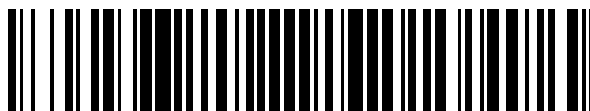


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 249**

51 Int. Cl.:

**C40B 30/06** (2006.01)

**C12Q 1/02** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2012 PCT/US2012/057825**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13049508**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012 E 12835606 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2761065**

54 Título: **Composiciones y métodos para ensayos de toxigenicidad**

30 Prioridad:

**29.09.2011 US 201161540693 P**

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

**06.02.2018**

73 Titular/es:

**CELLSNAP, LLC (100.0%)  
350 South Hamilton Street No. 801  
Madison, WI 53703, US**

72 Inventor/es:

**WHITEMARSH, REGINA CLARE MEYER;  
JOHNSON, ERIC ARTHUR;  
PELLETT, SABINE y  
TEPP, WILLIAM HOWARD**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones :**

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

**ES 2 653 249 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

Composiciones y métodos para ensayos de toxigenicidad

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para probar neurotoxina de *Clostridium botulinum* (BoNT). En particular, la presente invención se refiere al uso de células derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPS) para detección y análisis de BoNT.

**Antecedentes de la invención**

Las neurotoxinas botulínicas (BoNT), sintetizadas por la bacteria Gram-positiva que vive en el suelo *Clostridium botulinum*, son las sustancias más tóxicas conocidas por la raza humana y son los agentes causantes de la enfermedad neuroparalítica botulismo (Johnson E (2005) en *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*, ed S. P. Borriello, P. R. Murray, y G. Funke (Hodder Arnold, Londres, Reino Unido), páginas 1035-1088). Siete serotipos inmunológicamente distintos de BoNT designados A a G han sido descritos (Gimenez DF & Gimenez JA (1995) *Int J Food Microbiol* 27: 1-9). Las BoNT se sintetizan inicialmente como un polipéptido de cadena única de ~150 kDa, pero la escisión proteolítica después de la traducción rinde cadenas pesada y ligera distintas (HC y LC) de ~100 kDa y ~50 kDa enlazadas por un enlace de disulfuro. La HC se divide funcionalmente además en los subdominios HC<sub>C</sub> y HC<sub>N</sub>. El dominio HC<sub>C</sub> es responsable del reconocimiento y unión a receptores de superficie de células neuronales específicos dando lugar a endocitosis, mientras que el dominio HC<sub>N</sub> es responsable de la formación de canales en la membrana de vesículas endocíticas y translocación e internalización de la LC a través de la membrana endosómica (Montecucco et al., (2004) *Trends Microbiol* 12: 442-446; Fischer A y Montal M (2007) *J Biol Chem* 282:29604-29611; Fischer A, et al (2009) *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 1330-1335). Durante la translocación, el enlace disulfuro se escinde, y la LC es liberada en el citosol celular y replegada en el componente de enzima activa como una endopeptidasa dependiente de cinc (Fischer et al., citado arriba; Fischer A y Montal M (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10447-10452). La LC toma como diana y corta específicamente una proteína SNARE intracelular en las vesículas presinápticas, lo que da lugar a la inhibición de la liberación de neurotransmisores. Cada serotipo de BoNT tiene una diana de escisión distinta, con BoNT/A y E escindiendo SNAP-25 en sitios distintos, BoNT/B, D, F y G escindiendo VAMP/sinaptobrevina en sitios diferentes, y BoNT/C escindiendo tanto SNAP-25 como sintaxina (revisado en Montecucco C y Schiavo G (1994) *Mol Microbiol* 13: 1-8).

El botulismo de origen natural es una enfermedad rara pero grave, con ~110 casos ocurriendo al año en los Estados Unidos y una tasa de mortalidad de ~5-10% (Johnson EA y Montecucco C (2008) en *Handbook of Clinical Neurology*, ed Andrew G. Engel (Elsevier, páginas 333-368). Debido a su extrema potencia (dosis letal humana estimada de 1 ng/kg de peso corporal para BoNT/A (Bossi P, et al, (2006) *Cell Mol Life Sci* 63:2196-2212), la gravedad de la enfermedad de botulismo y el alto coste implicado en los casos de tratamiento, especialmente a gran escala, las BoNT han sido clasificadas como un Agente Selecto categoría A y presentan una seria amenaza como un arma de bioterrorismo (Arnon SS, et al, (2001) *JAMA* 285:1059-1070).

BoNT/A y en un grado mucho menor BoNT/B también están siendo usadas como fármacos únicos e importantes para tratar una variedad de trastornos neuromusculares y en cosmética. Las afecciones para las cuales la Administración de Fármacos y Alimentos aprobó el uso de las BoNT incluyen tratamientos cosméticos y para aliviar temporalmente una variedad de trastornos de espasticidad muscular, hiperhidrosis y migrañas (Chaddock JA y Acharya KR (2011) *FEBS J* 278:899-904). Las aplicaciones cosméticas y clínicas de las BoNT se están incrementando, y se están desarrollando nuevas formulaciones de BoNT para propósitos farmacéuticos que requieren de ensayos clínicos, determinación de potencia precisa y análisis de anticuerpos neutralizantes. Por ejemplo, las BoNTs se administran farmacéuticamente para el tratamiento de trastornos de dolor, fuerza muscular voluntaria, distonía focal, incluyendo distonía cervical y craneal y blefaroespasma esencial benigno, espasmo hemifacial y espasticidad focal, trastornos gastrointestinales, hiperhidrosis, y corrección cosmética de arrugas, blefaroespasma, distonía oromandibular, tipo de apertura de la mandíbula, tipo de cierre de la mandíbula, bruxismo, síndrome de Meige, distonía lingual, apraxia del párpado, distonía cervical de apertura, antécolis, retrócolis, laterócolis, tortícolis, distonía faríngea, distonía laríngea, disfonía espasmódica/tipo aductor, disfonía espasmódica/tipo abductor, disnea espasmódica, distonía de extremidades, distonía de brazo, la distonía específica de tarea, calambre del escritor, calambres del músico, calambre del golfista, distonía de la pierna, aducción del muslo, flexión de la rodilla por abducción de muslo, extensión de la rodilla, flexión del tobillo, extensión de tobillo, equinovaro, distonía del pie por deformidad, dedo del pie estriado, flexión de los dedos del pie, extensión de los dedos del pie, distonía axial, síndrome de pisa, distonía por danza del vientre, distonía segmentaria, hemidistonia, distonía generalizada, distonía en Lubag, distonía en degeneración corticobasal, distonía en Lubag, distonía tardía, distonía en la ataxia espinocerebelosa, distonía en la enfermedad de Parkinson, distonía en la enfermedad de Huntington, distonía en la enfermedad de Hallervorden-Spatz, discinesias inducidas por dopa/distonía inducida por dopa, discinesias tardías/distonía tardía, discinesias/distonías paroxísticas, mioclono palatino inducido por acción kinesiogénica no kinesiogénica, mioquimia mioclonías, rigidez, calambres musculares benignos, barbilla temblorosa hereditaria, actividad paradójica de músculo de la mandíbula, espasmos hemimasticatorios, miopatía hipertrófica branquial, hipertrofia masetérica, hipertrofia tibial anterior, nistagmo, parálisis visual supranuclear oscilopsia, epilepsia, parcial continua, la planificación de operación de tortícolis espasmódica, parálisis de las cuerdas vocales

abductoras, disfonía mutacional recalcitrante, disfunción del esfínter esofágico superior, granuloma de las cuerdas vocales, tartamudez, síndrome de Gilles de la Tourette, mioclonías del oído medio, cierre de laringe protector, postlaringectomía, insuficiencia de voz, ptosis protectora, disfunción Odii de esfínter entropión, pseudoacalasia, nonacalsia, trastornos motores esofágicos, vaginismo, temblor por inmovilización postoperatoria, disfunción de la vejiga, disinergia del esfínter detrusor, espasmo del esfínter de la vejiga, espasmo hemifacial, discinesias por reneuvación, patas de gallo por uso cosmético, asimetrías faciales por fruncimiento, hoyuelos mentonianos, síndrome de persona rígida, hiperplasia de próstata por tétanos, adiposidad, tratamiento infantil de estrabismo por parálisis cerebral, concomitante paralítico mixto, después de cirugía de desprendimiento de retina, después de cirugía de cataratas, en estrabismo miosítico por afaquia, estrabismo miopático, desviación disociada vertical, como complemento de la cirugía de estrabismo, esotropía, exotropía, acalasia, fisuras anales, hiperactividad de las glándulas exocrinas, síndrome de Frey, síndrome de lágrimas de cocodrilo, hiperhidrosis, rinorrea axilar palmar plantar, hipersalivación relativa en el accidente cerebrovascular, en mal de Parkinson, en esclerosis lateral amiotrófica, afecciones espásticas, en procesos autoinmunes de encefalitis y mielitis, esclerosis múltiple, mielitis transversa, síndrome de Devic, infecciones virales, infecciones bacterianas, infecciones parasitarias, infecciones por hongos, en infarto hemisférico por síndrome postapopléctico por paraparesia espástica hereditaria, infarto del tallo cerebral, infarto de médula espinal, en trauma del sistema nervioso central, lesiones hemisféricas, lesiones del tallo cerebral, lesión de médula espinal, en hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia intracerebral, hemorragia subaracnoidea, hemorragia subdural, hemorragia intramedular, en neoplasias, tumores hemisféricos, tumores del tallo cerebral y tumores de médula espinal. Así, la detección cuantitativa y fiable de la actividad de BoNT en el ambiente, en alimentos, en preparaciones farmacéuticas, para detección de anticuerpos y en aplicaciones de investigación es crucial tanto en la prevención de botulismo, como para contra-terrorismo, así como en el desarrollo de fármacos nuevos y ensayos de productos para control y aseguramiento de seguridad y calidad en pacientes.

