

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 243**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2010 PCT/EP2010/055432**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010 WO10124998**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2010 E 10714037 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2425251**

54 Título: **Medios y métodos para la determinación de la cantidad de polipéptido Neurotoxina y de sus actividades catalíticas y proteolíticas**

30 Prioridad:

**27.04.2009 EP 09158788**  
**27.04.2009 US 214650 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.12.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PFEIL, MICHAEL y**  
**FRIEDRICH, JOSEF**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 647 243 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

Medios y métodos para la determinación de la cantidad de polipéptido Neurotoxina y de sus actividades catalíticas y proteolíticas

La presente invención se refiere al campo de las herramientas para asegurar la preparación de polipéptidos y el control de calidad. Específicamente, se refiere a un procedimiento para determinar la cantidad de polipéptido Neurotoxina tratado (activo) en una solución que comprende polipéptido Neurotoxina tratado y polipéptido Neurotoxina parcialmente tratado o sin tratar. La presente invención se refiere además a un dispositivo para determinar dicha cantidad y a un equipo adaptado para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención.

*Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani* producen neurotoxinas muy potentes, es decir, toxinas *botulinum* (BoNT) y toxina tetánica (TeNT), respectivamente. Estas neurotoxinas clostridiales (CNT) se unen específicamente a las células neuronales e interrumpen la liberación de neurotransmisores. Cada toxina se sintetiza como una proteína no tratada inactiva monocatenaria de aproximadamente 150 kDa. El tratamiento tras la traducción implica la formación de puentes disulfuro, y proteólisis (corte) limitada por la(s) proteasa(s) bacteriana(s). Esta neurotoxina activa consiste en dos cadenas, una cadena ligera con terminal N de aprox. 50 kDa y una cadena pesada de aprox. 100 kDa unida por un enlace disulfuro. Las CNT estructural y funcionalmente constan de tres dominios, es decir, la cadena ligera catalítica, la cadena pesada que abarca el dominio de translocación (mitad del terminal N) y el dominio de unión al receptor (mitad del terminal C), véase Krieglstein 1990, *Eur. J. Biochem.* 188, 39; Krieglstein 1991, *Eur. J. Biochem.* 202, 41; Krieglstein 1994, *J. Protein Chem.* 13, 49. Las neurotoxinas *botulínicas* se sintetizan como complejos moleculares que comprenden la proteína neurotoxina de 150 kDa y proteínas atóxicas asociadas. Los tamaños del complejo difieren en función de la cepa clostridial y los distintos serotipos de neurotoxina que van desde 300 kDa, más de 500 kDa y 900 kDa. Las proteínas atóxicas en estos complejos estabilizan la neurotoxina y la protegen contra la degradación, véase Silberstein 2004, *Pain Practice* 4, S19-S26.

*Clostridium botulinum* segrega siete serotipos antigénicamente distintos, denominados A a G de la neurotoxina *botulínica* (BoNT). Todos los serotipos junto con la neurotoxina tetánica relacionada (TeNT) segregada por *Clostridium tetani*, son endoproteasas-Zn<sup>2+</sup> que bloquean la exocitosis sináptica al escindir proteínas SNARE, véase Couesnon, 2006, *Microbiology*, 152, 759. Las CNT causan la parálisis muscular flácida que se observa en el botulismo y el tétanos, véase Fischer 2007, *PNAS* 104, 10447.

A pesar de sus efectos tóxicos, el complejo de la toxina botulínica se ha empleado como agente terapéutico en un gran número de enfermedades. La toxina *botulínica* serotipo A fue aprobada para uso humano en los Estados Unidos en 1989 para el tratamiento del estrabismo, blefaroespasma y otros trastornos. Está disponible en el mercado como preparado de proteína de *toxina* botulínica A, por ejemplo, con el nombre comercial BOTOX (Allergan Inc.) o con el nombre comercial DYSPORT (Ipsen Ltd.). Un preparado mejorado, la toxina botulínica A sin complejo está disponible en el mercado con el nombre comercial XEOMIN (Merz Pharmaceuticals GmbH). Para aplicaciones terapéuticas, el preparado se inyecta directamente en el músculo a tratar. A pH fisiológico, la toxina se libera del complejo proteico y tiene lugar el efecto farmacológico deseado. El efecto de la *toxina* botulínica es solo temporal, por lo que puede ser necesaria la administración repetida de toxina botulínica para mantener un efecto terapéutico.

Las neurotoxinas clostridiales debilitan la fuerza de los músculos voluntarios y son un tratamiento eficaz para el estrabismo, la distonía focal, incluida la distonía cervical y el blefaroespasma esencial benigno. También se ha demostrado que alivian el espasmo hemifacial y la espasticidad focal, y además, de ser eficaces en una amplia gama de otras indicaciones, tales como trastornos gastrointestinales, hiperhidrosis y corrección cosmética de arrugas, véase Jost 2007, *Drugs* 67, 669.

Durante el proceso de fabricación de las neurotoxinas clostridiales, la determinación cualitativa y cuantitativa, así como el control de calidad del polipéptido neurotoxina activo es de especial importancia. Los preparados de neurotoxina actualmente disponibles comprenden, además de la neurotoxina activa (tratada o madura) deseada, un precursor proteolíticamente no tratado y/o un polipéptido neurotoxina parcialmente tratado. El polipéptido neurotoxina precursor proteolíticamente no tratado o parcialmente tratado difiere del polipéptido neurotoxina maduro (activo, tratado) en una secuencia de solo unos pocos aminoácidos. Por lo tanto, difícilmente pueden distinguirse cuantitativamente en función de sus propiedades químicas y físicas. Por otra parte, la porción de precursor proteolíticamente no tratado y/o polipéptido neurotoxina parcialmente tratado de la proteína total todavía puede ser significativo en dichos preparados. La porción depende del sistema biológico utilizado para la producción y los resultados de la biosíntesis y las condiciones del proceso de fermentación. Por lo tanto, la cantidad de polipéptido neurotoxina maduro, biológicamente activo deseado en preparados de neurotoxina está predefinida y, actualmente, es bastante difícil de determinar.

Rassoly y Do (*Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74(14), págs. 4309-4313) describen el desarrollo de un ensayo de actividad *in vitro* como alternativa al bioensayo en ratón para la neurotoxina tipo A de *Clostridium botulinum*.

Stanker *et al.* (*Journal of Immunological Methods*, 2008, 336, págs. 1-8) describe el desarrollo y caracterización parcial de anticuerpos monoclonales de alta afinidad para la toxina botulínica tipo A y su empleo en análisis de leche por sandwich ELISA.

Los medios y procedimientos para un sistema de detección cualitativo y cuantitativo fiable del polipéptido neurotoxina maduro (activo) son muy deseables pero aún no están disponibles.

Por lo tanto, el problema técnico que subyace a la presente invención puede verse como la provisión de medios y procedimientos que cumplen con las necesidades mencionadas anteriormente. El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y a continuación.

La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para determinar la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratada en una solución que comprende polipéptido neurotoxina clostridial tratado y polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y/o sin tratar, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

- a) poner en contacto una primera porción de dicha solución que comprende polipéptido neurotoxina clostridial tratada y polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y/o sin tratar con un primer anticuerpo de captura que se une específicamente a la cadena ligera del polipéptido neurotoxina tratado, parcialmente tratado y sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho anticuerpo de captura a dicha cadena ligera de polipéptido neurotoxina clostridial tratado, parcialmente tratado, y sin tratar, formando así un primer complejo de anticuerpos,
  - b) poner en contacto dicho primer complejo de anticuerpo con un anticuerpo de detección que se une específicamente a la cadena pesada de dicho polipéptido neurotoxina clostridial tratado, sin tratar y parcialmente tratado, en el complejo de anticuerpo formado en la etapa a), por lo que se forma un primer complejo de detección,
  - c) poner en contacto una segunda porción de dicha solución que comprende polipéptido neurotoxina clostridial tratado y polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar con un segundo anticuerpo de captura que se une específicamente al enlazador de dicho polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar, en donde dicho segundo anticuerpo de captura se une específicamente a un epítipo peptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las SEQ. ID. n°: 1 a 16, formando así un segundo complejo de anticuerpos,
  - d) poner en contacto dicho segundo complejo de anticuerpo con el anticuerpo de detección que es diferente del anticuerpo de detección de la etapa b) y que se une específicamente al complejo de anticuerpo formado en la etapa c), con lo cual se forma un segundo complejo de detección,
  - e) determinar la cantidad del primer complejo de detección formado en la etapa b) y la cantidad del segundo complejo de detección formado en la etapa d), y
  - f) calcular la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratada, basándose en las cantidades del primer y segundo complejo de detección determinado en la etapa e).
- El procedimiento mencionado anteriormente puede, en general, comprender etapas adicionales incluidas las etapas para la preparación de la solución o etapas relativas a la evaluación adicional de los resultados obtenidos en la etapa f). Además, las etapas a) y b) así como las etapas c) y d) se pueden llevar a cabo simultánea o sucesivamente. En este último caso, las etapas a) y b) se pueden llevar a cabo antes o después de las etapas c) y d). Además, la determinación mencionada en la etapa e) puede llevarse a cabo en dicho caso después de que se hayan llevado a cabo ambas series de etapas o la determinación en la etapa e) en cuanto se trate del primer complejo de detección se lleva a cabo después de las etapas a) y b) mientras que la determinación concerniente al segundo complejo de detección se lleva a cabo después de las etapas c) y d). El procedimiento puede estar total o parcialmente asistido por automatización. Las etapas de incubación y medición pueden llevarlas a cabo, por ejemplo, un robot. El análisis e interpretación de datos se puede llevar a cabo mediante un algoritmo de cálculo implementado por ordenador.
- La expresión "polipéptido neurotoxina" como se emplea en la presente invención se refiere a los siete serotipos distintos de neurotoxinas botulínicas, es decir BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G y a la neurotoxina tetánica (TeNT), véase la tabla 1 y sus variantes.

Tabla 1: Neurotoxinas botulínicas y tetánicas

SEQ. ID. n°:	Referencia	n° de registro	Neurotoxina (completal)/Cepa bacteriana
17	Beecher 1997, <i>J. Protein Chem.</i> 16, 701-712 .; Krieglstein 1994, <i>J Protein Chem</i> 13, 49-57	ABD65472.1GI: 89258592	BoNT/A (Hall / 62A)
18	Antharavally 1998, <i>J. Protein Chem.</i> 17, 417-428.	BAE48264.1 GI: 81230332	BoNT/B (Okra)
19	Sagane 1999, <i>J. Protein Chem.</i> 18, 885-892.	BAA89713.1 GI:6729213	BoNT/C1 (C-6814)

SEQ. ID. n°:	Referencia	n° de registro	Neurotoxina (completal)/Cepa bacteriana
20	Sagane 1999, <i>J. Protein Chem.</i> 18, 885-892.	BAA90661.1 GI:6939795	BoNT/D (CB16)
21	Antharavally 1997, <i>J. Protein Chem.</i> 16, 787-799.	CAA43999.1 GI:40394	BoNT/E (Beluga)
22	Sagane 1999, <i>J. Protein Chem.</i> , 885-892.	CAA73972.1 GI:3805790	BoNT/F (NCTC10281)
23	Campbell 1993, <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 1216 (3), 487-491	CAA52275.1 GI:441276	BoNT/G
24	Krieglstein 1991, <i>Eur J Biochem</i> 202, 41-51.; Krieglstein et al.1990, <i>Eur. J. Biochem.</i> 188, 39-45.	P04958.2 GI:135624	TeNT

- Las neurotoxinas a las que se hace referencia en la presente memoria, en principio, comprenden una cadena ligera con terminal N y una cadena pesada con terminal C. Las neurotoxinas se producen como moléculas precursoras monocatenarias, denominadas en la presente memoria "polipéptidos de neurotoxina no tratados". La cadena ligera con terminal N y las secuencias de la cadena pesada con terminal C están separadas en las neurotoxinas no tratadas por al menos un punto de escisión proteolítica. Estas neurotoxinas contienen una secuencia enlazadora entre las secuencias de cadena ligera y pesada, en donde la cadena ligera está localizada en el terminal N desde el primer punto de escisión y la cadena pesada se localiza en el terminal C comenzando desde el segundo punto de escisión. En un aspecto de la invención, dicho enlazador tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las SEQ ID n°: 1 a n°: 16. Durante el tratamiento de las neurotoxinas, la secuencia enlazadora se escindiría. Estas neurotoxinas contienen dos puntos de escisión proteolítica, uno en el terminal N y uno en el extremo terminal C de las secuencias enlazadoras. Durante el tratamiento de dichas neurotoxinas, pueden producirse productos intermedios que se escinden en cualquier sitio de escisión, es decir, la secuencia enlazadora no se escindiría todavía, sino que permanecerá en la cadena ligera con terminal N o en la cadena pesada con terminal C. Dichos intermedios se denominan "polipéptidos de neurotoxina parcialmente tratados" en esta memoria descriptiva. Otras neurotoxinas, simplemente, contienen un sitio de escisión. Para esas neurotoxinas, se entenderá que no se puede escindir ninguna secuencia enlazadora. Sin embargo, la neurotoxina no tratada puede ser reconocida inmunológicamente por un punto de escisión proteolítica intacto y secuencias flanqueantes. Estas secuencias flanqueantes y el punto de escisión también se consideran un enlazador a efectos de la presente invención. Por lo tanto, el término "enlazador" como se emplea en la presente memoria y se especificó anteriormente se refiere a la secuencia entre las secuencias de cadena ligera y pesada para polipéptidos de neurotoxina que tienen dos puntos de escisión o al punto de escisión y secuencias flanqueantes para polipéptidos de neurotoxina que tienen solo un único punto de escisión. Como resultado del tratamiento, se obtiene "polipéptido neurotoxina tratado". Dicho polipéptido neurotoxina tratado presenta las propiedades biológicas características de una neurotoxina, a saber, (a) unión al receptor, (b) interiorización, (c) translocación a través de la membrana endosómica en el citosol, y/o (d) escisión endoproteolítica de proteínas involucradas en fusión de membrana de vesícula sináptica. Por lo tanto, el polipéptido neurotoxina tratado se denomina a veces en la presente memoria polipéptido neurotoxina activo o maduro. La actividad biológica de los polipéptidos de neurotoxina, en un aspecto, procede de todas las propiedades biológicas mencionadas anteriormente. Los ensayos *in vivo* para evaluar la actividad biológica incluyen el ensayo de LD50 de ratón y el ensayo de hemidiafragma de ratón *ex vivo* descrito por Pearce *et al.* y Dressier *et al.* (Pearce 1994, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128: 69 - 77 y Dressier 2005, *Mov. Disord.* 20:1617-1619). La actividad biológica se expresa normalmente en unidades de ratón (MU). Como se emplea en la presente memoria, 1 MU es la cantidad de componente neurotóxico, que mata al 50% de una población especificada de ratones tras la inyección intraperitoneal, es decir, la LD50 ip. de ratón.
- En un aspecto del procedimiento de la invención, dicho polipéptido neurotoxina se selecciona del grupo que consiste en: a) un polipéptido neurotoxina que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID n°: 17 a n°: 24, y b) un polipéptido neurotoxina que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 40% idéntica a la secuencia de aminoácidos del polipéptido neurotoxina como se muestra en cualquiera de las SEC ID n°: 17 a n°: 24. Las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente muestran polipéptidos de neurotoxina no tratados. Las secuencias de los correspondientes polipéptidos de neurotoxina parcialmente tratados o tratados se pueden deducir a partir de dichas secuencias mediante la información sobre los puntos de escisión proporcionados en la Tabla 3, a continuación. En otro aspecto de la invención, el polipéptido neurotoxina tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntico de secuencia a la secuencia de

