREK	YLLSBDTSCK	FSVDRLKFDK	LYKHLTEIYT	EDNFVVFVKV	LNKRTYLNFD	KAVFKINIVP	KVNYTIYDGF	NLWNTNLAAN
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
FNGQNTIINN	HNFTRLKNFT	CLFEFYKLLC	VRGIITSKTK	SLDKGYMKAL	NOLCIKVMNV	DLFFSPSRDN	FINDLNKGEZ	ITSNTINRAA	ENHISLDLIQ
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
QTYLTFFNFDN	EPENISIEHL	SSDIICQLBL	MPNISRFPNC	KRYELDKYTH	FHYLRAQEFH	HCKSRIALTN	SVNREALLNP	RVYTFSSDY	VKKVINKATEA
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
AMFLGUVEQL	VYDFTDISE	VSTTDKIADI	YIIIPYICPA	LHIGNHLYKD	DFVGCALIPG	AVILLEFIPE	IAIPVLGTFA	LVSYIAMKVL	TVQIDNALS
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
KRNEKMDVY	KYIVTNWLAH	VNTQIDLIRK	KYKEALENOA	EATKAIINTQ	YNQYTERERN	NINFNIDDL	SKLNESINKA	HINIMKFLNQ	CSVSYLHNSH
810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
IPYGVKRLSD	FDASLWDALL	KYIYDNBCTL	IGQVDRKDK	VNHTLSTDIP	FOLSKYVDNQ	RLSTFTFYI	KMIINTSILN	LRYESNHLID	LSRYASKINI
910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
GSKVNFDPID	KNQIQLFNLE	SSKIEVILKN	AIVYNSHYEN	FSTSFUIRIP	KYFHSISLNN	EYTIINCHEN	NSCARVSLNY	GRIIUTLODT	QEKQRVVPK
1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
YSQMINISDY	INRWIFVTIT	NNRLNNSKIY	INCLIDQKP	ISNLCNINAS	NNIMFKLDGC	RDTHRYIUIK	YFNLDFKELN	EKEIKDLYDN	QSUSGILKDF
1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
UCDYLYQYDKP	YYMLNLYDPN	KYVDVNNVCI	ECYHYLKCPR	GSVHTINIYL	NSSLVAGTKF	IIRKYASGKH	DNIVBNNDRV	YINVVVGNKE	YRLATHASQA
1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
GVKILSALE	IPDVGNLSQV	VVHKSNDQC	ITNKCQNLQ	DNNGNDICFI	GFHQPMNIAR	LVASNVYNRQ	IERSRILGC	SWFIPVDDG	UCERPL