Se han publicado muchos métodos de detección de BoNT, y se pueden dividir en cuatro categorías generales (revisado en Cai et al., (2007) *Crit Rev Microbiol* 33: 109-125): 1. Ensayos *in vitro* que detectan inmunológicamente la presencia de holotoxina pero no pueden distinguir entre estados activo o inactivo (ELISA); 2. Ensayos de endopeptidasa que detectan la actividad enzimática de la LC de la toxina pero no distinguen entre holotoxina biológicamente activa y la LC únicamente; 3. Ensayos *in vivo* (bioensayo en ratón); y finalmente 4. Ensayos de estimulación *in vivo* tales como el ensayo de hemidiafragma, ensayos de inyección local y ensayos a base de células usando células primarias o inmortalizadas. Para poder detectar las BoNT completamente activas, un ensayo de detección debe medir todas las etapas del proceso de intoxicación (por ejemplo, unión de HC a los receptores de superficie celular, endocitosis, formación de canales de vesículas, escisión del enlace disulfuro, transducción de la LC en el citosol celular y finalmente escisión proteolítica de proteínas SNARE). Sólo el bioensayo de ratón y los ensayos de simulación *in vivo* miden todas estas etapas. El bioensayo de ratón implica inyectar a ratones ya sea intravenosamente o intraperitonealmente diferentes diluciones de BoNT, y luego observar a los ratones para síntomas de envenenamiento por botulismo (parálisis de extremidades, respiración dificultada, pelaje ondulado, etc.) (Hatheway CL (1988) en *Laboratory diagnosis of infectious diseases: principles and practice*. Eds Balows A, Hausler WH, Ohashi M y Turano MA (Springer-Verlag, Nueva York), páginas 111-133; Schantz EJaK, D.A. (1978) *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 61:96-99) y finalmente muerte. Aunque la MBA es cuantitativa y puede monitorizar todas las etapas de intoxicación, tiene un gran índice de error, no está estandarizada entre o dentro de laboratorios, requiere un gran número de animales e instalaciones y personal entrenado correspondientes. Los ensayos de hemidiafragma e inyección local reducen el sufrimiento de animales y algunos son suficientemente sensibles, pero todavía requieren grandes números de animales y personal especializado.

Estas desventajas claramente identificadas de estos ensayos han incitado una recomendación de agencias reguladoras incluyendo la FDA y USDA para desarrollar un modelo a base de células que proporcione una alternativa específica, sensible y cuantitativa a la MBA (National Institute of Environmental Health Sciences, 2008). Varias líneas de células continuas, incluyendo neuro-2a y PC-12, han sido usadas para ensayos de toxicidad, pero no son lo suficientemente sensibles como para competir con el MBA. Las neuronas primarias derivadas de rata, ratón o pollo, y neuronas derivadas de células madre embrionarias de ratón son significativamente más sensibles (Hall YH, et al (2004) *J Immunol Methods* 288: 55-60; Keller JE, Cai F y Neale EA (2004) *Biochemistry* 43:526-532; Lalli G, et al (1999) *J Cell Sci* 112 (Pt 16): 2715-2724; Neale et al., (1999) *J Cell Biol* 147: 1249-1260; Stahl AM, et al (2007) *J Biomol Screen* 12:370-377). El tipo de células más sensible para ensayos de toxicidad y detección de anticuerpos descrito es el ensayo de células de médula espinal de rata primaria (RSC) (Pellet et al., (2007) *FEBS Lett* 581: 4803-4808), que es más sensible que el MBA, reproducible y se correlaciona bien con el bioensayo de ratón (Pellet et al., (2010) *J Pharmacol Toxicol Methods*). Además, neuronas derivadas de células madre embrionarias también han demostrado ser altamente sensibles (McNutt et al., (2011) *Biochem Biophys Res Commun* 405:85-90; Pellett S, et al (2011) *Biochem Biophys Res Commun* 404:388-392; Kiris E, et al (2011) *Stem Cell Res* 6(3): 195-205). Sin embargo, el ensayo RSC aún requiere el uso de algunos animales y personal especializado para la preparación de células, y no es fácilmente adaptable a estandarización de ensayos debido a la necesidad de preparar continuamente nuevos lotes de células. También se ha mostrado que las células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPS) pueden diferenciarse en neurooma motoras, aunque con una eficiencia significativamente menor que las células madre embrionarias humanas (hESC) (Karumbayaram et al, (2009) *Stem Cells* 27(4): 806-811)

## Resumen de la invención

La presente invención describe composiciones y métodos para probar agentes (detección y análisis de neurotoxina de *Clostridium botulinum* (BoNT)). En particular, la presente invención se refiere al uso de células derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPS) para detección y análisis de BoNT.

- 5 Las realizaciones de la presente invención implican células neuronales derivadas de iPS humanas para usarse en aplicaciones de investigación, cribado, clínicas y terapéuticas. En algunas realizaciones, los métodos se usan en la detección y análisis de BoNT y anticuerpos neutralizantes contra BoNT.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para ensayar una neurotoxina botulínica de *Clostridium* (BoNT) para actividad, que comprende: a) poner en contacto una célula neuronal derivada de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPS) con una composición que comprenda una NT; y b) ensayar la NT para actividad biológica. En algunas realizaciones, la especie clostrial es *Clostridium botulinum*. En algunas realizaciones, la BoNT abarca todos los siete serotipos conocidos incluyendo los serotipos A, B, C, D, E, F y G y subtipos conocidos dentro de cada serotipo. En algunas realizaciones, la NT es una NT recombinante, mutante o quimérica. En algunas realizaciones, la actividad biológica es escisión de SNAP-25, VAMP o sintaxina. En algunas realizaciones, el ensayo es cualitativo, mientras que en otras es cuantitativo. En algunas realizaciones, la NT es purificada, mientras que en otras está en un complejo, una solución o una matriz. En algunas realizaciones, la NT es recombinante. En algunas realizaciones, la NT se conjuga con otra molécula seleccionada de modalidades terapéuticas, marcadores, agentes de formación de imágenes, enzimas, receptores, anticuerpos o compuestos bioactivos. En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de poner en contacto la NT con un compuesto de ensayo antes de poner en contacto las células neuronales derivadas de hPS. En algunas realizaciones, el compuesto de ensayo es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) o inhibidor molecular pequeño de NT. En algunas realizaciones, el anticuerpo neutralizante es purificado o está en una muestra de suero o antitoxinas.

La presente invención proporciona además un método para ensayar una neurotoxina de especie clostrial (BoNT) para actividad, que comprende: a) poner en contacto una célula neuronal derivada de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPS) con una composición que comprende i) una BoNT; y ii) un anticuerpo neutralizante; y b) ensayar la BoNT para actividad biológica.

La presente invención se refiere también a un método para determinar la cantidad de BoNT biológicamente activa en una preparación que comprende BoNT biológicamente activa y, de preferencia, una preparación farmacéutica que comprende BoNT biológicamente activa. En algunas realizaciones, el método comprende las etapas de: a) poner en contacto una célula neuronal derivada de células hiPS con una muestra de una preparación que comprenda BoNT biológicamente activa; y b) determinar la cantidad de BoNT biológicamente activa presente en la preparación mediante el ensayo de la muestra para la actividad biológica de BoNT.

En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona el uso de una célula neuronal derivada de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPS) para ensayar una BoNT para actividad.

En la presente memoria se describen realizaciones adicionales.

## Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la expresión del receptor de BoNT en neuronas iPS **A**. Las células iPS fueron maduras durante 4, 7, 10, 14 y 21 días y ensayadas por medio de transferencia Western para niveles de expresión de receptores de BoNT. **B**. Las células iPS fueron maduras durante 5, 10, 15 y 20 días y células de cerebro humanas adultas fueron usadas para llevar a cabo ensayos de PCR cuantitativa.