aminoácidos mostrada en las SEQ ID nº: 17 a nº: 24. Idéntica a la utilizada en la presente invención se refiere a la identidad de secuencia de las secuencias de aminoácidos en donde las secuencias están alineadas de modo que se obtiene la coincidencia de mayor orden. Esto se puede conseguir utilizando técnicas o procedimientos publicados codificados en programas informáticos tales como, por ejemplo, BLASTP, BLASTN, FASTA, Altschul 1990, *J. Mol. Biol.* 215, 403. Los valores de identidad porcentuales se calculan, en un aspecto, sobre toda la secuencia de aminoácidos. Una serie de programas basados en una variedad de algoritmos está disponible para el especialista para comparar diferentes secuencias. En este contexto, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman dan resultados particularmente fiables. Para llevar a cabo las alineaciones de secuencia deben emplearse, el programa PileUp (1987, *J. Mol. Evolution* 25, 351; Higgins 1989 CABIOS 5, 151) o los programas GAP y BestFit (Needleman y Wunsch 1970, *J. Mol. Biol.* 48; 443; Smith y Waterman 1981, *Adv. Appl. Math.* 2, 482), que forman parte del paquete de programas informáticos GCG (Genetics Computer Group 1991, 575 Science Drive, Madison, Wis., EE.UU. 53711). Los valores de identidad de secuencia mencionados anteriormente en porcentaje (%) deben determinarse, en un aspecto de la invención, empleando el programa GAP en toda la zona de secuencia con las configuraciones siguientes: Ponderación de espacios: 50, Ponderación de longitud: 3, Promedio de coincidencias: 10,000 y promedio de desajustes: 0,000, que, a menos que se especifique de otra manera, siempre se utilizará como configuración típica para alineaciones de secuencia. Debe entenderse que las variantes anteriormente mencionadas deberán, en un aspecto de la invención, conservar, al menos una de las propiedades biológicas de las neurotoxinas y, en un aspecto, todas las propiedades biológicas de un polipéptido neurotoxina mencionado en la presente memoria. En otro aspecto, las variantes pueden ser neurotoxinas que tienen mejoradas o alteradas las propiedades biológicas, p. ej., pueden comprender puntos de escisión que se mejoran para el reconocimiento enzimático o pueden mejorarse para la unión al receptor o cualquier otra propiedad especificada anteriormente. Es concebible que el concepto de la presente invención se basa en la presencia de dos o más puntos de escisión entre la cadena ligera y pesada del polipéptido neurotoxina, mientras que la naturaleza de los puntos de escisión y la secuencia de aminoácidos concreta, entre ellos no importa mientras el agente sea específico para el polipéptido neurotoxina parcialmente tratado o sin tratar. Por consiguiente, es otro aspecto, reemplazar los puntos de reconocimiento de proteasas y el péptido enlazador entre la cadena pesada y ligera del polipéptido neurotoxina.

En otro aspecto, el polipéptido neurotoxina según el procedimiento de la invención puede ser una molécula híbrida. Dicha molécula híbrida, en un aspecto, puede tener dominios únicos sustituidos. Por consiguiente, en otro aspecto, la porción de la cadena pesada de neurotoxina se reemplaza por una porción de un dominio FC de un anticuerpo.

El término "cantidad" tal como se emplea en el procedimiento de la presente invención abarca la cantidad absoluta de un polipéptido, la cantidad relativa o la concentración de dicho polipéptido, así como cualquier valor o parámetro que se correlacione con el mismo o puede proceder del mismo.

El término "solución" tal como se emplea en la presente memoria se refiere a cualquier sistema disolvente que contenga el polipéptido neurotoxina maduro y sus precursores de polipéptidos de neurotoxina parcialmente tratados y/o no tratados. El sistema disolvente comprende además un disolvente. Los disolventes comprendidos, en diversos aspectos de la invención, son agua, sistemas tampón acuosos, disolventes orgánicos y líquidos iónicos. En un aspecto de la invención, es un sistema disolvente acuoso. Por otra parte, el sistema disolvente, además del polipéptido neurotoxina maduro y el polipéptido precursor de neurotoxina parcialmente tratado o sin tratar y el disolvente puede comprender también moléculas adicionales, incluidos polipéptidos bacterianos adicionales. En un aspecto, la solución que debe aplicarse en el procedimiento de la presente invención será un cultivo celular bacteriano o un preparado parcialmente purificado o purificado obtenido a partir de dicho cultivo celular bacteriano.

El término "porción" tal como se emplea según el procedimiento de la invención, se refiere a una muestra o alícuota de la solución. En un aspecto del procedimiento de la invención, la primera porción y la segunda porción a las que se hace referencia en esta invención son esencialmente iguales en volumen y contenido. Esto puede conseguirse, p. ej., midiendo el contenido de proteína total de la primera y la segunda porción, por lo que un contenido de proteína total esencialmente idéntico es indicativo de que una primera y una segunda porciones tienen esencialmente los mismos contenidos. Sin embargo, en otro aspecto, una porción a aplicar como una primera o segunda porción puede ser una dilución de la muestra o alícuota de la solución. Debe entenderse que dependiente de la cantidad de polipéptido neurotoxina que se determine (es decir, polipéptido neurotoxina parcialmente tratado o sin tratar o neurotoxina total), una dilución podría llegar a ser necesaria para permitir una determinación cualitativa y cuantitativa óptima. Los expertos en la técnica saben bien cómo hacer dichas diluciones.

El término "poner en contacto" tal como se emplea según el procedimiento de la invención se refiere a (i) llevar los anticuerpos de captura anteriormente mencionados y las neurotoxinas comprendidas por la solución o (ii) poner los complejos de anticuerpos y los anticuerpos de detección en proximidad física para permitir la interacción física y/o química. Las condiciones adecuadas que permiten una interacción específica son bien conocidas por los expertos en la técnica. Dichas condiciones dependerán de los anticuerpos y la solución a aplicar en el procedimiento de la presente invención y pueden ser adaptados por el experto en la materia sin más demora. Además, un tiempo suficiente para permitir la interacción también puede ser determinado por el especialista experto sin más dilación. Además, debe entenderse que entre las etapas individuales de contacto mencionadas en el procedimiento de la presente invención, pueden realizarse etapas de lavado para obtener condiciones adecuadas para el contacto. Por ejemplo, después de la formación de un primer complejo de anticuerpo en la etapa a), la solución restante debe eliminarse antes de aplicar el anticuerpo de detección a dicho complejo de anticuerpo. Además, una vez se forma el

primer complejo de detección en la etapa b), podría ser necesario eliminar el anticuerpo de detección (no complejo) restante antes de determinar la cantidad del primer complejo de detección en la etapa c). Lo mismo se aplica, por supuesto, para las etapas d) a f), en consecuencia. después de que se formó el primer complejo de detección en la etapa b), podría ser necesario eliminar el anticuerpo de detección (no complejo) restante antes de determinar la cantidad del primer complejo de detección en la etapa c). Lo mismo se aplica, por supuesto, para las etapas d) a f), en consecuencia. después de que se formó el primer complejo de detección en la etapa b), podría ser necesario eliminar el anticuerpo de detección (no complejo) restante antes de determinar la cantidad del primer complejo de detección en la etapa c). Por consiguiente, lo mismo se aplica, por supuesto, para las etapas d) a f).

Un "anticuerpo" tal como se emplea en la presente memoria comprende un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo hibridado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo sintético o un fragmento de cualquiera de dichos anticuerpos. Los fragmentos de dichos anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fv o scFv o derivados químicamente modificados de cualquiera de estos fragmentos. Los anticuerpos pueden prepararse empleando procedimientos que se describen, p. ej., en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por las técnicas descritas originalmente en Köhler 1975, *Nature* 256, 495, y Galfré 1981, *Meth. Enzymol.* 73, 3. Dichas técnicas comprenden la fusión de células de mieloma de ratón con células de bazo procedentes de mamíferos inmunizados. Los anticuerpos se pueden mejorar aún más mediante técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la resonancia de plasmones superficiales como se emplea en el sistema BIACORE® puede usarse para aumentar la eficiencia de los anticuerpos de fagos que se unen al epítipo, véase Schier 1996, *Human Antibodies Hybridomas* 7, 97; Malmberg 1995, *J. Immunol. Methods* 183, 7. Los anticuerpos, tal como se emplean en la presente memoria, también comprenden equivalentes funcionales de anticuerpos, es decir, agentes que son capaces de unirse específicamente a los epítopos o partes de los polipéptidos de neurotoxina deseados. En un aspecto, dichos equivalentes funcionales comprenden el receptor o proteínas de unión a los que se hace referencia en otra parte en esta memoria o uno de sus dominios que son capaces de mediar dicha unión específica.

Según el procedimiento de la presente invención, el "primer anticuerpo de captura" se une específicamente a epítopos comprendidos por la cadena ligera del polipéptido neurotoxina madura y comprendidos por el polipéptido neurotoxina parcialmente tratado y/o no tratado. La unión específica tal como se emplea en la presente memoria, en general, significa que el anticuerpo no reacciona en cruz en un grado significativo con otros epítopos en la cadena pesada o el enlazador del polipéptido neurotoxina a determinar o en otros polipéptidos. La unión específica tal como se menciona en la presente memoria puede analizarse por diversas técnicas bien conocidas incluidas, p. ej., experimentos de competición y transferencias Western. Un epítipo tal como se emplea según la invención se refiere al determinante antigénico que es reconocido por el anticuerpo.

En otro aspecto, los diferentes anticuerpos de captura pueden usarse para reemplazar el primer anticuerpo de captura. Para ello, se puede aplicar que al menos un anticuerpo de captura se une específicamente a epítopos de la cadena ligera del polipéptido neurotoxina no tratado, al menos otro anticuerpo de captura se une específicamente a epítopos de la cadena ligera del polipéptido neurotoxina parcialmente tratado y al menos otro anticuerpo de captura se une específicamente a los epítopos de la cadena ligera del polipéptido neurotoxina tratado. Se entenderá que estos tres tipos de anticuerpos se parecen funcionalmente al primer anticuerpo de captura para el procedimiento de la presente invención. Asimismo, un anticuerpo de captura que se une específicamente a epítopos de la cadena ligera del polipéptido neurotoxina parcialmente tratado y no tratado puede utilizarse en combinación con un anticuerpo de captura que se une a epítopos de la cadena ligera del polipéptido neurotoxina tratado.

Dicho primer anticuerpo de captura, en un aspecto, deberá inmovilizarse. Dicha inmovilización de un anticuerpo, en principio, se puede conseguir, en un aspecto, por unión reversible o irreversible, directa o indirecta (mediante moléculas enlazadoras) del anticuerpo a un soporte sólido. En un aspecto, el primer anticuerpo de captura se inmoviliza antes de llevar a cabo el procedimiento. En otro aspecto, el primer anticuerpo de captura se inmoviliza una vez que se ha formado el primer complejo de anticuerpo pero antes de poner en contacto el complejo con el anticuerpo de detección. Los materiales para soportes sólidos son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, matrices de polisacáridos disponibles en el mercado seleccionadas del grupo que consiste en: sefarosa, sefadex; agarosa, sefacel, microcelulosa y perlas de alginato, matrices polipeptídicas, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas de metal coloidal, vidrio, plástico y/o chips y superficies de silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracitas, pocillos y paredes de placas de reacción, tubos de plástico. En un aspecto de la invención, dicho soporte sólido está hecho de poliestireno gamma-irradiado.

La expresión "primer complejo de anticuerpo" se refiere a un complejo que comprende el primer anticuerpo de captura unido específicamente a los polipéptidos de neurotoxina tratados, parcialmente tratados o no tratados. Dicho complejo de anticuerpo se forma como resultado de poner en contacto el primer anticuerpo de captura con la solución que comprende dichos polipéptidos de neurotoxina tratados, parcialmente tratados y/o no tratados como se ha expuesto anteriormente.

Según el procedimiento de la invención, el "segundo anticuerpo de captura" se une específicamente a un epítipo que comprende el enlazador del polipéptido neurotoxina no tratado y/o parcialmente tratado o una de sus partes. En los casos en los que falta una secuencia de unión, se prevé que dicho segundo anticuerpo de captura se una específicamente a un epítipo que comprende el punto de escisión proteolítica no escindido o una de sus partes. En

un aspecto de la invención, el segundo anticuerpo de captura no reacciona de forma cruzada con el polipéptido neurotoxina tratado en un grado significativo. En un aspecto, dicho segundo anticuerpo de captura inmovilizado se une específicamente a un epítipo que consiste esencialmente en, comprender o estar comprendido por una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID n°: 1 a n°: 16, véase la Tabla 2 o 3 a continuación.