Figura 8B

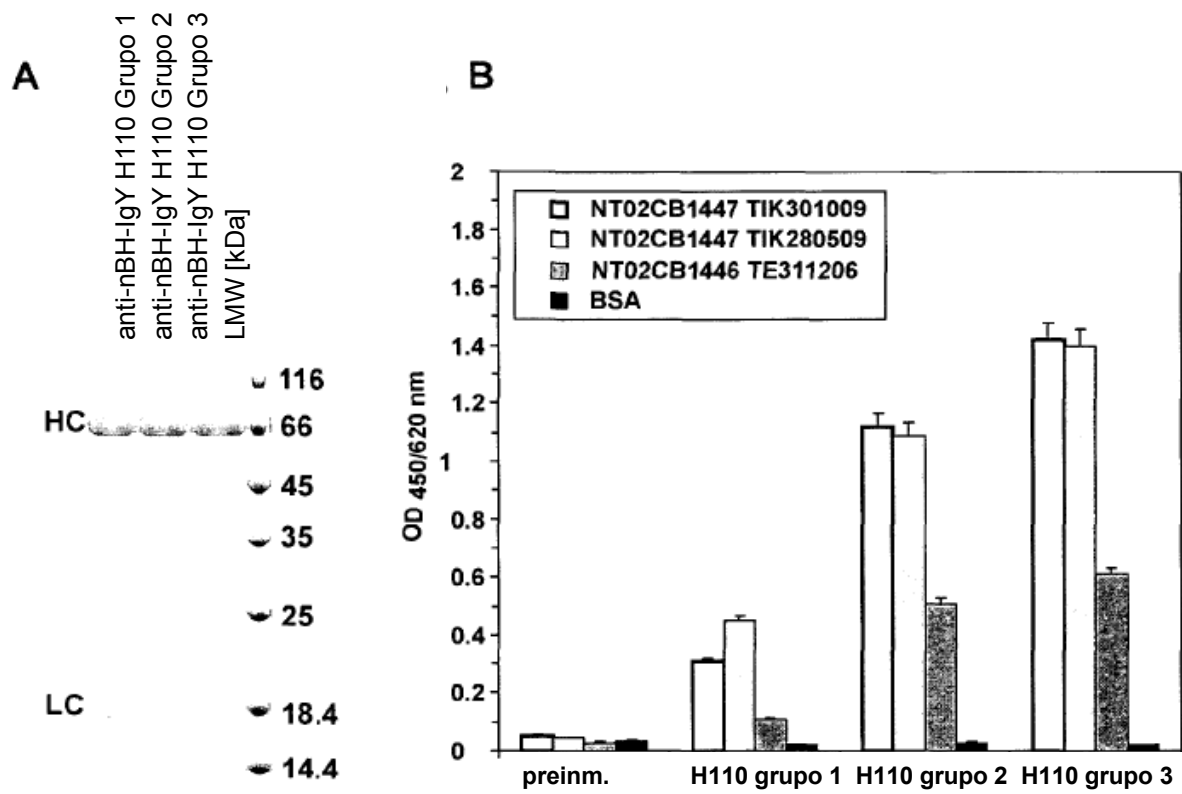


Figura 9

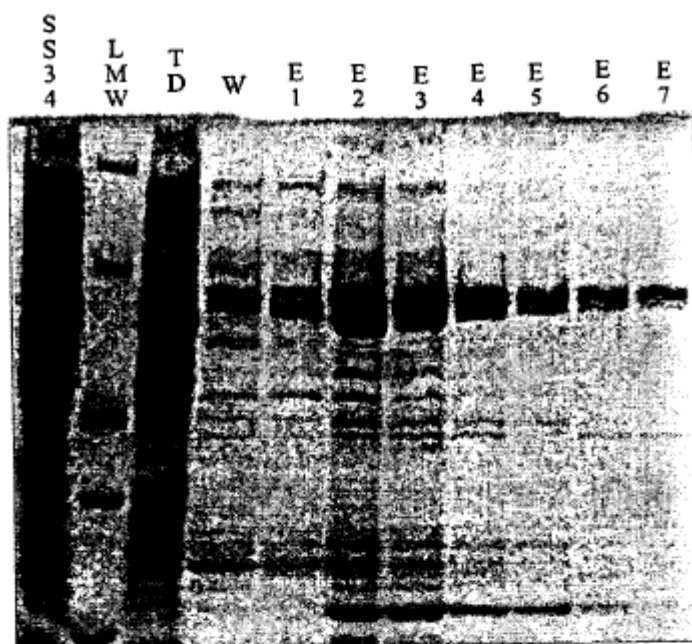


Figura 10A

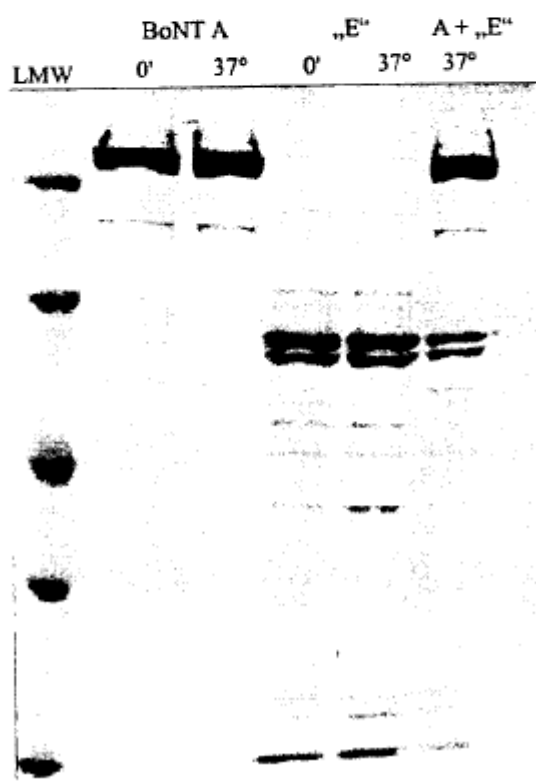


Figura 10B