La figura 2 muestra una comparación de la sensibilidad de BoNT/A1 de neuronas iPS plaqueadas en 7 sustratos diferentes (indicado a la derecha).

La figura 3 muestra la sensibilidad a BoNT/A1 de neuronas iPS y células RSC.

45 La figura 4 muestra la dependencia del tiempo de la detección de la actividad de BoNT/A1 en neuronas iPS.

La figura 5 muestra la tasa de captación de BoNT/A1 de neuronas iPS en comparación con RSC.

La figura 6 muestra la captación de BoNT/A1 dependiente de actividad por neuronas. **A**. Las neuronas iPS y células RSC fueron expuestas a 55 U ó 275 U de BoNT/A1 en medio de estimulación celular durante 1, 5, 10 y 15 minutos, seguido de la eliminación de la toxina e incubación de 24 horas. **B**. Las neuronas iPS fueron expuestas a 55 U de BoNT/A1 en medios de estimulación tanto neuronal como celular durante 1, 5 y 10 minutos. **C**. Las neuronas fueron expuestas a 1,7 – 55 U de BoNT/A1 durante 5 minutos en medio de estimulación celular, lavadas dos veces con medio neuronal e incubadas durante 24 horas.

La figura 7 muestra datos de transferencia Western y densitometría de ensayo de protección de anticuerpos en neuronas iPS. **A**. Las neuronas iPS fueron expuestas a 1,5 U de toxina y anticuerpo durante 24 h. **B**. Las neuronas

iPS fueron expuestas a 55 U de mezcla de toxina-anticuerpo en medio de estimulación de células durante 5 minutos, la mezcla se retiró, las células se lavaron dos veces y se incubaron durante 24 h.

La figura 8 muestra la sensibilidad de neuronas iPS a complejo BoNT/A y BoNT/A purificada. **A.** Gel de SDS-PAGE que compara BoNT/A1 purificada y complejo de BoNT/A1 (escalera de Invitrogen: SeeBlue® Plus2 Estándar Pre-Teñido). **B.** La sensibilidad de neuronas iPS a toxina purificada BoNT/A1 y complejo BoNT/A1 después de 48 h de exposición a toxina.

La figura 9 muestra la detección de la actividad de BoNT/B, C y E en neuronas iPS. Las neuronas iPS maduraron durante 7 días y las células RSC fueron expuestas a diluciones en serie de BoNT/B (A)/C (B) y /E(C) durante 48 h en paralelo.

## 10 Definiciones

Para facilitar un entendimiento de la presente invención, se definen a continuación un número de términos y expresiones:

Según se usa en la presente memoria, el término “célula huésped” se refiere a cualquier célula eucariótica o procarionótica (por ejemplo, células de mamífero, células de ave, células de anfibio, células vegetales, células de pez y células de insecto) ubicada ya sea *in vitro* o *in vivo*.

Según se usa en la presente memoria, el término “cultivo de células” se refiere a cualquier cultivo de células *in vitro*. Dentro de este término se incluyen las líneas de células continuas (por ejemplo, con un fenotipo inmortal), cultivos de células primarias, líneas de células finitas (por ejemplo, células no transformadas), y cualquier otra población celular mantenida *in vitro*, incluyendo oocitos y embriones.

Según se usa en la presente memoria, el término “tóxico” se refiere a cualquier efecto dañino o perjudicial en una célula o tejido en comparación con la misma célula o tejido antes de la administración del tóxico.

Según se usa en la presente memoria, el término “composición farmacéutica” se refiere a la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, haciendo a la composición especialmente adecuada para uso de diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Según se usa en la presente memoria, el término “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándares, tal como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones (por ejemplo, tal como emulsiones de aceite/agua o agua/aceite), y varios tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizadores y conservadores. Para ejemplos de vehículos, estabilizadores y adyuvantes. (Véase, por ejemplo, Martin, Remington’s Pharmaceutical Sciences, 15<sup>a</sup> Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975]).

Según se usan en la presente memoria, los términos “detectar”, “detectando” o “detección” pueden describir ya sea el acto general de descubrir o discernir o la observación específica de una composición marcada de forma detectable.

Según se usa en la presente memoria, el término “purificado” o “purificar” se refiere a la eliminación de componentes (por ejemplo, contaminantes) de una muestra. Por ejemplo, los anticuerpos son purificados por la eliminación de proteínas no de inmunoglobulina contaminantes; también son purificados por la eliminación de inmunoglobulina que no se une a la molécula diana. La eliminación de proteínas no de inmunoglobulina y/o la eliminación de inmunoglobulinas que no se unen a la molécula diana se traduce en un incremento en el porcentaje de inmunoglobulinas reactivas con la diana en la muestra. En otro ejemplo, polipéptidos recombinantes son expresados en células huésped bacterianas y los polipéptidos se purifican por la eliminación de proteínas de células huésped; el porcentaje de polipéptidos recombinantes se incrementa de esta manera en la muestra.

Según se usa en la presente memoria, el término “muestra” se usa en su sentido más amplio. En un sentido, pretende incluir un espécimen o cultivo obtenido de cualquier fuente, así como muestras biológicas y ambientales. Las muestras biológicas pueden obtenerse de animales (incluyendo seres humanos) y abarcan fluidos, sólidos, tejidos y gases. Las muestras biológicas incluyen células, tejidos, productos de la sangre tales como plasma, suero y similares. Tales ejemplos sin embargo no deben considerarse como limitativos de los tipos de muestra aplicables a la presente invención. En algunas realizaciones, la muestra puede ser también una muestra de una preparación que comprenda BoNT biológicamente activa, tal como una preparación de BoNT que se aplicará para efectos farmacéuticos o cosméticos. Además, en un aspecto de la descripción, la muestra también puede ser una muestra ambiental o una muestra de alimento que se sospecha que comprende BoNT.

## Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a métodos para la detección y análisis de neurotoxina de *Clostridium botulinum* (BoNT). En particular, la presente invención se refiere al uso de células derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPS) para la detección y análisis de dicho agente.

Las realizaciones de la presente invención proporcionan métodos para la detección y análisis de BoNT. Los ensayos utilizan neuronas derivadas de iPS humanas como una plataforma altamente sensible y reproducible para la detección de neurotoxina botulínica (BoNT). En algunas realizaciones, las neuronas son una población neuronal general 98% pura de neuronas GABAérgicas, dopaminérgicas y glutamatérgicas, y se producen y crioconservan como células diferenciadas. En otro aspecto, las neuronas son una población neuronal general esencialmente pura de neuronas GABAérgicas, dopaminérgicas y glutamatérgicas y se producen y crioconservan como células diferenciadas, en donde las células son al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 96% puras con respecto a las células neuronales. Los experimentos llevados a cabo durante el curso del desarrollo de realizaciones de la presente invención demostraron que las células expresan todos los receptores y substratos necesarios para intoxicación por BoNT por todos los serotipos de BoNT. Los ensayos de detección de BoNT demuestran que las neuronas derivadas de iPS son altamente sensibles para la detección cuantitativa de BoNT/A, B, C y E y anticuerpos neutralizantes.

En noviembre de 2007, dos grupos independientes mostraron por primera vez que células de fibroblastos humanos pueden ser reprogramadas a células madre pluripotentes simplemente mediante la activación de un pequeño conjunto de genes silenciados (Takahashi K, *et al* (2007) *Cell* 131:861-872; Yu J, *et al* (2007) *Science* 318: 1917-1920). Estas células fueron llamadas células madre pluripotentes inducidas y pueden ser mantenidas y crioconservadas de forma similar a líneas de células. Este descubrimiento abre la oportunidad para el desarrollo de un vasto número de modelos de células derivados de iPS humanas que se asemejan a células somáticas humanas diferenciadas completamente funcionales y no requieren el uso de ningún animal.

Al seleccionar células iPS para usarse en los métodos descritos en la presente memoria, se prefiere que las células puedan ser producidas de manera fiable y reproducible y generen poblaciones puras de células diferenciadas en cantidades suficientes para tales estudios. En algunas realizaciones, estas células están disponibles en Cellular Dynamics Inc. (Madison, WI).

Los experimentos llevados a cabo durante el curso del desarrollo de realizaciones de la presente invención demostraron que las neuronas derivadas de iPS humanas son un modelo de célula altamente sensible, selectivo y específico de especie para la detección de las neurotoxinas botulínicas, anticuerpos neutralizantes e inhibidores, y para los estudios de la entrada y transporte celulares de BoNT. Estas neuronas son adecuadas para reemplazar el MBA para la determinación de la potencia de BoNT así como para la detección de anticuerpos, cribado de inhibidores y aplicaciones de investigación.