5 Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de los puntos de escisión de diferentes polipéptidos de neurotoxina y secuencias flanqueantes

SEQ. ID. n°:	Secuencia del epítipo incluidos puntos de escisión (resaltado)	Neurotoxina (cepa bacteriana)
1	KLLCVRGIITSK <b>TKSLDKGYNK</b> ALN .... DLClKV	BoNT/A (Hall/62A)
2	IQMCKSV <b>KAPG</b> ..... ICIDV	BoNT/B (Okra)
3	TKFCHKAIDGR <b>SL</b> .... <b>YNKTL</b> ..... DCRELLV	BoNT/C1 (C-6814)
4	TKVCLRLTK ..... <b>NSRD</b> ..... DSTClKV	BoNT/D
5	IRFCKNIVSV <b>KG</b> ..... <b>IRK</b> ..... SICIEI	BoNT/E (Beluga)
6	VKFCKSVIP <b>RKG</b> ..... <b>TKAP</b> ..... PRLCIRV	BoNT/F (NCTC10281)
7	I <b>AMCKP</b> VMYKNT ..... GKS ..... EQCIIV	BoNT / G
8	IGL <b>CKKI</b> IPPTNIRENLYN <b>RTAS</b> LDLGGELClKI	TeNT

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de las regiones del enlazador

SEQ. ID. n°:	Secuencia de los epítipos	Puntos de escisión	Neurotoxin /cepa bacteriana
9	TKSLDKGYNK	K438 / T439 K448 / A449	BoNT/A (Hall/62A)
10	CKSVKAPGIC	K441 / A442	BoNT/B (Okra)
11	SLYNK	R444 / S445 K449 / T450	BoNT/C1 (C-6814)
12	NSR	K442 / N443 R445 / D446	BoNT/D (CB16)
13	GIR	K419 / G420 R422 /K423	BoNT/ E (Beluga)
14	KGTK	R435 / K436 K439 / A440	BoNT/F (NCTC10281)
15	NGTK		BoNT/G
16	ENLYNR	R449 (alternativamente R455)	TeNT

Debido a la presencia del epítipo mencionado anteriormente, los polipéptidos de neurotoxina no tratados o parcialmente tratados pueden unirse específicamente por el segundo anticuerpo de captura, y, de este modo, formar un segundo complejo de anticuerpo. Dicho segundo anticuerpo de captura está, en un aspecto, inmovilizado como se explicó en detalle anteriormente.

- 5 Por consiguiente, la expresión "segundo complejo de anticuerpo" se refiere a un complejo que comprende el segundo anticuerpo de captura específicamente unido a un polipéptido neurotoxina parcialmente tratado o no tratado. Dicho segundo complejo de anticuerpo, sin embargo, no comprenderá el polipéptido neurotoxina tratado.

Según el procedimiento de la invención, el "anticuerpo de detección" se une específicamente al primer y/o segundo complejo de anticuerpo. Se describe que el anticuerpo de detección para el primer y el segundo complejo de anticuerpo es idéntico. Sin embargo, en otro aspecto, se pueden usar diferentes anticuerpos de detección para el primer y el segundo complejo de anticuerpo. En un aspecto, el anticuerpo de detección se une específicamente a epítopos en la cadena pesada del polipéptido neurotoxina tratado, parcialmente tratado y sin tratar. Debido a la presencia del mismo epítipo en ambos complejos, el primer complejo de anticuerpo o el segundo complejo de anticuerpo se puede unir específicamente y, por lo tanto, ser detectado por el anticuerpo de detección en dicho aspecto de la invención.

Como resultado de la unión específica del anticuerpo de detección, se forma un primer complejo de detección o un segundo complejo de detección, respectivamente.

Por lo tanto, la expresión "primer complejo de detección" se refiere a un complejo que comprende el primer complejo de anticuerpo y el anticuerpo de detección. Asimismo, la expresión "segundo complejo de detección" se refiere a un complejo que comprende el segundo complejo de anticuerpo y el anticuerpo de detección.

En un aspecto del procedimiento de la invención, dicho anticuerpo de detección comprendido por el primer o segundo complejo de detección está acoplado a un marcador detectable que permite la medición de la cantidad del anticuerpo de detección que está unido al complejo de detección. Midiendo dicha cantidad de anticuerpo de detección unido, se puede determinar la cantidad de primer o segundo complejo de anticuerpo ya que la cantidad de anticuerpo de detección unido en el complejo de detección se correlaciona con la cantidad de complejo de anticuerpo comprendido por el complejo de detección. El marcaje puede hacerse por procedimientos directos o indirectos. El marcaje directo implica la unión del marcador directamente (por enlace covalente o no) al primer anticuerpo de detección. El marcaje indirecto implica el enlace (covalente o no) de un agente que se une específicamente al anticuerpo de detección y que lleva un marcador detectable. Dicho agente puede ser, p. ej., un anticuerpo secundario (de orden superior) que se une específicamente al anticuerpo de detección. El anticuerpo secundario en tal caso se acoplará a un marcador detectable. Debe entenderse que pueden emplearse además otros anticuerpos de orden superior para la detección del complejo de detección. Los anticuerpos de orden superior a menudo se utilizan para aumentar la señal. Los anticuerpos de orden superior adecuados también pueden incluir el muy conocido sistema estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.), y el muy conocido Dako LSAB™2 y LSAB™+ (estreptavidina-biotina marcado), o Dako PAP (peroxidasa anti-peroxidasa). En otro aspecto, dicho marcador del primer anticuerpo de detección se selecciona del grupo que consiste en: colorantes fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes, marcadores radiactivos y enzimas capaces de generar una señal detectable. Los marcadores fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, Texas Red, fluoresceína y los colorantes Alexa (p. ej., Alexa 568). Los marcadores radiactivos típicos incluyen <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P y similares. Alternativamente, un marcador detectable acoplado a dicho primer anticuerpo de detección también puede ser una enzima que es capaz de generar una señal detectable, p. ej., mediante la conversión de un sustrato. En un aspecto, dicha enzima puede ser una peroxidasa (p. ej., peroxidasa de rábano picante) o fosfatasa alcalina.

La expresión "determinar la cantidad" tal como se emplea en la presente memoria se refiere a medir la cantidad absoluta, la cantidad relativa o la concentración de una manera cuantitativa o semicuantitativa. La medición se realizará en función de las propiedades químicas, físicas o biológicas del marcador detectable acoplado al primer anticuerpo de detección. Las medidas adecuadas para la detección son bien conocidas por los expertos en la técnica y dependen de la naturaleza del marcador detectable como se expuso anteriormente. Debe entenderse, sin embargo, que la cantidad de marcador detectable que se puede medir se correlaciona directamente con la cantidad de complejo de detección que se correlaciona de nuevo con la cantidad de complejo de anticuerpo y, por lo tanto, con la cantidad de la especie de neurotoxina a determinar, es decir con el total (neurotoxina tratada, no tratada y parcialmente tratada) o la neurotoxina no tratada y parcialmente tratada. Debe entenderse que la determinación de la cantidad de polipéptidos de neurotoxina, en un aspecto, también requiere la calibración del procedimiento aplicando soluciones patrón con cantidades predefinidas de polipéptidos de neurotoxina. Cómo llevar a cabo dicha calibración es bien conocido por los expertos en la técnica.

El término "calcular" como se emplea según el procedimiento de la presente invención se refiere a operaciones matemáticas que permiten determinar la cantidad de neurotoxina tratada en base a las cantidades de neurotoxina total (es decir, neurotoxina tratada, no tratada y parcialmente tratada) y la cantidad de neurotoxina parcialmente tratada y no tratada. En un aspecto del procedimiento de la presente invención, dicho cálculo incluye la sustracción de la cantidad de neurotoxina parcialmente tratada y no tratada a partir de la cantidad de neurotoxina total.

Convenientemente, el procedimiento de la presente invención permite una determinación fiable de la cantidad de neurotoxina tratada en un preparado dado. En consecuencia, la calidad de los preparados de neurotoxina puede aumentar ya que los preparados se pueden analizar en cuanto a cantidades constantes del polipéptido neurotoxina tratado deseado.

- 5 En principio, el procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo acoplado un primer anticuerpo de captura a un soporte sólido tal como un vial de reacción. Asimismo, el segundo anticuerpo de captura se acoplará a otro soporte sólido físicamente separado (p. ej., otro vial de reacción). Ambos anticuerpos de captura acoplados a los soportes sólidos se pondrán posteriormente en contacto con dichas porciones de la solución que comprende la neurotoxina tratada, no tratada y/o parcialmente tratada a determinar. Dicha solución podría ser, p. ej., un cultivo celular bacteriano purificado de *Clostridium* sp. Se entenderá que una primera porción se pondrá en contacto con el primer anticuerpo de captura en el primer soporte sólido y la segunda parte se pondrá en contacto con el segundo anticuerpo de captura en el segundo soporte sólido. Las porciones suelen ser de igual volumen y están normalizadas con respecto a sus contenidos, p. ej., su contenido de proteína total. La puesta en contacto se llevará a cabo durante un tiempo suficiente para permitir la unión específica del primer y segundo anticuerpos de captura a sus respectivos antígenos. Por ejemplo, el contacto puede realizarse a temperatura ambiente durante aprox. una hora. Posteriormente, se descartarán la primera y la segunda porción de la solución y los soportes sólidos (p. ej., viales de reacción) se lavarán una o dos veces con un tampón en condiciones que no afecten al primer y segundo complejos de anticuerpos que se han formado mientras tanto con los anticuerpos de captura en los soportes sólidos. Una vez se han llevado a cabo las etapas de lavado, el anticuerpo de detección se agregará a los soportes sólidos en condiciones que permitan la unión específica del anticuerpo de detección. El exceso de anticuerpos de detección deberá eliminarse mediante más etapas de lavado utilizando un tampón apropiado. Posteriormente, la cantidad del primer y el segundo complejo de detección se puede determinar mediante la determinación de la cantidad de anticuerpo de detección específicamente unido. Esto se conseguirá dependiendo de la naturaleza del marcador del anticuerpo de detección, p. ej., midiendo la densidad óptica o la intensidad de la fluorescencia. La cantidad medida para el marcador detectable se puede comparar con patrones de calibración para determinar la cantidad de una especie de neurotoxina, es decir, la neurotoxina total (tratada, no tratada y parcialmente tratada) o la neurotoxina no tratada y parcialmente tratada en el primer o segundo complejo de detección. Debe entenderse que el primer complejo de detección representa la cantidad de neurotoxina total mientras que el segundo complejo de detección representa solamente la cantidad de polipéptidos de neurotoxina parcialmente tratados y no tratados. Por consiguiente, la cantidad de polipéptido neurotoxina tratada se puede calcular en la configuración anteriormente mencionada restando la cantidad del polipéptido neurotoxina parcialmente tratada o sin tratar de la cantidad total del polipéptido neurotoxina.

Debe entenderse que las definiciones y explicaciones de los términos anteriores se aplican haciendo los cambios necesarios a todos los aspectos descritos en esta memoria descriptiva a continuación, excepto que se indique lo contrario.

La presente invención también se refiere a un procedimiento *in vitro* para la determinación de la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratado en una solución que comprende polipéptido neurotoxina clostridial tratado y polipéptido neurotoxina parcialmente tratado y/o no tratado, procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- a) poner en contacto una primera porción de dicha solución que comprende polipéptido neurotoxina clostridial tratado y polipéptido neurotoxina parcialmente tratado y/o no tratado, con un primer anticuerpo de captura que se une específicamente a la cadena pesada del polipéptido neurotoxina tratado, parcialmente tratado y sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho anticuerpo de captura a dicha cadena pesada de polipéptido neurotoxina tratado, parcialmente tratado y sin tratar, formando así un primer complejo de anticuerpo,
- b) poner en contacto el primer dicho complejo de anticuerpo con un anticuerpo de detección que se une específicamente a la cadena ligera de dicho polipéptido neurotoxina clostridial tratado, parcialmente tratado, y no tratado en el complejo de anticuerpo formado en la etapa a), por lo que se forma un primer complejo de detección,
- c) poner en contacto una segunda porción de dicha solución que comprende polipéptido neurotoxina clostridial tratado y polipéptido neurotoxina parcialmente tratado y/o sin tratar con un segundo anticuerpo de captura que se une específicamente al enlazador de dicho polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho anticuerpo a dicho polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar, en donde dicho segundo anticuerpo de captura se une específicamente a un epítipo peptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las SEQ. ID. n°: 1 a n°: 16, formando así un segundo complejo de anticuerpos,
- d) poner en contacto dicho segundo complejo de anticuerpo con un anticuerpo de detección que es diferente del anticuerpo de detección en la etapa b) y que se une específicamente al complejo de anticuerpo formado en la etapa c), con lo cual se forma un segundo complejo de detección,
- e) determinar la cantidad del primer complejo de detección formado en la etapa b) y la cantidad del segundo complejo de detección formado en la etapa d), y

f) calcular la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratado, basándose en las cantidades del primer y segundo complejo de detección determinado en la etapa e).

En otro aspecto de los procedimientos de la invención, dichos procedimientos comprenden además determinar la actividad de unión del polipéptido neurotoxina.

- 5 La expresión "actividad de unión" como se emplea según los procedimientos de la invención se refiere a la capacidad del polipéptido neurotoxina tratado para una proteína receptora de superficie que está presente, p. ej., en terminaciones nerviosas colinérgicas periféricas. Las proteínas receptoras incluyen en el aspecto SV2 para BoNT/A, sinaptotagminas I y II para BoNT/B y BoNT/G, y un correceptor de gangliósido (GT<sub>1B</sub>). En un aspecto de los procedimientos de la invención, dicha actividad de unión se puede determinar *ex vivo* utilizando un sustrato modelo
- 10 que sustituye al receptor de proteína de superficie simulando su dominio de unión. Dicho sustrato modelo es, en un aspecto, un péptido marcado derivado de las proteínas receptoras mencionadas anteriormente. En otro aspecto, los marcadores adecuados incluyen los mencionados en otra parte en esta memoria, y, en particular, biotina.

En otro aspecto el procedimiento para determinar la actividad de unión de un polipéptido neurotoxina comprende las etapas siguientes:

- 15 a) poner en contacto una porción de polipéptido neurotoxina que contiene solución con un péptido marcado que simula el dominio de unión de dicha proteína de receptor de superficie, con lo que se forma un complejo, y
- b) determinar dicho complejo formado en la etapa (a) basándose en el marcador, por lo que la presencia o ausencia del complejo o su cantidad es indicativa de la actividad de unión del polipéptido neurotoxina en dicha solución.

El complejo puede determinarse basándose en la naturaleza del marcador que se ha utilizado para marcar el péptido. En un aspecto, p. ej., el péptido biotilado comprendido por un complejo se puede determinar mediante un conjugado de estreptavidina capaz de generar una señal detectable. La presencia, ausencia o intensidad será

20 indicativa de la actividad de unión de los polipéptidos neurotoxina en la solución o de su concentración.

En otro aspecto de los procedimientos de la invención, los procedimientos comprenden además determinar la actividad proteolítica del polipéptido neurotoxina.