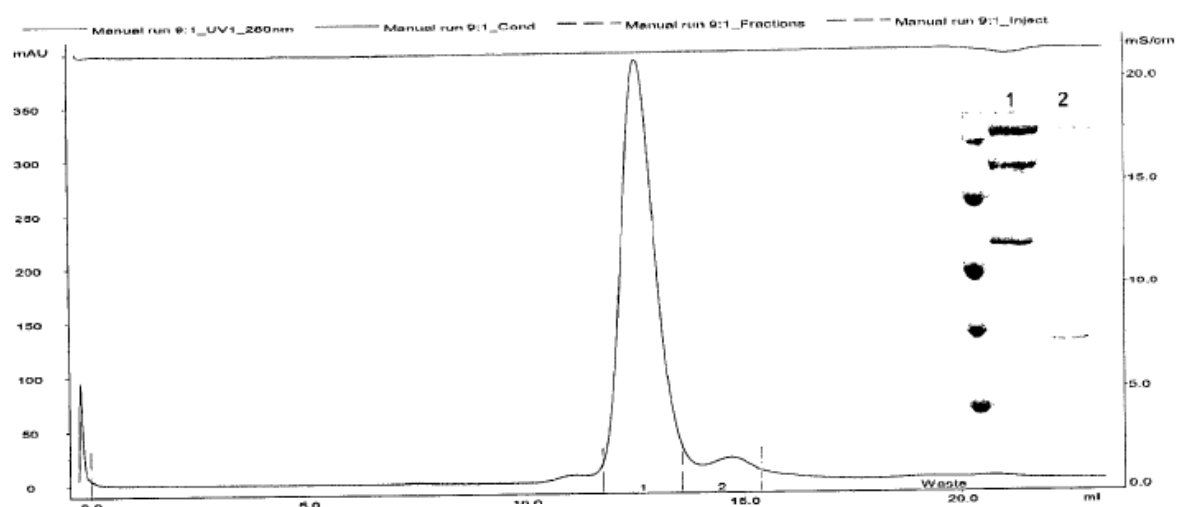


Figura 11A

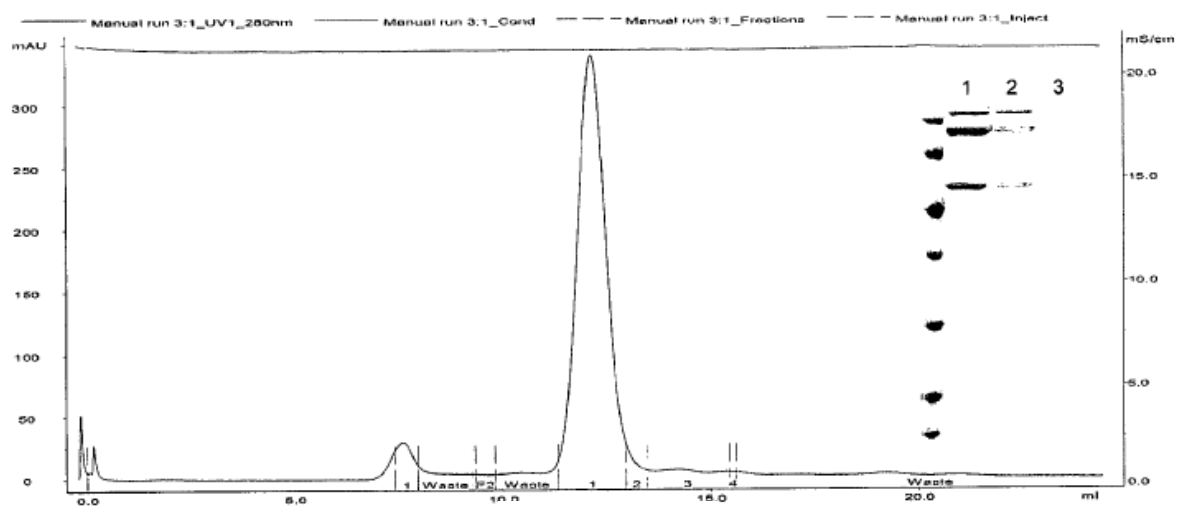


Figura 11B

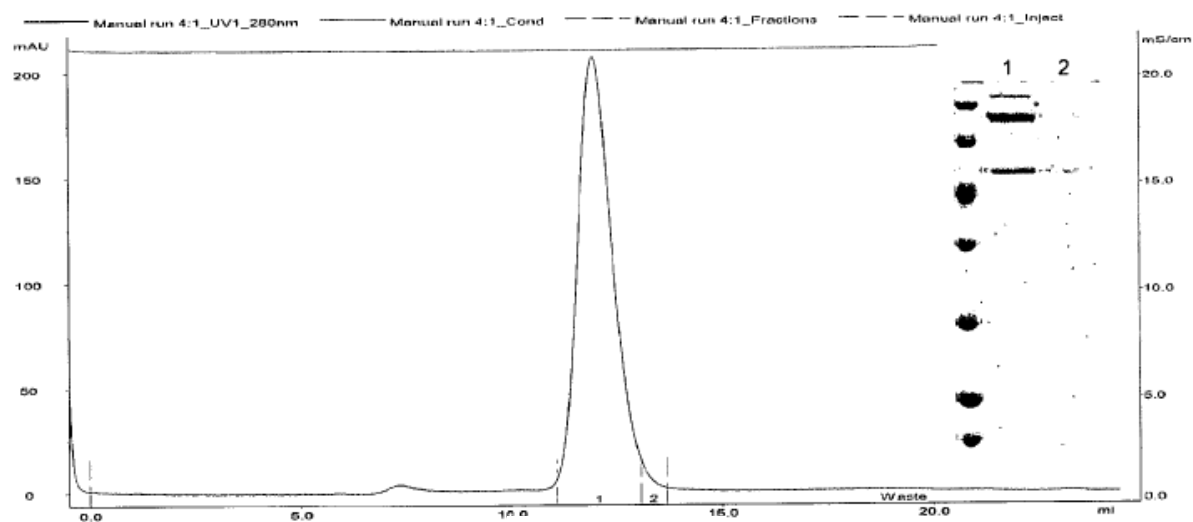


Figura 11C