### I. Células

Según se describe en la presente memoria, las realizaciones de la presente invención proporcionan células madre derivadas de pluripotentes humanas para usarse en la detección y análisis de BoNT. Los métodos para generar células iPS se describen, por ejemplo, en Yu et al., *Science*, 8 de mayo 2009; 324(5928); 797-801. Epub 2009, WO2011056971 y WO2011025852. En algunas realizaciones, las células iPS son diferenciadas en neuronas usando métodos adecuados (por ejemplo, aquellos descritos en las Solicitudes de Patente U.S. US2010/0279403 y US2010/0216181).

En algunas realizaciones, las neuronas son una población neuronal general 98% pura de neuronas GABAérgicas, dopaminérgicas y glutamatérgicas y se producen y crioconservan como células diferenciadas. En algunas realizaciones, se utilizan células iPS derivadas neuronalmente disponibles comercialmente (por ejemplo, aquellas disponibles de Cellular Dynamics Inc. (Madison, WI) o GlobalStem, (Rockville, MD)), aunque se pueden utilizar otras fuentes. En algunas realizaciones, las células son células hiPS neuronales.

En otro aspecto, las células son las neuronas son una población neuronal general esencialmente pura de neuronas GABAérgicas, dopaminérgicas y glutamatérgicas y se producen y crioconservan como células diferenciadas, en donde las células son al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 96% puras con respecto a las células neuronales.

En un aspecto de la invención, la célula neuronal derivada de células hiPS se puede obtener o ha sido obtenida por diferenciación y/o maduración de una célula hiPS generada por un proceso como el mencionado arriba en una célula neuronal. Esta diferenciación de células neuronales, en un aspecto, se puede lograr por el cultivo de las células hiPS a aproximadamente 37°C y bajo aproximadamente 5% de CO<sub>2</sub>. En un aspecto, el medio de cultivo puede ser medio Neurobasal suplementado con B27 y glutamax (Invitrogen, Inc., EEUU). En otro aspecto más, las células se cultivan en placas recubiertas con poli-lisina y, en otro aspecto más, las placas se recubren además con matrigel (BD Bioscience, EEUU). En un aspecto, se usa una placa de 96 pocillos para cultivo en donde las células se crecen a una densidad de aproximadamente 40.000 células por pocillo. En un aspecto, las células se dejan sembrar durante aproximadamente de 24 horas. Posteriormente, en un aspecto se deja que las células maduren durante aproximadamente 2 a alrededor de 28 días, en un aspecto, aproximadamente 4 a aproximadamente 14 o, en un aspecto, aproximadamente 4 a aproximadamente 7 días.

En un aspecto, dichas células neuronales derivadas de células hiPS se obtienen por un proceso de diferenciación y maduración esencialmente como el descrito en los Ejemplos adjuntos, más adelante.

Las realizaciones de la presente invención también se refieren a una célula neuronal derivada de células hiPS obtenida por el proceso de diferenciación y maduración mencionado anteriormente.

5 En un aspecto, dicha célula neuronal derivada de células hiPS se caracteriza por la presencia de uno o más y, en un aspecto todos, de los siguientes marcadores:  $\beta$ 3-tubulina, NeuN, vGAT, vGLUT2, (NSE enolasa específica de neuronas) o Tbr1 (factor 1 de transcripción de dominio T). Para  $\beta$ 3-tubulina o NeuN se contempla que el número de células positivas en un cultivo de la célula neuronal derivada de células hiPS de la invención sea de aproximadamente 99%. Para vGAT o vGLUT2 se contempla en un aspecto que al menos una parte de las células del cultivo sean positivas para dichos marcadores.

10 En un aspecto, la célula neuronal derivada de células hiPS se caracteriza por la ausencia de uno o más y, en un aspecto todos, de los siguientes marcadores: GFAP, TH, NNE (enolasa no neuronal), Tbr2 (factor 2 de transcripción de dominio T), o NoGo a, C. Para GFAP se contempla que el número de células positivas en un cultivo de la célula neuronal derivada de células hiPS sea significativamente bajo, y, en un aspecto, por debajo de aproximadamente el 5% o incluso por debajo de aproximadamente el 1%, para los marcadores restantes se contempla en un aspecto que estén, si lo están, presentes por debajo de una cantidad detectable.

15 La presencia o ausencia o la cantidad de los marcadores mencionados anteriormente puede, en un aspecto, determinarse por técnicas inmunológicas convencionales. Por ejemplo, los marcadores pueden determinarse por técnicas de tinción inmunohistológica, análisis de transferencia Western de lisados de células o, en lo que refiere a  $\beta$ 3-tubulina o NeuN por análisis FACS. Las técnicas de detección adicionales están descritas (véase, por ejemplo, US2012/0178083, US2008/0280301, Englund 2005, J Neurosci 25: 247-251; Dupuis 2002, Neurobiology of Diseases 20 10: 358-365).

25 En un aspecto más, la célula neuronal derivada de células hiPS se caracteriza por al menos una y, en un aspecto todas, las siguientes propiedades electrofisiológicas: inhibición de canales de  $\text{Na}^{2+}$  por tetrodotoxina (TTX), inhibición de canales de  $\text{K}^{+}$  por tetraetilamonio, inhibición de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L por nifedipino, inhibición de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q por w-agatoxina IVA o inhibición de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N por w-conotoxina GVIA. Estas propiedades electrofisiológicas pueden probarse por mediciones electrofisiológicas estándares incluyendo, por ejemplo, mediciones de registro zonal antes y después de tratamiento de las células con los inhibidores respectivos.

30 En otro aspecto, la célula neuronal derivada de células hiPS se caracteriza por sensibilidad a BoNT y, en un aspecto, BoNT/A. Además, las células, en un aspecto, también son sensibles a otros compuestos neurotóxicos de una manera dependiente de dosis y, en particular, a por lo menos uno o todos los siguientes compuestos: estaurosporina, inhibidor de quinasa competitivo con ATP, cloropromazina o fenotiazina. La sensibilidad hacia los compuestos mencionados anteriormente puede determinarse en, por ejemplo, ensayos de viabilidad celular.

En un aspecto, las células neuronales derivadas de células hiPS también son sensibles con respecto a crecimiento de neuritas para por lo menos uno y, en un aspecto todos, de los siguientes compuestos: antimicina A, mitomicina C, MK571, PD98092 o estaurosporina.

35 Además, en un aspecto, las células neuronales derivadas de células hiPS son sensibles con respecto a pérdida de potencial de membrana mitocondrial para por lo menos uno o, en un aspecto, todos los siguientes compuestos: antimicina A o valinomicina.

## II. Ensayos y usos

40 Las realizaciones de la presente invención proporcionan métodos para ensayar BoNT. Los ensayos encuentran uso en aplicaciones de investigación, clínicas, de diagnóstico y terapéuticas.

Los ensayos utilizan células neuronales derivadas de hiPS. El uso de células humanas proporciona la ventaja de un modelo específico de especie. Además, las neuronas derivadas de células pluripotentes son representativas de neuronas sanas y normales a diferencia de neuronas derivadas de líneas de células cancerosas o líneas de células modificadas, las cuales pueden no reflejar las neuronas somáticas.

45 En algunas realizaciones, los ensayos utilizan células neuronales, es decir, células neuronales derivadas de hiPS para cribar la potencia de BoNT. En otras realizaciones, los ensayos criban la toxicidad de BoNT. En otras realizaciones más, los ensayos criban la presencia de o propiedades de anticuerpos neutralizantes para BoNT u otros biofarmacéuticos para actividad. En algunas realizaciones, los ensayos son cuantitativos, mientras que en otras son cualitativos.

50 En algunas realizaciones, las células se cultivan primero en una matriz adecuada. En algunas realizaciones, las células se cultivan para poder obtener maduración de neuronas. Las células pluripotentes usadas en realizaciones de la presente invención proporcionan la ventaja de una maduración más rápida que las células usadas en ensayos existentes. En algunas realizaciones, las células son después expuestas a toxina (BoNT) durante un periodo de tiempo adecuado. Después de la exposición a toxinas, se calculan parámetros deseados (por ejemplo, CE50) usando métodos adecuados. Los ensayos descritos en la presente memoria son adecuados para la detección tanto 55 de BoNT purificada como BoNT en complejos (por ejemplo, en complejo con otras proteínas como se encuentra en

entornos nativos y algunas preparaciones farmacéuticas). Los ensayos descritos en la presente memoria son adecuados para la detección de cualquier número de serotipos de BoNT (por ejemplo, BoNT/A, B, C, D, E, F y G) o variantes o quimeras de los mismos. En algunas realizaciones, las BoNT se expresan recombinantemente. En otras realizaciones, se purifican de células bacterianas.