- 25 La expresión "actividad proteolítica" como se emplea según los procedimientos de la invención se refiere a la capacidad de la neurotoxina tratada para escindir por proteólisis las proteínas del receptor de unión sensible a N-etilmaleimida (SNARE) implicadas en la fusión de membrana de vesícula sináptica. En un aspecto, dicha escisión es dependiente de cinc (II). Dicha actividad proteolítica puede determinarse usando un sustrato modelo que sustituye a una proteína SNARE de origen natural. Además, después de la escisión, se liberará de dicho sustrato modelo un
- 30 marcador detectable, tal como un tinte. En un aspecto, el sustrato modelo es un compuesto de fórmula general X-para-nitroanilida, en donde X es arginina o un péptido que tiene la secuencia arginina-Y, en donde Y representa uno o más aminoácidos, y en otro aspecto, el compuesto es arginina-para-nitroanilida.

En otro aspecto, el procedimiento para determinar la actividad proteolítica de una neurotoxina comprende las etapas siguientes:

- 35 a) poner en contacto una porción de una solución que contiene el polipéptido neurotoxina con un compuesto de fórmula general: X-para-nitroanilida, en donde X es arginina o un péptido que tiene la secuencia arginina-Y, en donde Y representa uno o más aminoácidos, y
- b) determinar la actividad proteolítica del polipéptido neurotoxina en dicha solución en base a la cantidad de para-nitroanilina liberada de la etapa b) que se correlaciona con la cantidad de polipéptido neurotoxina.

40 En un aspecto, Y representa un resto peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las SEQ ID n°: 25 o n°: 26.

El polipéptido neurotoxina tratado comprendido por dicha parte de la solución puede escindirse y, por lo tanto, liberar para-nitroanilina del péptido restante. La para-nitroanilina es un colorante bien conocido en la técnica. La determinación de la actividad proteolítica del polipéptido neurotoxina en dicha solución se basa en la cantidad de

45 para-nitroanilina liberada que se correlaciona con la cantidad de polipéptido neurotoxina.

Se describe un dispositivo para determinar la cantidad de polipéptido neurotoxina tratado en una solución que comprende:

- a) una configuración de un primer anticuerpo de captura, un segundo anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección, donde dicha configuración permite llevar a cabo las etapas a) a e) de los procedimientos mencionados
- 50 anteriormente; y
- b) medios para calcular la cantidad de polipéptido neurotoxina maduro en base a las cantidades del primer y segundo complejo de detección determinado por la configuración según a).

El término "dispositivo", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a un sistema que comprende al menos la configuración mencionada anteriormente y medios operativamente unidos entre sí para permitir la determinación. En un aspecto, la configuración puede ser un soporte sólido con anticuerpos de captura inmovilizados como se ha mencionado anteriormente que pueden estar presentes en viales físicamente separados para permitir un contacto separado con la primera y segunda porción de la solución. Además, el dispositivo puede comprender, en un aspecto, una unidad para la determinación de la cantidad de los complejos de detección. Dependiendo del tipo de anticuerpo de detección a usar, dicha unidad comprenderá un detector para las señales generadas por el anticuerpo de detección. Además, la unidad también puede comprender, en un aspecto, medios para la calibración, p. ej., un algoritmo informático, para comparar las señales medidas con los patrones de calibración con objeto de determinar las cantidades de los polipéptidos de neurotoxina presentes en una solución o parte de la misma. El dispositivo también comprenderá medios para calcular la cantidad de polipéptido neurotoxina maduro basándose en las cantidades del primer y segundo complejo de detección, p. ej., un algoritmo informático para llevar a cabo el cálculo.

Además, la invención se refiere a un equipo para llevar a cabo para la determinación de la cantidad de un polipéptido neurotoxina clostridial tratado en una solución que comprende polipéptido neurotoxina clostridial tratado y polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar, comprendiendo el equipo:

a) un primer anticuerpo de captura que se une específicamente a la cadena ligera del polipéptido neurotoxina clostridial tratado, parcialmente tratado y sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho primer anticuerpo de captura a dicho polipéptido neurotoxina clostridial tratado, parcialmente tratado y sin tratar, formando de este modo un primer complejo de anticuerpo;

b) un anticuerpo de detección que se une específicamente a la cadena pesada de dicho polipéptido neurotoxina clostridial tratado, sin tratar y parcialmente tratado en el primer complejo de anticuerpo, con lo que se forma un primer complejo de detección;

c) un segundo anticuerpo de captura que se une específicamente al enlazador de dicho polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho segundo anticuerpo de captura a dicho polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar, en donde dicho segundo anticuerpo de captura se une específicamente a un epítipo peptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las SEQ. ID. n°: 1 a n°: 16, formando de este modo un segundo complejo de anticuerpos;

d) un anticuerpo de detección que es diferente del anticuerpo de detección en la etapa b) y que se une específicamente al complejo de anticuerpo formado en la etapa c), con lo cual se forma un segundo complejo de detección;

e) medios para calcular la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratado, en base a las cantidades del primer y segundo complejo de detección; y

f) instrucciones para llevar a cabo la formación de un primer complejo de anticuerpo, la formación de un segundo complejo de anticuerpo, la determinación de las cantidades del primer complejo de anticuerpo y del segundo complejo de anticuerpo y el cálculo de la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratado.

Además, la invención se refiere a un equipo para la determinación de la cantidad de un polipéptido neurotoxina clostridial tratado en una solución que comprende polipéptido neurotoxina clostridial tratado y polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar, comprendiendo el equipo:

a) un primer anticuerpo de captura que se une específicamente a las cadenas pesadas del polipéptido neurotoxina clostridial tratado, parcialmente tratado y sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho primer anticuerpo de captura a dicho polipéptido neurotoxina clostridial tratado, parcialmente tratado y sin tratar, formando de este modo un primer complejo de anticuerpo;

b) un anticuerpo de detección que se une específicamente a las cadenas ligeras de dicho polipéptido neurotoxina clostridial tratado, sin tratar y parcialmente tratado en el primer complejo de anticuerpo, con lo que se forma un primer complejo de detección;

c) un segundo anticuerpo de captura que se une específicamente al enlazador de dicho polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho segundo anticuerpo de captura a dicho polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado o sin tratar, en donde dicho segundo anticuerpo de captura se une específicamente a un epítipo peptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las SEQ. ID. n°: 1 a n°: 16, formando de este modo un segundo complejo de anticuerpos;

d) un anticuerpo de detección que es diferente del anticuerpo de detección en la etapa b) y que se une específicamente al complejo de anticuerpo formado en la etapa c), con lo cual se forma un segundo complejo de detección;

e) medios para calcular la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratado, en base a las cantidades del primer y segundo complejo de detección; y

f) instrucciones para llevar a cabo la formación de un primer complejo de anticuerpo, la formación de un segundo complejo de anticuerpo, la determinación de las cantidades del primer complejo de anticuerpo y del segundo complejo de anticuerpo y el cálculo de la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratado.

El término "equipo" tal tal como se emplea en la presente memoria se refiere a una colección de los medios o reactivos de la presente invención mencionados anteriormente que pueden o no pueden envasarse juntos. Los componentes del equipo pueden estar compuestos por viales separados (es decir, como un equipo de partes separadas). Además, debe entenderse que el equipo de la presente invención se debe usar para poner en práctica los procedimientos mencionados anteriormente en la presente memoria. En un aspecto, se prevé que todos los componentes se proporcionen de una manera lista para su uso para poner en práctica los procedimientos mencionados anteriormente. En otro aspecto, el equipo contiene instrucciones para llevar a cabo dichos procedimientos. Las instrucciones pueden ser proporcionadas por un manual de usuario en papel o en formato electrónico. Por ejemplo, el manual puede comprender instrucciones para interpretar los resultados obtenidos cuando se llevan a cabo los procedimientos mencionados anteriormente utilizando el equipo de la presente invención.

**Figuras:**

Figura 1: Esquema de la unión de al menos uno (o más) anticuerpos de detección.

Figura 2: Esquema de la unión específica del segundo anticuerpo de captura al polipéptido neurotoxina precursor parcialmente tratado o sin tratar y la posterior unión de al menos uno (o más) anticuerpos de detección.

Figura 3: Esquema de la determinación de la actividad de unión del polipéptido neurotoxina.

Figura 4: Esquema de la determinación de la actividad proteolítica del polipéptido neurotoxina.

**Listado de secuencias**

<110> Merz Pharma GmbH & Co. KgaA

<120> Medios y métodos para la determinación de la cantidad de polipéptido neurotoxina y de sus actividades catalíticas y proteolíticas

<130> MP66084EP

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.5

35

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

40

<400> 1

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

Asp Lys Gly Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val  
20 25 30

45

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

50

<400> 2

Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys Ile Asp Val  
1 5 10 15

<210> 3

ES 2 647 243 T3

<211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium botulinum

5 <400> 3

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

Thr Leu Asp Cys Arg Glu Leu Leu Val  
 20 25

<210> 4

10 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium botulinum

<400> 4

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

Cys Ile Lys Val  
 20

20 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium botulinum

25 <400> 5

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

Ile Cys Ile Glu Ile  
 20

<210> 6

30 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium botulinum

<400> 6

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

Pro Arg Leu Cys Ile Arg Val  
 20

<210> 7

40 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium botulinum

<400> 7

Ile Ala Met Cys Lys Pro Val Met Tyr Lys Asn Thr Gly Lys Ser Glu  
 1 5 10 15

Gln Cys Ile Ile Val  
 20

45

ES 2 647 243 T3

<210> 8  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> Clostridium tetani

5

<400> 8

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

Leu Tyr Asn Arg Thr Ala Ser Leu Thr Asp Leu Gly Gly Glu Leu Cys  
20 25 30

Ile Lys Ile  
35

10

<210> 9  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Clostridium botulinum

15

<400> 9

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

20

<210> 10  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Clostridium botulinum

25

<400> 10

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

30

<210> 11  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Clostridium botulinum

35

<400> 11

Ser Leu Tyr Asn Lys  
1 5

40

<210> 12  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Clostridium botulinum

<400> 12

45

Asn Ser Arg  
1

50

<210> 13  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Clostridium botulinum

<400> 13

55

Gly Ile Arg  
1



ES 2 647 243 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 243 T3

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

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

ES 2 647 243 T3

			645						650						655
Ile	Phe	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Ile	Pro	Glu	Ile	Ala
			660					665					670		
Ile	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Ala	Asn	Lys
		675					680					685			
Val	Leu	Thr	Val	Gln	Thr	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu	Ser	Lys	Arg	Asn	Glu
	690					695					700				
Lys	Trp	Asp	Glu	Val	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Val	Thr	Asn	Trp	Leu	Ala	Lys
705					710					715					720
Val	Asn	Thr	Gln	Ile	Asp	Leu	Ile	Arg	Lys	Lys	Met	Lys	Glu	Ala	Leu
				725					730						735
Glu	Asn	Gln	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Ile	Ile	Asn	Tyr	Gln	Tyr	Asn
			740					745					750		
Gln	Tyr	Thr	Glu	Glu	Glu	Lys	Asn	Asn	Ile	Asn	Phe	Asn	Ile	Asp	Asp
		755					760					765			
Leu	Ser	Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Ile	Asn	Lys	Ala	Met	Ile	Asn	Ile
	770					775					780				
Asn	Lys	Phe	Leu	Asn	Gln	Cys	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu	Met	Asn	Ser	Met
785					790					795					800
Ile	Pro	Tyr	Gly	Val	Lys	Arg	Leu	Glu	Asp	Phe	Asp	Ala	Ser	Leu	Lys
				805					810						815
Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Asn	Arg	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly
		820						825					830		
Gln	Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Asp	Lys	Val	Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Thr	Asp
		835					840					845			
Ile	Pro	Phe	Gln	Leu	Ser	Lys	Tyr	Val	Asp	Asn	Gln	Arg	Leu	Leu	Ser
	850					855					860				
Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr	Ile	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Thr	Ser	Ile	Leu	Asn
865					870					875					880
Leu	Arg	Tyr	Glu	Ser	Asn	His	Leu	Ile	Asp	Leu	Ser	Arg	Tyr	Ala	Ser
				885					890						895
Lys	Ile	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Val	Asn	Phe	Asp	Pro	Ile	Asp	Lys	Asn
			900					905					910		

ES 2 647 243 T3

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

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

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

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

ES 2 647 243 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Pro Leu  
 1295

<210> 18

<211> 1291

5 <212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 18

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

Asn Asn Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Phe Ala Arg Gly Thr Gly Arg  
 20 25 30

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

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

10 Ile Phe Asn Arg Asp Val Cys Glu Tyr Tyr Asp Pro Asp Tyr Leu Asn



ES 2 647 243 T3

Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu  
 340 345 350

Met Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys  
 355 360 365

Thr Arg Ala Ser Tyr Phe Ser Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys  
 370 375 380

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

Ser Asp Lys Asp Met Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile  
 405 410 415

Asn Lys Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr  
 420 425 430

Lys Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys Ile Asp  
 435 440 445

Val Asp Asn Glu Asp Leu Phe Phe Ile Ala Asp Lys Asn Ser Phe Ser  
 450 455 460

Asp Asp Leu Ser Lys Asn Glu Arg Ile Glu Tyr Asn Thr Gln Ser Asn  
 465 470 475 480

Tyr Ile Glu Asn Asp Phe Pro Ile Asn Glu Leu Ile Leu Asp Thr Asp  
 485 490 495

Leu Ile Ser Lys Ile Glu Leu Pro Ser Glu Asn Thr Glu Ser Leu Thr  
 500 505 510

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

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

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

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

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

ES 2 647 243 T3

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

ES 2 647 243 T3

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

ES 2 647 243 T3

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

<210> 19

<211> 1280

5 <212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 19

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

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

ES 2 647 243 T3

Pro Glu Lys Ala Phe Arg Ile Ile Gly Asn Ile Trp Val Ile Pro Asp  
 35 40 45  
 Arg Phe Ser Arg Asp Ser Asn Pro Asn Leu Asn Lys Pro Pro Arg Val  
 50 55 60  
 Thr Ser Pro Lys Ser Gly Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Ser Thr Asp  
 65 70 75 80  
 Ser Glu Lys Asp Thr Phe Leu Lys Glu Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg  
 85 90 95  
 Ile Asn Ser Arg Glu Ile Gly Glu Glu Leu Ile Tyr Arg Leu Ala Thr  
 100 105 110  
 Asp Ile Pro Phe Pro Gly Asn Asn Asn Thr Pro Ile Asn Thr Phe Asp  
 115 120 125  
 Phe Asp Val Asp Phe Asn Ser Val Asp Val Lys Thr Arg Gln Gly Asn  
 130 135 140  
 Asn Trp Val Lys Thr Gly Ser Ile Asn Pro Ser Val Ile Ile Thr Gly  
 145 150 155 160  
 Pro Arg Glu Asn Ile Ile Asp Pro Glu Thr Ser Thr Phe Lys Leu Thr  
 165 170 175  
 Asn Asn Thr Phe Ala Ala Gln Glu Gly Phe Gly Ala Leu Ser Ile Ile  
 180 185 190  
 Ser Ile Ser Pro Arg Phe Met Leu Thr Tyr Ser Asn Ala Thr Asn Asn  
 195 200 205  
 Val Gly Glu Gly Arg Phe Ser Lys Ser Glu Phe Cys Met Asp Pro Ile  
 210 215 220  
 Leu Ile Leu Met His Glu Leu Asn His Ala Met His Asn Leu Tyr Gly  
 225 230 235 240  
 Ile Ala Ile Pro Asn Asp Gln Arg Ile Ser Ser Val Thr Ser Asn Ile  
 245 250 255  
 Phe Tyr Ser Gln Tyr Lys Val Lys Leu Glu Tyr Ala Glu Ile Tyr Ala  
 260 265 270  
 Phe Gly Gly Pro Thr Ile Asp Leu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Lys Tyr  
 275 280 285