- 5 En algunas realizaciones, se llevan a cabo ensayos de protección de anticuerpos para probar anticuerpos neutralizantes. Aunque las BoNT se usan efectivamente en el tratamiento de un gran número de pacientes para varias afecciones (revisado en Dhaked et al., *Indian J Med Res* 132:489-503), algunos desarrollarán anticuerpos neutralizantes, los cuales evitarán el éxito de tratamientos adicionales. Por ejemplo, se estima en el tratamiento de distonias cervicales que ~5% de los pacientes tratados desarrollarán anticuerpos BoNT neutralizantes que impedirán el tratamiento adicional (Kessler et al., (1999) *J Neurol* 246: 265-274). Actualmente, los pacientes no son monitorizados durante el curso de sus tratamientos para el desarrollo de anticuerpos neutralizantes debido a que no está disponible comercialmente un ensayo altamente sensible y cuantitativo (Sesardic et al., (2004) *Mov Disord* 19 Supl 8: S85-91). La plataforma de ensayo presentada aquí que usa neuronas iPS proporciona una detección sensible y cuantitativa de anticuerpos neutralizantes de BoNT en los sueros de pacientes que han recibido inyecciones terapéuticas o cosméticas repetidas de BoNT. Los anticuerpos neutralizantes pueden detectarse en cualquier número de tipos de muestras (por ejemplo, anticuerpos purificados, suero, antitoxinas, etc.).

En algunas realizaciones, se ensayan inhibidores de molécula pequeña de BoNT (por ejemplo, para investigación o cribado de fármacos). Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células se exponen ya sea a la BoNT primero, luego al inhibidor, se co-exponen a ambos, o las células se exponen al inhibidor primero, luego a BoNT.

- 20 Cualquier número de mediciones de punto final adecuadas pueden utilizarse para ensayar la actividad de BoNT. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, transferencia Western, liberación de neurotransmisores, ELISA (Nuss JE, et al (2010) *J Biomol Screen* 15:42-51) o informadores expresados intracelularmente tales como, por ejemplo, sensores FRET (Dong et al, (2004) *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 14701-14706).

- 25 En algunas realizaciones, los ensayos descritos en la presente memoria encuentran uso en el ensayo de controles de calidad durante la producción de BoNT o derivados como fármacos o para uso en investigación, en la evaluación de diagnóstico, en la optimización y dosificación de tratamiento clínico y en la selección de modalidad terapéutica.

Las aplicaciones adicionales de los ensayos descritos en la presente memoria incluyen, pero no están limitadas a, detección de inhibidores y usos de diagnóstico, clínicos, crinado e investigación.

- 30 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para ensayar una neurotoxina de *Clostridium botulinum* (BoNT) para actividad, que comprende: a) poner en contacto una célula neuronal derivada de hiPS con una composición que comprenda una BoNT; y b) ensayar la BoNT para actividad biológica.

- 35 En un aspecto de dicho método, el ensayo puede comprender determinar la presencia o ausencia de actividad biológica de BoNT. Este ensayo algunas veces puede ser referido en la presente memoria como ensayo cualitativo. Se entenderá que con base en la presencia o ausencia de actividad biológica de BoNT, puede concluirse sobre la presencia o ausencia de BoNT biológicamente activa en una composición que comprenda o se sospecha que comprende dicha BoNT biológicamente activa. Además, en otro aspecto más, el ensayo puede abarcar determinar la cantidad de BoNT biológicamente activa en una composición que comprenda BoNT biológicamente activa. Se entenderá que la cantidad de BoNT biológicamente activa puede derivarse de la cantidad de actividad biológica ensayada para dicha BoNT en la composición. Este ensayo algunas veces puede referirse también como un ensayo cuantitativo en la presente memoria.

- 40 En un aspecto del método de la presente invención, la BoNT es una neurotoxina seleccionada de los diferentes grupos de serotipos para neurotoxinas clostridiales, por ejemplo, se selecciona de, por ejemplo, BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F o BoNT/G.

- 45 Las bacterias *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani* producen naturalmente estas neurotoxinas altamente potentes, por ejemplo, toxinas botulínicas (BoNT) y toxina de tétanos (TeNT), respectivamente. Estas neurotoxinas se unen específicamente a células neuronales e interrumpen la liberación de neurotransmisores. Cada toxina es sintetizada como una proteína de cadena única inactiva de aproximadamente 150 kDa. El procesamiento posterior a la traducción implica la formación de puentes disulfuro y proteólisis limitada (mellado) por proteasa o proteasas bacterianas. La neurotoxina de cadena doble activa consiste en dos cadenas, una cadena ligera N-terminal de aprox. 50 kDa y una cadena pesada de aprox. 100 kDa unidas por un enlace disulfuro. Las neurotoxinas consisten estructuralmente en tres dominios, por ejemplo, la cadena ligera catalítica, la cadena pesada que abarca el dominio de translocación (mitad N-terminal) y el dominio de unión a receptor (mitad C-terminal), véase, por ejemplo, Krieglstein 1990, *Eur J Biochem* 188, 39; Krieglstein 1991, *Eur J Biochem* 202, 41; Krieglstein 1994, *J Protein Chem* 13, 49. Las estructuras de los polipéptidos BoNT y polipéptido TeNT han sido descritas en las referencias mencionadas anteriormente.

- 55 Los siete serotipos antigénicamente distintos de las BoNT y TeNT son endoproteasas  $Zn^{2+}$  que bloquean la exocitosis sináptica al escindir proteínas SNARE. Las neurotoxinas causan la parálisis muscular flácida vista en los trastornos de botulismo y tétanos, véase Fischer 2007, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 104, 10447.



En otro aspecto más, la actividad de una BoNT modificada se puede ensayar en el método de la invención. Esta BoNT modificada puede derivarse de BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F o BoNT/G mencionadas anteriormente al introducir al menos una sustitución, adición y/o deleción en la secuencia de aminoácidos de la BoNT. Esta BoNT modificada, entonces, puede tener una secuencia de aminoácidos que sea al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las BoNT referidas anteriormente. El término "idéntica" según se usa en la presente memoria se refiere a identidad de secuencia caracterizada al determinar el número de aminoácidos idénticos entre dos secuencias de aminoácidos en donde las secuencias se alinean de tal manera que se obtenga la coincidencia de más alto orden. Puede calcularse usando técnicas o métodos publicados codificados en programas de computadora tales como, por ejemplo, BLASTP o FASTA (Altschul 1990, J Mol Biol 215, 403). Los valores de porcentaje de identidad se calculan, en un aspecto, sobre la secuencia de aminoácidos completa. Está disponible para el experto en la técnica una serie de programas a base de una variedad de algoritmos para la comparación de secuencias diferentes. En este contexto, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman dan resultados particularmente fiables. Para llevar a cabo las alineaciones de secuencia, pueden usarse el programa PileUp (Higgins 1989, CABIOS 5, 151) o los programas Gap y BestFit (Needleman 1970, J Mol Biol 48; 443; Smith 1981, Adv Appl Math 2, 482), los cuales son parte del paquete de software GCG (Genetics Computer Group 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EEUU 53711). Los valores de identidad de secuencia descritos arriba en porcentaje (%) se deben determinar, en otro aspecto de la invención, usando el programa GAP sobre la región de secuencia completa con los siguientes ajustes: ponderación de hueco: 50, ponderación de longitud: 3, promedio de coincidencia: 10.000 y promedio de no coincidencia: 0.000, los cuales, a menos que se especifique lo contrario, siempre se usarán como ajustes estándares para alineaciones de secuencias.

En un aspecto, cada uno de los polipéptidos de BoNT modificados mencionados anteriormente conserva una o más y, en otro aspecto, todas las propiedades biológicas del polipéptido no modificado respectivo, es decir, el BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, o BoNT/G. Los expertos en la técnica apreciarán que la actividad biológica completa se mantiene después de activación proteolítica, incluso a pesar de que sea concebible que el precursor no procesado pueda ejercer ciertas funciones biológicas o ser parcialmente activo. "Propiedades biológicas" según se usa en la presente memoria se refiere a (a) unión a receptor, (b) internalización, (c) translocación a través de la membrana endosómica en el citosol, y/o (d) escisión endoproteolítica de proteínas implicadas en la fusión de membranas de vesículas sinápticas. Los ensayos *in vivo* para evaluar la actividad biológica incluyen el ensayo de DL50 de ratón y el ensayo de hemidiafragma de ratón *ex vivo* como se describe por, por ejemplo, Dressler et al. (Dressler 2005, Mov Disord 20:1617-1619, Keller 2006, Neuroscience 139:629-637). La actividad biológica se expresa comúnmente en unidades de ratón (MU). Según se usa en la presente memoria, 1 MU es la cantidad de componente neurotóxico que mata al 50% de una población de ratones específica después de inyección intraperitoneal, es decir, la DL50 i.p. de ratón. En un aspecto más, los polipéptidos modificados pueden tener propiedades biológicas mejoradas o alteradas, por ejemplo, pueden comprender sitios de escisión que sean mejorados para el reconocimiento de enzimas o pueden mejorarse para unión a receptor o cualquier otra propiedad especificada anteriormente.

En un aspecto, las BoNT modificadas pueden ensayarse para una o más y, en un aspecto, todas las actividades biológicas referidas anteriormente por el método descrito en la presente memoria.

En un aspecto de la invención, una BoNT modificada se selecciona de, por ejemplo, BoNT o híbridos BoNT/TeNT, BoNT redirigidas, y BoNT quiméricas. Se describen BoNT modificadas.

En un aspecto del método de la invención, poner en contacto comprende poner al menos dos componentes diferentes en proximidad física para permitir así la interacción física y/o química de dichos componentes. En el método mencionado anteriormente, la célula neuronal derivada de hiPS se pone en contacto con una composición que comprende o se sospecha que comprende BoNT biológicamente activa. La puesta en contacto se lleva a cabo durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que la BoNT biológicamente activa comprendida en la composición ejerza su actividad biológica en la célula neuronal derivada de células hiPS. En un aspecto, así, la puesta en contacto permitirá (a) unión a receptor, (b) internalización, (c) translocación a través de la membrana endosómica dentro del citosol, y/o (d) escisión endoproteolítica de proteínas implicadas en la fusión de membrana de vesícula sináptica o substratos que mimetizan dicho proceso en la célula neuronal derivada de células hiPS. El experto en la técnica es consciente de qué condiciones tienen que ser aplicadas para un cultivo dado de células neuronales derivadas de células hiPS. La puesta en contacto puede, en un aspecto, ser llevada a cabo en un sistema de cultivo de células en el que las células neuronales derivadas de células hiPS se cultiven en placas de pocillos en un medio de cultivo adecuado y bajo condiciones de cultivo adecuadas mediante la adición al medio de cultivo de una muestra de la composición que se va a ensayar para actividad BoNT por los métodos descritos en la presente memoria.

En un aspecto, las condiciones de cultivo adecuadas comprenden cultivo a aproximadamente 37°C y bajo alrededor de 5% de CO<sub>2</sub>. En un aspecto, el medio de cultivo es medio Neurobasal complementado con B27 y glutamax (Invitrogen, Inc., EEUU). En otro aspecto más, las células neuronales derivadas de células hiPS se cultivan en placas recubiertas con poli-lisina y, en un aspecto adicional más, se usan placas que además están recubiertas con matrigel (BD Bioscience, EEUU). En un aspecto, se usa una placa de 96 pocillos para el cultivo, en donde las células

se crecen a una densidad de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 100.000 células, en un aspecto adicional aproximadamente 20.000 a aproximadamente 60.000 células y en otro aspecto más aproximadamente 40.000 células por pocillo. En un aspecto, las células se dejan sembrar durante aproximadamente 24 horas. En un aspecto, posteriormente, las células se dejan madurar durante aproximadamente 2 a aproximadamente 28 días, en un aspecto, aproximadamente 4 a aproximadamente 14 o, en un aspecto, aproximadamente 4 a aproximadamente 7 días antes de que se lleve a cabo la puesta en contacto.

En un aspecto más, dicha puesta en contacto se lleva a cabo como se describe en los Ejemplos adjuntos, más adelante.

En un aspecto del método de la presente invención, la composición que comprende BoNT biológicamente activa es una composición que se sabe que comprende BoNT biológicamente activa o una composición que se sospecha que comprende BoNT biológicamente activa. La composición puede comprender otros ingredientes además de dicha BoNT biológicamente activa tales como, por ejemplo, un solvente adecuado y/o agentes estabilizadores tales como proteínas y, en un aspecto, las proteínas formadoras de complejo con las BoNT (HA70, HA17, HA33 o NTNH (NBP)), u otros estabilizadores de proteínas. La composición también puede comprender además proteínas que faciliten la actividad biológica de la BoNT, por ejemplo, al incrementar cualquiera de las actividades biológicas de las BoNT mencionadas en cualquier lugar de la presente memoria. En un aspecto más, la composición puede comprender más de una BoNT.

En un aspecto, la composición es un lisado celular de *Botulinum* u otras células bacterianas o células no bacterianas que comprendan la BoNT biológicamente activa. En un aspecto, dicha composición es también una preparación de BoNT obtenida a partir de dicho lisado celular por purificación parcial, por ejemplo, un extracto crudo, o purificación de la BoNT, por ejemplo, una preparación de BoNT purificada. En otro aspecto, la composición es una composición artificial que comprende componentes mezclados. En un aspecto más, la composición es una preparación que se usará como composición farmacéutica como se define en otro lugar de la presente memoria.

En un aspecto del método de la presente invención, el ensayo de la BoNT para actividad biológica se lleva a cabo al determinar la escisión endoproteolítica de proteínas implicadas en fusión de membrana de vesícula sináptica u otros sustratos que sean escindidos por la BoNT biológicamente activa, si están presentes, en la célula neuronal derivada de células hiPS.

En algunas realizaciones, las proteínas implicadas en la fusión de membranas de vesículas sinápticas u otros sustratos tienen un sitio de escisión de neurotoxinas reconocido por la BoNT que se va a ensayar. Un sitio de escisión de neurotoxinas según se usa en la presente memoria se refiere a un sitio de escisión que es reconocido y escindido por la proteasa endógena de un polipéptido de neurotoxina. Los sitios de escisión que son reconocidos por las proteasas de neurotoxinas están descritos (véase, por ejemplo, EP 1 926 744 B1). En principio, un sitio de escisión de neurotoxina puede ser un sitio de escisión que está presente naturalmente en un sustrato o que es un sitio de escisión diseñado artificialmente reconocido y escindido por la proteasa de polipéptidos de neurotoxina.

Un sitio de escisión de neurotoxina reconocido y escindido por la proteasa BoNT/A, en un aspecto de la invención, se deriva de una proteína que es sensible a escisión por BoNT/A. En un aspecto, dicha proteína es SNAP25A o B humana o un homólogo, parálogo u ortólogo de la misma de rata, ratón, bovino, *Danio*, *Carassius*, *Xenopus*, *Torpedo*, *Strongylocentrotus*, *Loligo*, *Lymnaea* o *Aplysia*. Los sitios de escisión adecuados derivados de dichas proteínas se describen en EP 1 926 744 B1.

Un sitio de escisión de neurotoxina reconocido y escindido por la proteasa BoNT/B, en un aspecto de la invención, se deriva de una proteína que es sensible a escisión por BoNT/B. En un aspecto, dicha proteína es VAMP-1, VAMP-2 y VAMP-3/celubrevina humana o de ratón, VAMP-2 de bovino, VAMP-2 o VAMP-3 de rata, VAMP-1, VAMP-2 o VAMP-3 de pollo, VAMP-1 de *Torpedo*, VAMP de *Strongylocentrotus*, *sybA*, *synB*, *synC*, *synD*, o *syn* de *Drosophila*, VAMP de *Hirudo*, VAMP-2 o VAMP-3 de *Xenopus*, VAMP-1 o VAMP-2 de *Danio*, VAMP de *Loligo*, VAMP de *Lymnaea*, VAMP de *Aplysia* o tipo SNB1 de *Caenorhabditis* o cualquier ortólogo, parálogo u homólogo de los mismos. Los sitios de escisión adecuados derivados de dichas proteínas se describen, por ejemplo, en EP 1 926 744 B1.

Un sitio de escisión de neurotoxina reconocido y escindido por la proteasa BoNT/C1, en un aspecto de la invención, se deriva de una proteína que es sensible a escisión por BoNT/C1. En un aspecto, dicha proteína es Sintaxina 1A, Sintaxina 1B1, Sintaxina 2-1, Sintaxina 2-2, Sintaxina 2-3, Sintaxina 3A o Sintaxina 1B2 humana y de ratón, Sintaxina 1A, Sintaxina 1B1 o Sintaxina 1B2 de bovino o rata, Sintaxina 2 de rata o Sintaxina 3 de rata, Sintaxina 1A, Sintaxina 1B1, Sintaxina 1B2, Sintaxina 2, Sintaxina 3A, Sintaxina 3B o Sintaxina 3C de ratón, Sintaxina 1A o Sintaxina 2 de pollo; Sintaxina 1A o Sintaxina 1B de *Xenopus*, Sintaxina 1A, Sintaxina 1B o Sintaxina 3 de *Danio*, Sintaxina 1A o Sintaxina 1B de *Torpedo*, Sintaxina 1A o Sintaxina 1B de *Strongylocentrotus*, Sintaxina 1A o Sintaxina 1B de *Drosophila*, Sintaxina 1A o Sintaxina 1B de *Hirudo*, Sintaxina 1A o Sintaxina 1B de *Loligo*, Sintaxina 1A o Sintaxina 1B de *Lymnaea* o cualquier ortólogo, parálogo u homólogo de las mismas. Los sitios de escisión adecuados derivados de las proteínas se describen, por ejemplo, en EP 1 926 744 B1.