ES 2 647 243 T3

Phe Glu Glu Lys Ala Leu Asp Tyr Tyr Arg Ser Ile Ala Lys Arg Leu  
 290 295 300

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

Glu Tyr Lys Gln Lys Leu Ile Arg Lys Tyr Arg Phe Val Val Glu Ser  
 325 330 335

Ser Gly Glu Val Ala Val Asp Arg Asn Lys Phe Ala Glu Leu Tyr Lys  
 340 345 350

Glu Leu Thr Gln Ile Phe Thr Glu Phe Asn Tyr Ala Lys Ile Tyr Asn  
 355 360 365

Val Gln Asn Arg Lys Ile Tyr Leu Ser Asn Val Tyr Thr Pro Val Thr  
 370 375 380

Ala Asn Ile Leu Asp Asp Asn Val Tyr Asp Ile Gln Asn Gly Phe Asn  
 385 390 395 400

Ile Pro Lys Ser Asn Leu Asn Val Leu Phe Met Gly Gln Asn Leu Ser  
 405 410 415

Arg Asn Pro Ala Leu Arg Lys Val Asn Pro Glu Asn Met Leu Tyr Leu  
 420 425 430

Phe Thr Lys Phe Cys His Lys Ala Ile Asp Gly Arg Ser Leu Tyr Asn  
 435 440 445

Lys Thr Leu Asp Cys Arg Glu Leu Leu Val Lys Asn Thr Asp Leu Pro  
 450 455 460

Phe Ile Gly Asp Ile Ser Asp Ile Lys Thr Asp Ile Phe Leu Ser Lys  
 465 470 475 480

Asp Ile Asn Glu Glu Thr Glu Val Ile Asp Tyr Pro Asp Asn Val Ser  
 485 490 495

Val Asp Gln Val Ile Leu Ser Lys Asn Thr Ser Glu His Gly Gln Leu  
 500 505 510

Asp Leu Leu Tyr Pro Ile Ile Glu Gly Glu Ser Gln Val Leu Pro Gly  
 515 520 525

Glu Asn Gln Val Phe Tyr Asp Asn Arg Thr Gln Asn Val Asp Tyr Leu  
 530 535 540

Asn Ser Tyr Tyr Tyr Leu Glu Ser Gln Lys Leu Ser Asp Asn Val Glu



ES 2 647 243 T3

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

Lys Ala Lys Val Asn Glu Ser Phe Glu Asn Thr Ile Pro Phe Asn Ile  
 835 840 845

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

Phe Asn Ser Ile Asn Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Lys Lys  
 865 870 875 880

Asn Ala Leu Val Asp Thr Ser Gly Tyr Asn Ala Glu Val Arg Leu Glu  
 885 890 895

Gly Asp Val Gln Val Asn Thr Ile Tyr Thr Asn Asp Phe Lys Leu Ser  
 900 905 910

Ser Ser Gly Asp Lys Ile Ile Val Asn Leu Asn Asn Ile Leu Tyr  
 915 920 925

Ser Ala Ile Tyr Glu Asn Ser Ser Val Ser Phe Trp Ile Lys Ile Ser  
 930 935 940

Lys Asp Leu Thr Asn Ser His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Ser Ile  
 945 950 955 960

Lys Gln Asn Ser Gly Trp Lys Leu Cys Ile Arg Asn Gly Asn Ile Glu  
 965 970 975

Trp Ile Leu Gln Asp Ile Asn Arg Lys Tyr Lys Ser Leu Ile Phe Asp  
 980 985 990

Tyr Ser Glu Ser Leu Ser His Thr Gly Tyr Thr Asn Lys Trp Phe Phe  
 995 1000 1005

Val Thr Ile Thr Asn Asn Ile Met Gly Tyr Met Lys Leu Tyr Ile  
 1010 1015 1020

Asn Gly Glu Leu Lys Gln Ser Glu Arg Ile Glu Asp Leu Asn Glu  
 1025 1030 1035

Val Lys Leu Asp Lys Thr Ile Val Phe Gly Ile Asp Glu Asn Ile  
 1040 1045 1050

Asp Glu Asn Gln Met Leu Trp Ile Arg Asp Phe Asn Ile Phe Ser  
 1055 1060 1065

ES 2 647 243 T3

Lys Glu Leu Ser Asn Glu Asp Ile Asn Ile Val Tyr Glu Gly Gln  
1070 1075 1080

Ile Leu Arg Asn Val Ile Lys Asp Tyr Trp Gly Asn Pro Leu Lys  
1085 1090 1095

Phe Asp Thr Glu Tyr Tyr Ile Ile Asn Asp Asn Tyr Ile Asp Arg  
1100 1105 1110

Tyr Ile Ala Pro Lys Ser Asn Ile Leu Val Leu Val Gln Tyr Pro  
1115 1120 1125

Asp Arg Ser Lys Leu Tyr Thr Gly Asn Pro Ile Thr Ile Lys Ser  
1130 1135 1140

Val Ser Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Arg Ile Leu Asn Gly Asp Asn  
1145 1150 1155

Ile Met Phe His Met Leu Tyr Asn Ser Gly Lys Tyr Met Ile Ile  
1160 1165 1170

Arg Asp Thr Asp Thr Ile Tyr Ala Ile Glu Gly Arg Glu Cys Ser  
1175 1180 1185

Lys Asn Cys Val Tyr Ala Leu Lys Leu Gln Ser Asn Leu Gly Asn  
1190 1195 1200

Tyr Gly Ile Gly Ile Phe Ser Ile Lys Asn Ile Val Ser Gln Asn  
1205 1210 1215

Lys Tyr Cys Ser Gln Ile Phe Ser Ser Phe Met Lys Asn Thr Met  
1220 1225 1230

Leu Leu Ala Asp Ile Tyr Lys Pro Trp Arg Phe Ser Phe Glu Asn  
1235 1240 1245

Ala Tyr Thr Pro Val Ala Val Thr Asn Tyr Glu Thr Lys Leu Leu  
1250 1255 1260

Ser Thr Ser Ser Phe Trp Lys Phe Ile Ser Arg Asp Pro Gly Trp  
1265 1270 1275

Val Glu  
1280

<210> 20

<211> 1285

5 <212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 20

ES 2 647 243 T3

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

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

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

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

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

Glu Gln Lys Asp Thr Phe Leu Lys Gly Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg  
 85 90 95

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

Gly Ser Pro Phe Met Gly Asp Ser Ser Thr Pro Glu Asp Thr Phe Asp  
 115 120 125

Phe Thr Arg His Thr Thr Asn Ile Ala Val Glu Lys Phe Glu Asn Gly  
 130 135 140

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

Pro Leu Pro Asn Ile Leu Asp Tyr Thr Ala Ser Leu Thr Leu Gln Gly  
 165 170 175

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

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

Gln Ser Ser Ala Val Leu Gly Lys Ser Ile Phe Cys Met Asp Pro Val  
 210 215 220

Ile Ala Leu Met His Glu Leu Thr His Ser Leu His Gln Leu Tyr Gly  
 225 230 235 240

Ile Asn Ile Pro Ser Asp Lys Arg Ile Arg Pro Gln Val Ser Glu Gly  
 245 250 255

ES 2 647 243 T3

Phe Phe Ser Gln Asp Gly Pro Asn Val Gln Phe Glu Glu Leu Tyr Thr  
 260 265 270

Phe Gly Gly Ser Asp Val Glu Ile Ile Pro Gln Ile Glu Arg Leu Gln  
 275 280 285

Leu Arg Glu Lys Ala Leu Gly His Tyr Lys Asp Ile Ala Lys Arg Leu  
 290 295 300

Asn Asn Ile Asn Lys Thr Ile Pro Ser Ser Trp Ser Ser Asn Ile Asp  
 305 310 315 320

Lys Tyr Lys Lys Ile Phe Ser Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Lys Asp Asn  
 325 330 335

Thr Gly Asn Phe Val Val Asn Ile Asp Lys Phe Asn Ser Leu Tyr Ser  
 340 345 350

Asp Leu Thr Asn Val Met Ser Glu Val Val Tyr Ser Ser Gln Tyr Asn  
 355 360 365

Val Lys Asn Arg Thr His Tyr Phe Ser Lys His Tyr Leu Pro Val Phe  
 370 375 380

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

Leu Thr Thr Lys Gly Phe Asn Ile Glu Asn Ser Gly Gln Asn Ile Glu  
 405 410 415

Arg Asn Pro Ala Leu Gln Lys Leu Ser Ser Glu Ser Val Val Asp Leu  
 420 425 430

Phe Thr Lys Val Cys Leu Arg Leu Thr Arg Asn Ser Arg Asp Asp Ser  
 435 440 445

Thr Cys Ile Gln Val Lys Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Val Ala Asp Lys  
 450 455 460

Asp Ser Ile Ser Gln Glu Ile Phe Glu Ser Gln Ile Ile Thr Asp Glu  
 465 470 475 480

Thr Asn Val Glu Asn Tyr Ser Asp Asn Phe Ser Leu Asp Glu Ser Ile  
 485 490 495

Leu Asp Ala Lys Val Pro Thr Asn Pro Glu Ala Val Asp Pro Leu Leu  
 500 505 510

ES 2 647 243 T3

Pro Asn Val Asn Met Glu Pro Leu Asn Val Pro Gly Glu Glu Glu Val  
 515 520 525

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

Tyr Leu Glu Ala Gln Lys Leu Ser Asn Asn Val Glu Asn Ile Thr Leu  
 545 550 555 560

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

Phe Leu Pro Ser Leu Ala Glu Lys Val Asn Lys Gly Val Gln Ala Gly  
 580 585 590

Leu Phe Leu Asn Trp Ala Asn Glu Val Val Glu Asp Phe Thr Thr Asn  
 595 600 605

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 243 T3

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

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

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

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

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

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

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

Asp Thr Ser Gly Tyr Asn Ala Glu Val Arg Val Glu Gly Asn Val Gln  
885 890 895

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

Asp Arg Gly Lys Val Ile Val Thr Gln Asn Glu Asn Ile Val Tyr Asn  
915 920 925

Ala Met Tyr Glu Ser Phe Ser Ile Ser Phe Trp Ile Arg Ile Asn Lys  
930 935 940

Trp Val Ser Asn Leu Pro Gly Tyr Thr Ile Ile Asp Ser Val Lys Asn  
945 950 955 960

Asn Ser Gly Trp Ser Ile Gly Ile Ile Ser Asn Phe Leu Val Phe Thr  
965 970 975

Leu Lys Gln Asn Glu Asn Ser Glu Gln Asp Ile Asn Phe Ser Tyr Asp  
980 985 990

Ile Ser Lys Asn Ala Ala Gly Tyr Asn Lys Trp Phe Phe Val Thr Ile  
995 1000 1005

Thr Thr Asn Met Met Gly Asn Met Met Ile Tyr Ile Asn Gly Lys  
1010 1015 1020

Leu Ile Asp Thr Ile Lys Val Lys Glu Leu Thr Gly Ile Asn Phe

ES 2 647 243 T3

1025	1030	1035
Ser Lys Thr Ile Thr Phe Gln Met Asn Lys Ile Pro Asn Thr Gly 1040	1045	1050
Leu Ile Thr Ser Asp Ser Asp Asn Ile Asn Met Trp Ile Arg Asp 1055	1060	1065
Phe Tyr Ile Phe Ala Lys Glu Leu Asp Asp Lys Asp Ile Asn Ile 1070	1075	1080
Leu Phe Asn Ser Leu Gln Tyr Thr Asn Val Val Lys Asp Tyr Trp 1085	1090	1095
Gly Asn Asp Leu Arg Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr Met Ile Asn Val 1100	1105	1110
Asn Tyr Met Asn Arg Tyr Met Ser Lys Lys Gly Asn Gly Ile Val 1115	1120	1125
Phe Asn Thr Arg Lys Asn Asn Asn Asp Phe Asn Glu Gly Tyr Lys 1130	1135	1140
Ile Ile Ile Lys Arg Ile Arg Gly Asn Thr Asn Asp Thr Arg Val 1145	1150	1155
Arg Gly Glu Asn Val Leu Tyr Phe Asn Thr Thr Ile Asp Asn Lys 1160	1165	1170
Gln Tyr Ser Leu Gly Met Tyr Lys Pro Ser Arg Asn Leu Gly Thr 1175	1180	1185
Asp Leu Val Pro Leu Gly Ala Leu Asp Gln Pro Met Asp Glu Ile 1190	1195	1200
Arg Lys Tyr Gly Ser Phe Ile Ile Gln Pro Cys Asn Thr Phe Asp 1205	1210	1215
Tyr Tyr Ala Ser Gln Leu Phe Leu Ser Ser Asn Ala Thr Thr Asn 1220	1225	1230
Arg Leu Gly Ile Leu Ser Ile Gly Ser Tyr Ser Phe Lys Leu Gly 1235	1240	1245
Asp Asp Tyr Trp Phe Asn His Glu Tyr Leu Ile Pro Val Ile Lys 1250	1255	1260
Ile Glu His Tyr Ala Ser Leu Leu Glu Ser Thr Ser Thr His Trp 1265	1270	1275
Val Phe Val Pro Ala Ser Glu 1280	1285	

5 <210> 21  
 <211> 1251  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium botulinum