Un sitio de escisión de neurotoxina reconocido y escindido por la proteasa BoNT/D, en un aspecto de la invención, se deriva de una proteína que es sensible a escisión por BoNT/D. En un aspecto, dicha proteína es VAMP-1, VAMP-

2 y VAMP-3/celubrevina humana o de ratón, VAMP-2 de bovino, VAMP-2 o VAMP-3 de rata, VAMP-1, VAMP-2 o VAMP-3 de pollo, VAMP-1 de Torpedo, VAMP de *Strongylocentrotus*, sybA, synB, synC, synD o syn de *Drosophila*, VAMP de Hirudo, VAMP-2 o VAMP-3 de *Xenopus*, VAMP-1 o VAMP-2 de Danio, VAMP de Loligo, VAMP de *Lymnaea*, VAMP de *Aplisia* o tipo SNB1 de *Caenorhabditis* o cualquier ortólogo, parólogo u homólogo de las mismas. Los sitios de escisión adecuados derivados de las proteínas se describen, por ejemplo, en EP 1 926 744 B1.

Un sitio de escisión de neurotoxina reconocido y escindido por la proteasa BoNT/E, en un aspecto de la invención, se derivan de una proteína que es sensible a escisión por BoNT/E. En un aspecto, dicha proteína es, SNAP-25A o B humana o un homólogo, parólogo u ortólogo de la misma de rata, ratón, bovino, Danio, *Carassius*, *Xenopus*, Torpedo, *Strongylocentrotus*, Loligo, *Lymnaea* o *Aplisia*. Los sitios de escisión adecuados derivados de las proteínas se describen, por ejemplo, en EP 1 926 744 B1.

Un sitio de escisión de neurotoxina reconocido y escindido por la proteasa BoNT/F, en un aspecto de la invención, se deriva de una proteína que es sensible a escisión por BoNT/F. En un aspecto, dicha proteína es, VAMP-1, VAMP-2 y VAMP-3/celubrevina humana o de ratón, VAMP-2 de bovino, VAMP-2 o VAMP-3 de rata, VAMP-1, VAMP-2 o VAMP-3 de pollo, VAMP-1 de Torpedo, VAMP de *Strongylocentrotus*, sybA, synB, synC, synD o syn de *Drosophila*, VAMP de Hirudo, VAMP-2 o VAMP-3 de *Xenopus*, VAMP-1 o VAMP-2 de Danio, VAMP de Loligo, VAMP de *Lymnaea*, VAMP de *Aplisia* o tipo SNB1 de *Caenorhabditis* o cualquier ortólogo, parólogo u homólogo de las mismas. Los sitios de escisión adecuados derivados de las proteínas se describen, por ejemplo, en EP 1 926 744 B1.

Un sitio de escisión de neurotoxina reconocido y escindido por la proteasa BoNT/G, en un aspecto de la invención, se deriva de una proteína que es sensible a escisión por BoNT/G. En un aspecto, dicha proteína es, VAMP-1, VAMP-2 y VAMP-3/celubrevina humana o de ratón, VAMP-2 de bovino, VAMP-2 o VAMP-3 de rata, VAMP-1, VAMP-2 o VAMP-3 de pollo, VAMP-1 de Torpedo, VAMP de *Strongylocentrotus*, sybA, synB, synC, synD o syn de *Drosophila*, VAMP de Hirudo, VAMP-2 o VAMP-3 de *Xenopus*, VAMP-1 o VAMP-2 de Danio, VAMP de Loligo, VAMP de *Lymnaea*, VAMP de *Aplisia* o tipo SNB1 de *Caenorhabditis* o cualquier ortólogo, parólogo u homólogo de las mismas. Los sitios de escisión adecuados derivados de las proteínas se describen, por ejemplo, en EP 1 926 744 B1.

Un sitio de escisión de neurotoxina reconocido y escindido por las proteasas de BoNT, en otro aspecto de la invención, se deriva de los sitios de escisión auto-catalíticos encontrados en las proteínas BoNT. En aspectos, un sitio de escisión de neurotoxina que se usará de acuerdo con la presente invención y que se deriva del sitio de escisión auto-catalítico de una BoNT o TeNT dada comprende al menos 6, al menos 8, al menos 10 o al menos 15 residuos consecutivos de incluyendo los residuos 250Tyr-251Tyr de BoNT/A, los residuos 256Phe-257Phe de BoNT/B, los residuos 257Phe-258Tyr de BoNT/C1, los residuos 257Phe-258Phe de BoNT/D, los residuos 239Pro-240Leu de BoNT/E, los residuos 254Pro-255Leu de BoNT/F, los residuos 256Phe-257Phe de BoNT/G, los residuos 259Ile-260Tyr de TeNT, los residuos Phe266-Gly267 de BoNT/A, los residuos Phe272-Gly273 de BoNT/B, los residuos Phe273-Gly274 de BoNT/C1, los residuos Phe273-Gly274 de BoNT/D, los residuos Phe255-Gly256 de BoNT/E, los residuos Phe270-Gly271 de BoNT/F, los residuos Phe272-Gly273 de BoNT/G o los residuos Phe275-Gly276 de TeNT. Los sitios de escisión adecuados derivados de las proteínas se describen, por ejemplo en EP 1 926 744 B1.

En un aspecto de la presente invención, la escisión de los sitios de escisión de neurotoxina mencionados anteriormente para las BoNT se puede ensayar al determinar uno o más productos de escisión obtenidos por la escisión de las proteínas mencionadas anteriormente. Los productos derivados de las proteínas pueden determinarse por anticuerpos que se unan específicamente a dichos productos escindidos, pero no a las proteínas no escindidas. La unión de dichos anticuerpos de unión específica a los productos puede determinarse por técnicas descritas en la presente o en cualquier lado. Por ejemplo, los anticuerpos de unión específica pueden ser unidos covalente o no covalentemente a un marcador detectable. Dicho marcador detectable puede ser un resto detectable unido covalentemente al anticuerpo de unión específica o puede ser un agente de detección, tal como un anticuerpo de detección o aptámero que se una específicamente al anticuerpo de unión específica y permita la detección, por ejemplo, por medio de un esto detectable unido covalentemente al mismo. Varios tipos de estos inmunoensayos pueden usarse de esta manera para determinar los productos escindidos y, de esta forma, para ensayar la actividad biológica de una BoNT.

En un aspecto, la escisión de proteínas que tienen un sitio de escisión de neurotoxina como las definidas en la presente memoria puede determinarse por Transferencia Western. En otro aspecto, dicha escisión puede determinarse por ELISA, RIA u otros formatos de ensayo inmunológico incluyendo aquellos mencionados en cualquier lado en la presente memoria.

En otro aspecto, puede usarse un substrato artificial que comprenda un sitio de escisión de neurotoxina como el especificado arriba y el cual después de la escisión en dicho sitio se altere en por lo menos una propiedad física y/o química. Por ejemplo, los substratos contemplados en tal aspecto pueden comprender un primer y un segundo resto capaces de interactuar físicamente y/o químicamente entre sí y ser separados por un enlazador que tenga el sitio de escisión de neurotoxina. Como resultado de la escisión del sitio de escisión, la interacción antes mencionada entre

los dos restos se alterará. Los restos adecuados son, por ejemplo, fluoróforos donadores y aceptores que exhiban transferencia de energía por resonancia en el estado no escindido, siendo interrumpida dicha transferencia de energía por resonancia después de la escisión. Como alternativa, un fluoróforo y un apantallador pueden aplicarse en donde el efecto de apantallamiento del apantallador se invierte después de la escisión. Los substratos de este tipo se describen, por ejemplo, en una cualquiera de EP 1 438 586 B1, EP 2 208 067 A1, EP 1 543 329 A2, EP 1 869 459 B1, EP 2 293 064 B1, EP 1 920 248 B1, EP 2 264 458 A1, EP 2 332 959 A2, WO 2011/47241, EP 1 901 069 B1, EP 2 293 064 B1, EP 1 807 698 B1 o EP 2 107 112 B1.