10 <400> 21

ES 2 647 243 T3

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

Thr Ile Leu Tyr Ile Lys Pro Gly Gly Cys Gln Glu Phe Tyr Lys Ser  
 20 25 30

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

Gly Thr Thr Pro Gln Asp Phe His Pro Pro Thr Ser Leu Lys Asn Gly  
 50 55 60

Asp Ser Ser Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Gln Ser Asp Glu Glu Lys  
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Leu Lys Ile Val Thr Lys Ile Phe Asn Arg Ile Asn Asn  
 85 90 95

Asn Leu Ser Gly Gly Ile Leu Leu Glu Glu Leu Ser Lys Ala Asn Pro  
 100 105 110

Tyr Leu Gly Asn Asp Asn Thr Pro Asp Asn Gln Phe His Ile Gly Asp  
 115 120 125

Ala Ser Ala Val Glu Ile Lys Phe Ser Asn Gly Ser Gln Asp Ile Leu  
 130 135 140

Leu Pro Asn Val Ile Ile Met Gly Ala Glu Pro Asp Leu Phe Glu Thr  
 145 150 155 160

Asn Ser Ser Asn Ile Ser Leu Arg Asn Asn Tyr Met Pro Ser Asn His  
 165 170 175

Arg Phe Gly Ser Ile Ala Ile Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Ser Phe  
 180 185 190

Arg Phe Asn Asp Asn Cys Met Asn Glu Phe Ile Gln Asp Pro Ala Leu  
 195 200 205

ES 2 647 243 T3

Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Ser Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala  
 210 215 220

Lys Gly Ile Thr Thr Lys Tyr Thr Ile Thr Gln Lys Gln Asn Pro Leu  
 225 230 235 240

Ile Thr Asn Ile Arg Gly Thr Asn Ile Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly  
 245 250 255

Gly Thr Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Gln Ser Asn Asp Ile Tyr  
 260 265 270

Thr Asn Leu Leu Ala Asp Tyr Lys Lys Ile Ala Ser Lys Leu Ser Lys  
 275 280 285

Val Gln Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu  
 290 295 300

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

Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu  
 325 330 335

Phe Asp Leu Arg Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile  
 340 345 350

Gly Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile  
 355 360 365

Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe  
 370 375 380

Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr  
 385 390 395 400

Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val  
 405 410 415

Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys Ile Glu Ile Asn Asn Gly  
 420 425 430

Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Asn Ser Tyr Asn Asp Asp Asn Ile  
 435 440 445

Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Val Thr Ser Asn Asn Asn Tyr  
 450 455 460

Glu Asn Asp Leu Asp Gln Val Ile Leu Asn Phe Asn Ser Glu Ser Ala



ES 2 647 243 T3

Lys Tyr Asp Ile Lys Gln Ile Glu Asn Glu Leu Asn Gln Lys Val Ser  
 740 745 750

Ile Ala Met Asn Asn Ile Asp Arg Phe Leu Thr Glu Ser Ser Ile Ser  
 755 760 765

Tyr Leu Met Lys Ile Ile Asn Glu Val Lys Ile Asn Lys Leu Arg Glu  
 770 775 780

Tyr Asp Glu Asn Val Lys Thr Tyr Leu Leu Asn Tyr Ile Ile Gln His  
 785 790 795 800

Gly Ser Ile Leu Gly Glu Ser Gln Gln Glu Leu Asn Ser Met Val Thr  
 805 810 815

Asp Thr Leu Asn Asn Ser Ile Pro Phe Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Asp  
 820 825 830

Asp Lys Ile Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Lys Phe Phe Lys Arg Ile Lys  
 835 840 845

Ser Ser Ser Val Leu Asn Met Arg Tyr Lys Asn Asp Lys Tyr Val Asp  
 850 855 860

Thr Ser Gly Tyr Asp Ser Asn Ile Asn Ile Asn Gly Asp Val Tyr Lys  
 865 870 875 880

Tyr Pro Thr Asn Lys Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Asp Lys Leu Ser  
 885 890 895

Glu Val Asn Ile Ser Gln Asn Asp Tyr Ile Ile Tyr Asp Asn Lys Tyr  
 900 905 910

Lys Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Asn Tyr Asp Asn  
 915 920 925

Lys Ile Val Asn Val Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Arg  
 930 935 940

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

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

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

ES 2 647 243 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Glu Lys  
 1250

5 <210> 22  
 <211> 1280  
 <212> PRT

ES 2 647 243 T3

<213> Clostridium botulinum

<400> 22

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

Glu Thr Ile Leu Tyr Met Gln Lys Pro Tyr Glu Glu Arg Ser Arg Lys  
20 25 30

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

Arg Asp Thr Ile Gly Thr Lys Pro Asp Glu Phe Gln Val Pro Asp Ser  
50 55 60

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

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

Arg Ile Asn Ser Asn Pro Thr Gly Lys Val Leu Leu Glu Glu Val Ser  
100 105 110

Asn Ala Arg Pro Tyr Leu Gly Asp Asp Asp Thr Leu Ile Asn Glu Phe  
115 120 125

Leu Pro Val Asn Val Thr Thr Ser Val Asn Ile Lys Phe Ser Thr Asp  
130 135 140

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

Asp Ile Phe Lys Ala Tyr Cys Thr Pro Leu Val Arg Phe Asn Lys Ser  
165 170 175

Asp Lys Leu Ile Glu Pro Ser Asn His Gly Phe Gly Ser Ile Asn Ile  
180 185 190

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

ES 2 647 243 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 243 T3

Ser Asp Ile Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Thr Asn Leu Asn  
465 470 475 480

Asn Asn Tyr Arg Asn Asn Leu Asp Glu Val Ile Leu Asp Tyr Asn Ser  
485 490 495

Glu Thr Ile Pro Gln Ile Ser Asn Arg Thr Leu Asn Thr Leu Val Gln  
500 505 510

Asp Asn Ser Tyr Val Pro Arg Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Glu Ile  
515 520 525

Glu Glu Tyr Asp Val Val Asp Phe Asn Val Phe Phe Tyr Leu His Ala  
530 535 540

Gln Lys Val Pro Glu Gly Glu Thr Asn Ile Ser Leu Thr Ser Ser Ile  
545 550 555 560

Asp Thr Ala Leu Leu Glu Glu Ser Lys Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser  
565 570 575

Glu Phe Ile Asp Thr Ile Asn Lys Pro Val Asn Ala Ala Leu Phe Ile  
580 585 590

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

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

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

Glu Glu Ala Phe Glu Leu Leu Gly Ala Gly Ile Leu Leu Glu Phe Val  
645 650 655

Pro Glu Leu Thr Ile Pro Val Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Tyr  
660 665 670

Ile Asp Ser Tyr Glu Asn Lys Asn Lys Ala Ile Lys Ala Ile Asn Asn  
675 680 685

Ser Leu Ile Glu Arg Glu Ala Lys Trp Lys Glu Ile Tyr Ser Trp Ile  
690 695 700

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

ES 2 647 243 T3

Glu Gln Met Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asp Ala Ile Lys Thr  
 725 730 735  
 Ala Ile Glu Tyr Lys Tyr Asn Asn Tyr Thr Ser Asp Glu Lys Asn Arg  
 740 745 750  
 Leu Glu Ser Lys Tyr Asn Ile Asn Asn Ile Glu Glu Glu Leu Asn Lys  
 755 760 765  
 Lys Val Ser Leu Ala Met Lys Asn Ile Glu Arg Phe Met Thr Glu Ser  
 770 775 780  
 Ser Ile Ser Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Ala Glu Val Gly Lys  
 785 790 795 800  
 Leu Lys Glu Tyr Asp Lys His Val Lys Ser Asp Leu Leu Asp Tyr Ile  
 805 810 815  
 Leu Tyr His Lys Leu Ile Leu Gly Glu Gln Thr Lys Glu Leu Ile Asp  
 820 825 830  
 Leu Val Thr Ser Thr Leu Asn Ser Ser Ile Pro Phe Glu Leu Ser Ser  
 835 840 845  
 Tyr Thr Asn Asp Lys Ile Leu Ile Ile Tyr Phe Asn Arg Leu Tyr Lys  
 850 855 860  
 Lys Ile Lys Asp Ser Ser Ile Leu Asp Met Arg Tyr Glu Asn Asn Lys  
 865 870 875 880  
 Phe Ile Asp Ile Ser Gly Tyr Gly Ser Asn Ile Ser Ile Asn Gly Asn  
 885 890 895  
 Val Tyr Ile Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Ser Gly  
 900 905 910  
 Arg Leu Ser Glu Val Asn Ile Ala Gln Asn Asn Asp Ile Ile Tyr Asn  
 915 920 925  
 Ser Arg Tyr Gln Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Thr Ile Pro Lys  
 930 935 940  
 His Tyr Arg Pro Met Asn Arg Asn Arg Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys  
 945 950 955 960  
 Met Gly Asn Asn Asn Ser Gly Trp Lys Ile Ser Leu Arg Thr Ile Arg  
 965 970 975  
 Asp Cys Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Ser Gly Asn Lys Glu

ES 2 647 243 T3

980	985	990
Lys Leu Ile Phe Arg Tyr Glu Glu 995	Leu Ala Ser Ile Ser 1000	Asp Tyr Ile 1005
Asn Lys Trp Ile Phe Val Thr 1010	Ile Thr Asn Asn Arg 1015	Leu Gly Asn 1020
Ser Arg Ile Tyr Ile Asn Gly 1025	Asn Leu Ile Val Glu 1030	Lys Ser Ile 1035
Ser Asn Leu Gly Asp Ile His 1040	Val Ser Asp Asn Ile 1045	Leu Phe Lys 1050
Ile Val Gly Cys Asp Asp Glu 1055	Thr Tyr Val Gly Ile 1060	Arg Tyr Phe 1065
Lys Val Phe Asn Thr Glu Leu 1070	Asp Lys Thr Glu Ile 1075	Glu Thr Leu 1080
Tyr Ser Asn Glu Pro Asp Pro 1085	Ser Ile Leu Lys Asp 1090	Tyr Trp Gly 1095
Asn Tyr Leu Leu Tyr Asn Lys 1100	Lys Tyr Tyr Leu Phe 1105	Asn Leu Leu 1110
Arg Lys Asp Lys Tyr Ile Thr 1115	Arg Asn Ser Gly Ile 1120	Leu Asn Ile 1125
Asn Gln Gln Arg Gly Val Thr 1130	Gly Gly Ile Ser Val 1135	Phe Leu Asn 1140
Tyr Lys Leu Tyr Glu Gly Val 1145	Glu Val Ile Ile Arg 1150	Lys Asn Ala 1155
Pro Ile Asp Ile Ser Asn Thr 1160	Asp Asn Phe Val Arg 1165	Lys Asn Asp 1170
Leu Ala Tyr Ile Asn Val Val 1175	Asp His Gly Val Glu 1180	Tyr Arg Leu 1185
Tyr Ala Asp Ile Ser Ile Thr 1190	Lys Ser Glu Lys Ile 1195	Ile Lys Leu 1200
Ile Arg Thr Ser Asn Pro Asn 1205	Asp Ser Leu Gly Gln 1210	Ile Ile Val 1215
Met Asp Ser Ile Gly Asn Asn 1220	Cys Thr Met Asn Phe 1225	Gln Asn Asn 1230

ES 2 647 243 T3

Asp Gly Ser Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe His Ser Asp Asp Leu  
 1235 1240 1245

Val Ala Ser Ser Trp Tyr Tyr Asn His Ile Arg Arg Asn Thr Ser  
 1250 1255 1260

Ser Asn Gly Cys Phe Trp Ser Phe Ile Ser Lys Glu His Gly Trp  
 1265 1270 1275

Lys Glu  
 1280

<210> 23

<211> 1297

5 <212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<220>

<221> característica\_misc

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

<223> Xaa puede sercualquier aminoácido que se produce de forma natural

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 243 T3

Pro Gly Ala Glu Asp Gln Ile Lys Gly Leu Met Thr Asn Leu Ile Ile  
 145 150 155 160  
 Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Ser Asp Asn Phe Thr Asp Ser Met Ile  
 165 170 175  
 Met Asn Gly His Ser Pro Ile Ser Glu Gly Phe Gly Ala Arg Met Met  
 180 185 190  
 Ile Arg Phe Cys Pro Ser Cys Leu Asn Val Phe Asn Asn Val Gln Glu  
 195 200 205  
 Asn Lys Asp Thr Ser Ile Phe Ser Arg Arg Ala Tyr Phe Ala Asp Pro  
 210 215 220  
 Ala Leu Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr  
 225 230 235 240  
 Gly Ile Lys Ile Ser Asn Leu Pro Ile Thr Pro Asn Thr Lys Glu Phe  
 245 250 255  
 Phe Met Gln His Ser Asp Pro Val Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe  
 260 265 270  
 Gly Gly His Asp Pro Ser Val Ile Ser Pro Ser Thr Asp Met Asn Ile  
 275 280 285  
 Tyr Asn Lys Ala Leu Gln Asn Phe Gln Asp Ile Ala Asn Arg Leu Asn  
 290 295 300  
 Ile Val Ser Ser Ala Gln Gly Ser Gly Ile Asp Ile Ser Leu Tyr Lys  
 305 310 315 320  
 Gln Ile Tyr Lys Asn Lys Tyr Asp Phe Val Glu Asp Pro Asn Gly Lys  
 325 330 335  
 Tyr Ser Val Asp Lys Asp Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ala Leu Met  
 340 345 350  
 Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Leu Ala Gly Glu Tyr Gly Ile Lys Thr  
 355 360 365  
 Arg Tyr Ser Tyr Phe Ser Glu Tyr Leu Pro Pro Ile Lys Thr Glu Lys  
 370 375 380  
 Leu Leu Asp Asn Thr Ile Tyr Thr Gln Asn Glu Gly Phe Asn Ile Ala  
 385 390 395 400

ES 2 647 243 T3

Ser Lys Asn Leu Lys Thr Glu Phe Asn Gly Gln Asn Lys Ala Val Asn  
 405 410 415

Lys Glu Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Leu Glu His Leu Val Ile Tyr Arg  
 420 425 430

Ile Ala Met Cys Lys Pro Val Met Tyr Lys Asn Thr Gly Lys Ser Glu  
 435 440 445

Gln Cys Ile Ile Val Asn Asn Glu Asp Leu Phe Phe Ile Ala Asn Lys  
 450 455 460

Asp Ser Phe Ser Lys Asp Leu Ala Lys Ala Glu Thr Ile Ala Tyr Asn  
 465 470 475 480

Thr Gln Asn Asn Thr Ile Glu Asn Asn Phe Ser Ile Asp Gln Leu Ile  
 485 490 495

Leu Asp Asn Asp Leu Ser Ser Gly Ile Asp Leu Pro Asn Glu Asn Thr  
 500 505 510

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

Gln Ser Ala Leu Lys Lys Ile Phe Val Asp Gly Asp Ser Leu Phe Glu  
 530 535 540

Tyr Leu His Ala Gln Thr Phe Pro Ser Asn Ile Glu Asn Leu Gln Leu  
 545 550 555 560

Thr Asn Ser Leu Asn Asp Ala Leu Arg Asn Asn Asn Lys Val Tyr Thr  
 565 570 575

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

Ser Leu Phe Val Asn Trp Val Lys Gly Val Ile Asp Asp Phe Thr Ser  
 595 600 605

Glu Ser Thr Gln Lys Ser Thr Ile Asp Lys Val Ser Asp Val Ser Ile  
 610 615 620

Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Val Gly Asn Glu Thr Ala  
 625 630 635 640

Lys Glu Asn Phe Lys Asn Ala Phe Glu Ile Gly Gly Ala Ala Ile Leu  
 645 650 655

ES 2 647 243 T3

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

Leu Glu Ser Tyr Val Gly Asn Lys Gly His Ile Ile Met Thr Ile Ser  
675 680 685

Asn Ala Leu Lys Lys Arg Asp Gln Lys Trp Thr Asp Met Tyr Gly Leu  
690 695 700

Ile Val Ser Gln Trp Leu Ser Thr Val Asn Thr Gln Phe Tyr Thr Ile  
705 710 715 720

Lys Glu Arg Met Tyr Asn Ala Leu Asn Asn Gln Ser Gln Ala Ile Glu  
725 730 735

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

Asn Ile Asn Ile Asp Phe Asn Asp Ile Asp Phe Lys Leu Asn Gln Ser  
755 760 765

Ile Asn Leu Ala Ile Asn Asn Ile Asp Asp Phe Ile Asn Gln Cys Ser  
770 775 780

Ile Ser Tyr Leu Met Asn Arg Met Ile Pro Leu Ala Val Lys Lys Leu  
785 790 795 800

Lys Asp Phe Asp Asp Asn Leu Lys Arg Asp Leu Leu Glu Tyr Ile Asp  
805 810 815

Thr Asn Glu Leu Tyr Leu Leu Asp Glu Val Asn Ile Leu Lys Ser Lys  
820 825 830

Val Asn Arg His Leu Lys Asp Ser Ile Pro Phe Asp Leu Ser Leu Tyr  
835 840 845

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

Ile Ser Ser Asn Ala Ile Leu Ser Leu Ser Tyr Arg Gly Gly Arg Leu  
865 870 875 880

Ile Asp Ser Ser Gly Tyr Gly Ala Thr Met Asn Val Gly Ser Asp Val  
885 890 895

Ile Phe Asn Asp Ile Gly Asn Gly Gln Phe Lys Leu Asn Asn Ser Glu  
900 905 910

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



ES 2 647 243 T3

Ile Tyr Leu Asn Ile Asp Asn Ile Ser Asp Glu Ser Tyr Arg Val  
 1175 1180 1185

Tyr Val Leu Val Asn Ser Lys Glu Ile Gln Thr Gln Leu Phe Leu  
 1190 1195 1200

Ala Pro Ile Asn Asp Asp Pro Thr Phe Tyr Asp Val Leu Gln Ile  
 1205 1210 1215

Lys Lys Tyr Tyr Glu Lys Thr Thr Tyr Asn Cys Gln Ile Leu Cys  
 1220 1225 1230

Glu Lys Asp Thr Lys Thr Phe Gly Leu Phe Gly Ile Gly Lys Phe  
 1235 1240 1245

Val Lys Asp Tyr Gly Tyr Val Trp Asp Thr Tyr Asp Asn Tyr Phe  
 1250 1255 1260

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

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

Gly Trp Thr Glu  
 1295

<210> 24

<211> 1315

5 <212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 24

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

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

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

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

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

ES 2 647 243 T3

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



ES 2 647 243 T3

Gly Ile Leu Phe Leu Gln Trp Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr  
610 615 620

Asn Glu Ser Ser Gln Lys Thr Thr Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser  
625 630 635 640

Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Val Lys Gln Gly  
645 650 655

Tyr Glu Gly Asn Phe Ile Gly Ala Leu Glu Thr Thr Gly Val Val Leu  
660 665 670

Leu Leu Glu Tyr Ile Pro Glu Ile Thr Leu Pro Val Ile Ala Ala Leu  
675 680 685

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 243 T3

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

ES 2 647 243 T3

Leu Arg Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr  
 1115 1120 1125

Tyr Leu Ile Pro Val Ala Ser Ser Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys  
 1130 1135 1140

Asn Ile Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr Asn Ala Pro Ser Tyr Thr  
 1145 1150 1155

Asn Gly Lys Leu Asn Ile Tyr Tyr Arg Arg Leu Tyr Asn Gly Leu  
 1160 1165 1170

Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn Glu Ile Asp Ser  
 1175 1180 1185

Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Asn  
 1190 1195 1200

Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr Pro Lys Asp Gly Asn Ala Phe  
 1205 1210 1215

Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly Tyr Asn Ala Pro Gly  
 1220 1225 1230

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

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

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

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

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

Asp Glu Gly Trp Thr Asn Asp  
 1310 1315

<210> 25

<211> 17

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> secuencia peptídica

10

<400> 25

Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met  
 1 5 10 15

Leu



**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento *in vitro* para determinar la cantidad de polipéptidos de neurotoxina clostridial tratados en una solución que comprende polipéptidos de neurotoxina tratados y polipéptidos de neurotoxina parcialmente tratados y/o no tratados, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

- 5 a) poner en contacto una primera porción de dicha solución que comprende polipéptido neurotoxina clostridial tratado y polipéptido neurotoxina parcialmente tratado y/o no tratado, con un primer anticuerpo de captura que se une específicamente a la cadena ligera del polipéptido neurotoxina tratado, parcialmente tratado y sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho anticuerpo de captura a dicha ligera de polipéptido neurotoxina tratado, parcialmente tratado y sin tratar, formando así un primer complejo de anticuerpo,
- 10 b) poner en contacto dicho primer complejo de anticuerpo con un anticuerpo de detección que se une específicamente a la cadena ligera de dicho polipéptido neurotoxina clostridial tratado, parcialmente tratado, y no tratado en el complejo de anticuerpo formado en la etapa a), por lo que se forma un primer complejo de detección,
- 15 c) poner en contacto una segunda porción de dicha solución que comprende polipéptido neurotoxina clostridial tratado y polipéptido neurotoxina parcialmente tratado y/o sin tratar con un segundo anticuerpo de captura que se une específicamente al enlazador de dicho polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho segundo anticuerpo de captura a dicho polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar, en donde dicho segundo anticuerpo de captura se une específicamente a un epítipo peptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las SEQ. ID. n°: 1 a n°: 16, formando así un segundo complejo de anticuerpos,
- 20 d) poner en contacto dicho segundo complejo de anticuerpo con un anticuerpo de detección que es diferente del anticuerpo de detección en la etapa b) y que se une específicamente al complejo de anticuerpo formado en la etapa c), con lo cual se forma un segundo complejo de detección,
- e) determinar la cantidad del primer complejo de detección formado en la etapa b) y la cantidad del segundo complejo de detección formado en la etapa d), y
- 25 f) calcular la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratado, basándose en las cantidades del primer y segundo complejo de detección determinado en la etapa e).

2. Un procedimiento *in vitro* para determinar la cantidad de polipéptidos de neurotoxina clostridial tratados en una solución que comprende polipéptidos de neurotoxina tratados y polipéptidos de neurotoxina clostridial parcialmente tratados y/o no tratados, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

- 30 a) poner en contacto una primera porción de dicha solución que comprende polipéptido neurotoxina clostridial tratado y polipéptido neurotoxina parcialmente tratado y/o no tratado, con un primer anticuerpo de captura que se une específicamente a la cadena pesada del polipéptido neurotoxina tratado, parcialmente tratado y sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho anticuerpo de captura a dicha pesada de polipéptido neurotoxina tratado, parcialmente tratado y sin tratar, formando así un primer complejo de anticuerpo,
- 35 b) poner en contacto dicho primer complejo de anticuerpo con un anticuerpo de detección que se une específicamente a la cadena ligera de dicho polipéptido neurotoxina clostridial tratado, parcialmente tratado, y no tratado en el complejo de anticuerpo formado en la etapa a), por lo que se forma un primer complejo de detección,
- 40 c) poner en contacto una segunda porción de dicha solución que comprende polipéptido neurotoxina clostridial tratado y polipéptido neurotoxina parcialmente tratado y/o sin tratar con un segundo anticuerpo de captura que se une específicamente al enlazador de dicho polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho anticuerpo de captura a dicho polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar, en donde dicho segundo anticuerpo de captura se une específicamente a un epítipo peptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las SEQ. ID. n°: 1 a n°: 16, formando así un segundo complejo de anticuerpos,
- 45 d) poner en contacto dicho segundo complejo de anticuerpo con un anticuerpo de detección que es diferente del anticuerpo de detección en la etapa b) y que se une específicamente al complejo de anticuerpo formado en la etapa c), con lo cual se forma un segundo complejo de detección,
- e) determinar la cantidad del primer complejo de detección formado en la etapa b) y la cantidad del segundo complejo de detección formado en la etapa d), y
- 50 f) calcular la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratado, basándose en las cantidades del primer y segundo complejo de detección determinado en la etapa e).

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho primer anticuerpo de captura está inmovilizado.

4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho segundo anticuerpo de captura está

inmovilizado.

5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde calcular en la etapa f) comprende sustraer la cantidad determinada del segundo complejo de detección de la cantidad determinada del primer complejo de detección.

5 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho polipéptido neurotoxina clostridial sin tratar se selecciona del grupo consistente en:

a) un polipéptido neurotoxina clostridial como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID n°: 17 a n°: 24; y

b) un polipéptido neurotoxina clostridial que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 40% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido neurotoxina clostridial de a).

10 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho procedimiento comprende determinar la actividad de unión del polipéptido neurotoxina clostridial tratado a la proteína del receptor de superficie.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende las etapas siguientes:

15 i) poner en contacto una porción de un polipéptido neurotoxina clostridial que contiene solución con un péptido marcado que simula el dominio de unión de dicha proteína del receptor de superficie, con lo que se forma un complejo, y

ii) determinar dicho complejo formado en la etapa i) basándose en el marcador, por lo que la presencia o ausencia del complejo, o su cantidad, es indicativa de la actividad de unión del polipéptido neurotoxina clostridial en dicha solución.

20 9. El procedimiento de cualquiera de la reis 1 a 8, en donde dicho procedimiento comprende además determinar la actividad proteolítica del polipéptido neurotoxina clostridial.

10. El procedimiento, de la reivindicación 9, que comprende las etapas siguientes:

iii) poner en contacto una porción de una solución que contiene polipéptido neurotoxina clostridial con un compuesto que tiene la fórmula general: X-para-nitroanilida, en donde X es arginina o un péptido que tiene la secuencia arginina-Y, en donde Y representa uno o más aminoácidos, y

25 iv) determinar la actividad proteolítica del polipéptido neurotoxina clostridial en dicha solución en base a la cantidad de para-nitroanilina liberada en la etapa iii) que se correlaciona con la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial.

30 11. Un equipo para determinar la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratado en una solución que comprende polipéptido neurotoxina tratado, polipéptido neurotoxina parcialmente tratados y/o sin tratar que comprende el equipo siguiente:

a) un primer anticuerpo de captura que se une específicamente a la cadena ligera de polipéptido neurotoxina clostridial tratado, parcialmente tratado y sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho primer anticuerpo de captura a dicho polipéptido neurotoxina clostridial tratado, parcialmente tratado y sin tratar, formando así un primer complejo de anticuerpo;

35 b) un anticuerpo de detección que se une específicamente a la cadena pesada de dicho polipéptido neurotoxina clostridial tratado o sin tratar en el primer complejo de anticuerpo, por lo que se forma un primer complejo de detección,

40 c) un segundo anticuerpo de captura que se une específicamente al enlazador de dicho polipéptido neurotoxina clostridial tratado o sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho segundo anticuerpo de captura a dicho polipéptido neurotoxina clostridial tratado o sin tratar, en donde dicho segundo anticuerpo de captura se une a un epítipo peptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquier de las SEQ. ID. n°: 1 a n°: 16, formando así un segundo complejo de anticuerpos,

45 d) un anticuerpo de detección que es diferente del anticuerpo de detección en la etapa b) y que se une específicamente al complejo de anticuerpo formado en la etapa c), con lo cual se forma un segundo complejo de detección,

e) medios para calcular la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratado, en base a las cantidades del primer y segundo complejo de detección; y

50 f) instrucciones para llevar a cabo la formación de un primer complejo de anticuerpo, la formación de un segundo complejo de anticuerpo, la determinación de las cantidades del primer complejo de anticuerpo y del segundo complejo de anticuerpo y el cálculo de la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratado.

12. Un equipo para la determinación de la cantidad de un polipéptido neurotoxina clostridial tratado en una solución que comprende polipéptido neurotoxina clostridial tratado y polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar, comprendiendo el equipo:
- 5 a) un primer anticuerpo de captura que se une específicamente a las cadenas pesadas del polipéptido neurotoxina clostridial tratado, parcialmente tratado y sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho primer anticuerpo de captura a dicho polipéptido neurotoxina clostridial tratado, parcialmente tratado y sin tratar, formando de este modo un primer complejo de anticuerpo;
  - 10 b) un anticuerpo de detección que se une específicamente a las cadenas ligeras de dicho polipéptido neurotoxina clostridial tratado, sin tratar y parcialmente tratado en el primer complejo de anticuerpo, con lo que se forma un primer complejo de detección;
  - 15 c) un segundo anticuerpo de captura que se une específicamente al enlazador de dicho polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado y sin tratar en condiciones que permiten la unión de dicho segundo anticuerpo de captura a dicho polipéptido neurotoxina clostridial parcialmente tratado o sin tratar, en donde dicho segundo anticuerpo de captura se une específicamente a un epítipo peptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las SEQ. ID. n°: 1 a n°: 16, formando de este modo un segundo complejo de anticuerpos;
  - d) un anticuerpo de detección que es diferente del anticuerpo de detección en la etapa b) y que se une específicamente al complejo de anticuerpo formado en la etapa c), con lo cual se forma un segundo complejo de detección;
  - 20 e) medios para calcular la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratado, en base a las cantidades del primer y segundo complejo de detección; y
  - f) instrucciones para llevar a cabo la formación de un primer complejo de anticuerpo, la formación de un segundo complejo de anticuerpo, la determinación de las cantidades del primer complejo de anticuerpo y del segundo complejo de anticuerpo y el cálculo de la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratado.
- 25 13. El equipo de la reivindicación 11 o 12, en donde dicho polipéptido neurotoxina clostridial sin tratar se selecciona del grupo consistente en:
- a) un polipéptido neurotoxina clostridial como se muestra en cualquiera de las SEQ. ID. n°: 17 a 24; y
  - b) un polipéptido neurotoxina clostridial que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 40% idéntica a la secuencia de aminoácidos del polipéptido neurotoxina clostridial de a).
- 30 14. El equipo de las reivindicaciones 11 a 13, en donde los componentes del equipo están contenidos en viales separados.
15. El equipo de la reivindicación 11 o 12, en donde el cálculo de la cantidad de polipéptido neurotoxina clostridial tratado comprende sustraer la cantidad determinada del segundo complejo de detección de la cantidad determinada del primer complejo de detección.

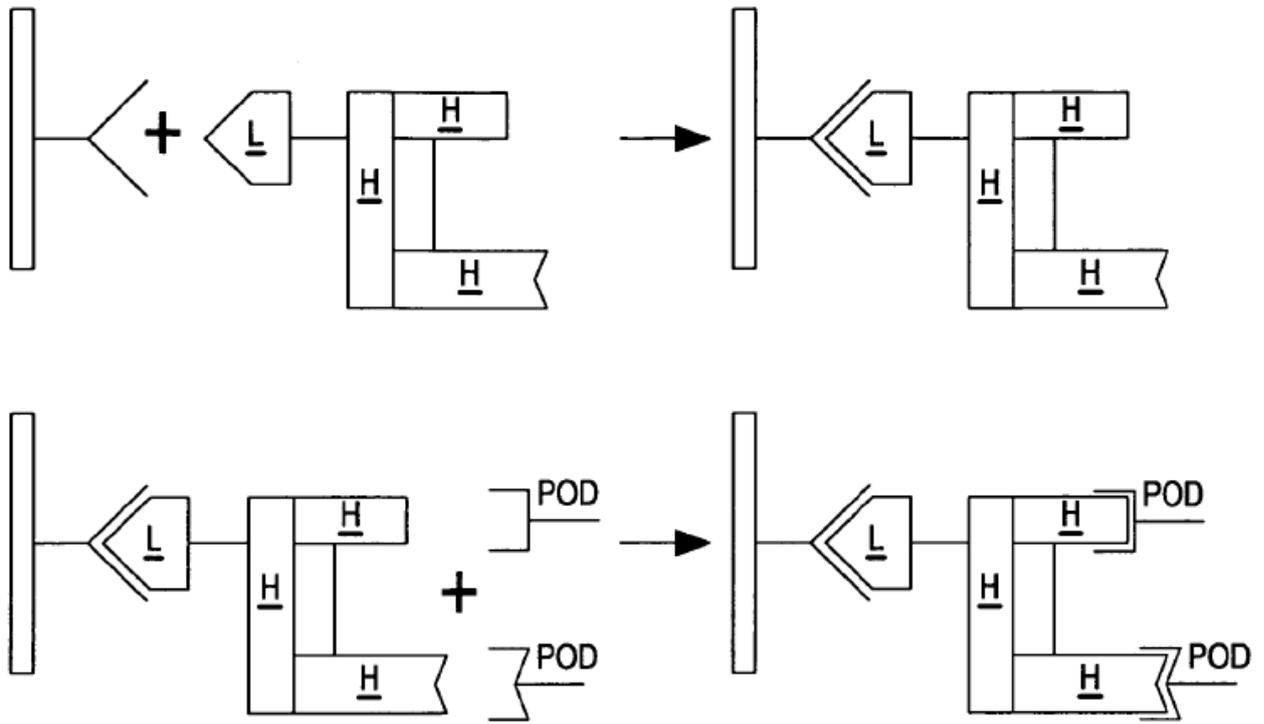


Fig. 1

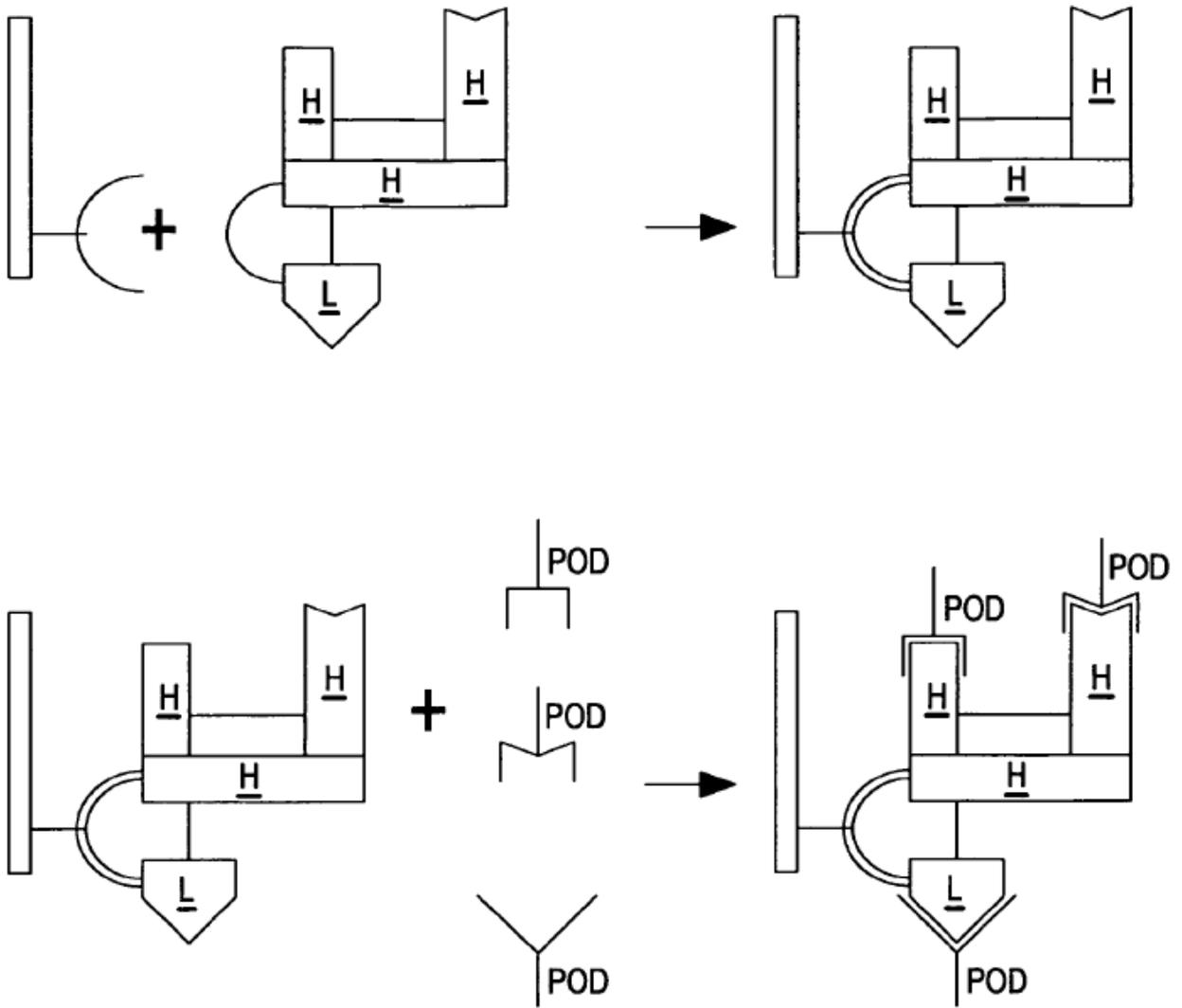


Fig. 2

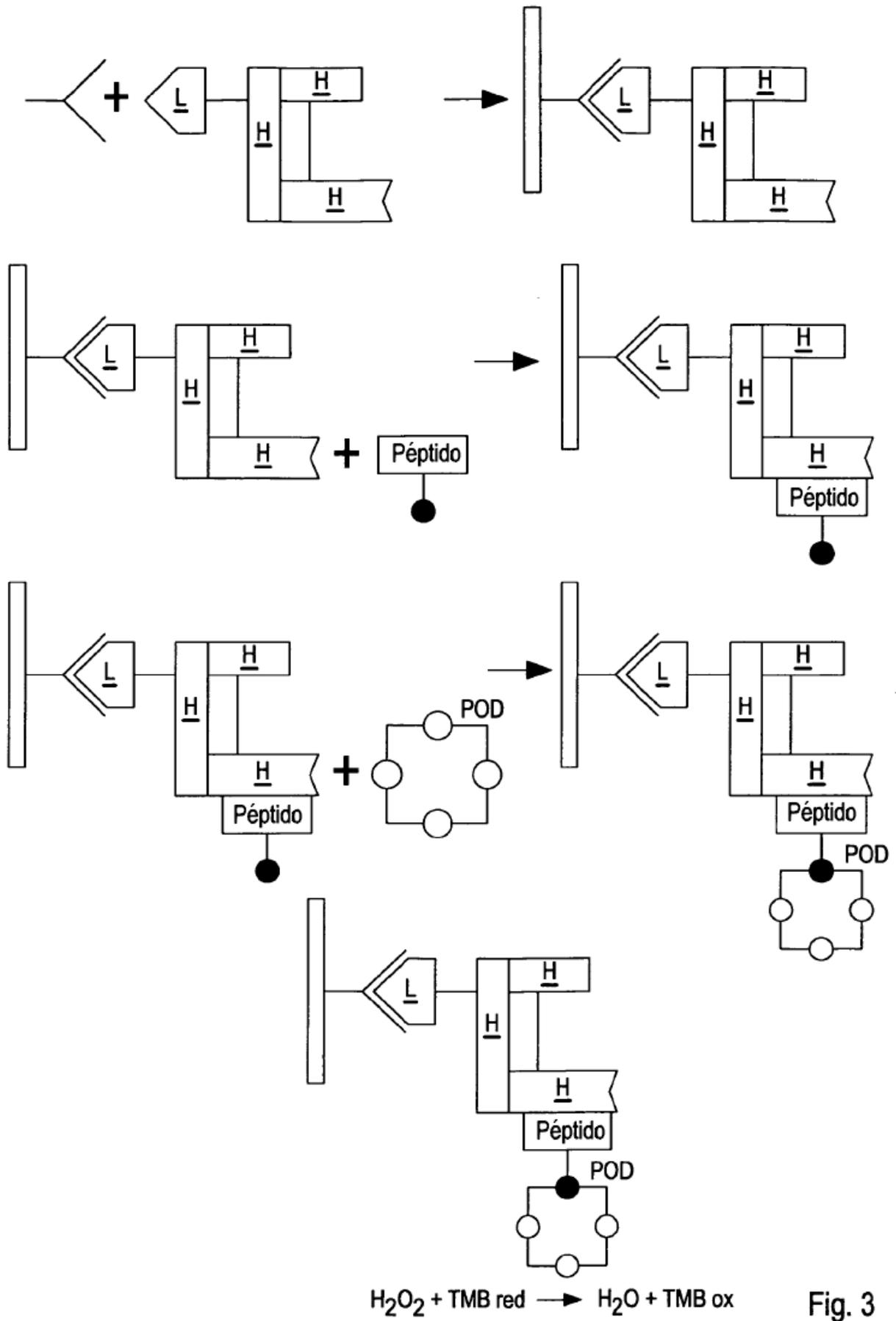
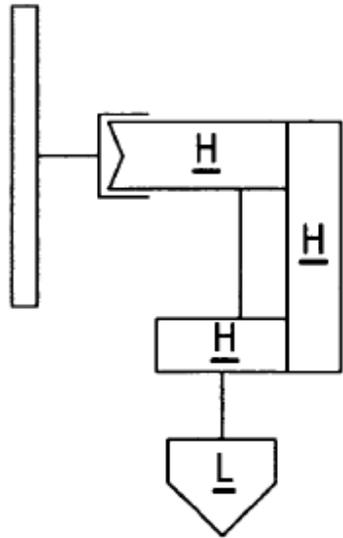
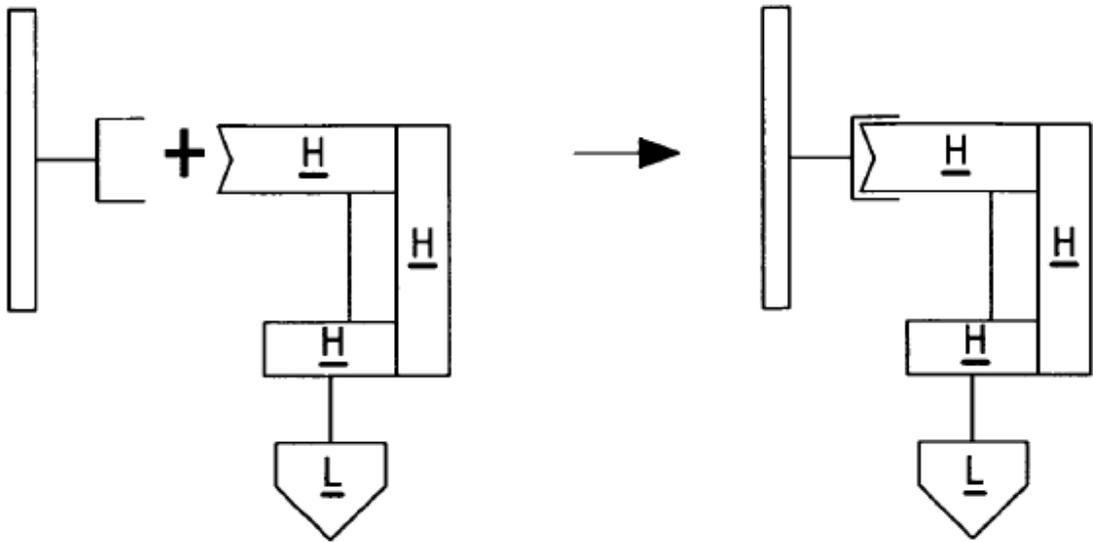


Fig. 3



Péptido-Arg-  
p-nitrofenilanilida



Péptido-Arg +  
p-nitrofenilanilida (gelb)

Fig. 4