En otro aspecto específico más del método de la invención, el ensayo se lleva a cabo al determinar la cantidad de SNAP-25 escindida presente en la célula neuronal derivada de células hiPS al determinar la cantidad de SNAP-25 escindida usando un primer anticuerpo y, en un aspecto, un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a dicha SNAP-25 escindida. Más aún, la SNAP-25 total presente en las células, por ejemplo, SNAP-25 escindida y no escindida, se determina por un segundo anticuerpo, y, en un aspecto, un anticuerpo policlonal que se une a dicha SNAP-25 total. En un aspecto, la cantidad de primer anticuerpo unido y la cantidad de segundo anticuerpo unido puede determinarse por un agente de detección, en un aspecto, por uno o más anticuerpos de detección que permitan distinguir entre la cantidad de primer anticuerpo unido y la cantidad de segundo anticuerpo unido. Por ejemplo, puede usarse un primer anticuerpo de detección acoplado a un primer marcador y la unión al primer anticuerpo y un segundo anticuerpo de detección acoplado a un segundo marcador y la unión al segundo anticuerpo unido. La cantidad de primer anticuerpo unido y segundo anticuerpo unido y, de esta manera, la cantidad de SNAP-25 escindida y total se puede derivar subsecuentemente a partir de la cantidad de primero y segundo marcadores determinados. En un aspecto, un primer marcador contemplado en la presente memoria puede ser una enzima tal como peroxidasa de rábano. En otro aspecto, un segundo marcador contemplado en la presente memoria puede ser una enzima tal como una fosfatasa alcalina. Los marcadores pueden usarse para catalizar una conversión detectable de substratos no fluorescentes en productos fluorescentes.

En otro aspecto más del método de la invención, el ensayo se lleva a cabo al determinar liberación de neurotransmisores, por ejemplo, en el medio de cultivo. La cantidad de neurotransmisores liberados o no liberados puede determinarse por técnicas descritas en la presente memoria o en cualquier lado.

Ventajosamente, los métodos contemplados por la presente invención se basan en recursos no animales, por ejemplo, las células neuronales derivadas de células hiPS, y, por lo tanto, se evitan ensayos con animales. Las células neuronales derivadas de células hiPS, no obstante, permiten probar todas las actividades biológicas de las BoNT requeridas, por ejemplo (a) unión a receptor, (b) internalización, (c) translocación a través de la membrana endosómica al citosol, y/o (d) escisión endoproteolítica de proteínas implicadas en fusión de membranas de vesículas sinápticas. En consecuencia, los métodos pueden usarse para medidas de control de seguridad o calidad, así como para el desarrollo de BoNT con propiedades biológicas modificadas que requieran normalmente, por ejemplo, enfoques de cribado a gran escala.

La presente invención se refiere también a un método para determinar la cantidad de BoNT biológicamente activa en una preparación que comprenda BoNT biológicamente activa, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una célula neuronal derivada de células hiPS con una muestra de dicha preparación; y (b) determinar la cantidad de BoNT biológicamente activa presente en la preparación al ensayar la muestra para la actividad biológica de BoNT.

La invención también se refiere al uso de la célula neuronal derivada de células hiPS para ensayar actividad de BoNT en una composición como se especifica en otro lugar en la presente memoria.

En un aspecto, el ensayo abarca determinar la presencia o ausencia de actividad de BoNT y/o BoNT biológicamente activa. El ensayo cualitativo para BoNT biológicamente activa puede ser usado, por ejemplo, en aplicaciones que tengan como objetivo la evaluación de riesgos para de esta manera prevenir cualquier daño causado por las BoNT, por ejemplo, como medida de control de seguridad durante el proceso de fabricación o durante las aplicaciones farmacéuticas o cosméticas de las BoNT o para prevenir conductas criminales basadas en BoNT, tales como bioterrorismo.

En otro aspecto, el ensayo abarca determinar la cantidad de actividad BoNT y/o BoNT biológicamente activa. El ensayo cuantitativo para BoNT biológicamente activa puede usarse durante el proceso para la fabricación de BoNT o para ajustar una dosis adecuada de BoNT biológicamente activa para aplicaciones cosméticas o farmacéuticas. En consecuencia, este ensayo también puede ser útil como un medio para el control de calidad o para la formulación de productos farmacéuticos o cosméticos adecuados.

La invención se refiere también al uso de la célula neuronal derivada de células hiPS para determinar la cantidad de BoNT biológicamente activa en una preparación que comprenda dicha BoNT biológicamente activa como se especifica en otro lugar de la presente memoria.

## 55 Sección experimental

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar más ciertas realizaciones y aspectos preferidos de la presente invención y no se deben considerar como limitativos del alcance de la misma.

## Ejemplo 1

### A. Métodos

**Células neuronales:** Las neuronas derivadas de iPS humana fueron suministradas congeladas por Cellular Dynamics Inc. (Madison, WI). Las neuronas fueron descongeladas de acuerdo con las instrucciones de Cellular Dynamics, y las células vivas fueron contadas por ensayo de exclusión con azul de Tripán. Las células fueron sembradas a una densidad de 40.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos (TPP, MidSci) recubiertas con 0,01% de poli-L-ornitina (SIGMA) y 8,3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de matrigel (BD Biosciences) a menos que se indique lo contrario, y se incubaron en medio neuronal (Neurobasal suplementado con B27 y glutamax, todos de Invitrogen y suministrados por CDI) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> para los tiempos de maduración indicados. Después de 24 horas de siembra, el medio se cambió completamente y la mitad del medio se reemplazó cada 2-3 días después de esto. Las células primarias de médula espinal de rata (RSC) se prepararon como se ha descrito previamente (Pellett et al., 2007 y 2010), y se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con matrigel a una densidad de 75.000 células por pocillo.

**Neurotoxina botulínica:** La neurotoxina botulínica (BoNT) A, B, C y E pura (150 kDa) y complejo de BoNT/A fueron preparados a partir de las cepas de *C. botulinum* Hall A hyper, Okra B, Brazil C y Beluga E como se ha descrito previamente (Malizio et al., (2000) *Methods Mol Biol* 145: 27-39; Prabaharan et al., (2001) *Toxicon* 39: 1515-1531), con lo cual se llevó a cabo la purificación de BoNT/C mediante el método de Malizio et al (2000) con la etapa adicional de adición de 0,2 mg/ml de ARN de levadura (SIGMA) al cultivo antes de precipitación con sulfato de amonio. Las toxinas se disolvieron en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 y 40% de glicerol, y se almacenaron a -20°C hasta el uso. La actividad de las preparaciones de BoNT/A, /B, /C, /E y complejo BoNT/A se determinó por el bioensayo de ratón (Hatheway CL (1988), citado arriba; Schantz EJ y Kautter DA (1978) *J Assoc Off Anal Chem* 61: 96-99), y la toxicidad específica fue de  $7 \times 10^7$  unidades DL<sub>50</sub> de ratón/mg (BoNT/A1),  $7,7 \times 10^7$  unidades DL<sub>50</sub>/mg (complejo BoNT/A1),  $1 \times 10^8$  unidades DL<sub>50</sub>/mg (BoNT/B),  $1,1 \times 10^7$  unidades DL<sub>50</sub>/mg (BoNT/C), y  $7,6 \times 10^7$  unidades DL<sub>50</sub>/mg (BoNT/E).

**Ensayos de toxicidad neuronal:** Para todos los ensayos de toxicidad neuronal, las neuronas iPS fueron expuestas a diluciones en serie de BoNT en 50  $\mu\text{l}$  de medio neuronal como se indica a menos que se indique lo contrario. Las células de médula espinal de rata primarias fueron usadas como células de control en algunos ensayos como se indica en los resultados. Todas las muestras fueron probadas en un mínimo de triplicado, y un control negativo sin toxina siempre fue incluido. Después del tiempo de exposición especificado, la solución de toxina fue retirada, y las células fueron lisadas en 50  $\mu\text{l}$  de 1 x de tampón de muestra LDS (Invitrogen). Los lisados de células fueron analizados por transferencia Western para escisión de SNAP-25, o VAMP2 como se ha descrito previamente (Pellett et al., (2007), citado arriba; Pellett et al., (2010), citado arriba). Las bandas escindidas y no escindidas fueron cuantificadas por densitometría usando un sistema Foto/Analyst FX y software TotalLab Quant (Fotodyne). Se prepararon gráficas de datos y las CE<sub>50</sub> se derivaron usando software PRISM.

**Selección de matriz:** Para seleccionar la matriz de superficie óptima, las neuronas fueron sembradas en siete matrices diferentes. Las matrices consistían en placas recubiertas con poli-D-lisina (BD biosciences) recubiertas con 1,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ya sea de laminina (PDL laminina) ó 8,3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de matrigel (PDL matrigel), placas recubiertas con 0,01% de poli-L-ornitina seguido por recubrimiento ya sea con 1,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de laminina (PLO lamina) ó 8,3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de matrigel (PLO matrigel), placas recubiertas con PLO-laminina compradas en BD Biosciences (PLO-laminina (BD)), placas recubiertas con PDL de BD Biosciences (PDL (BD)), ó 0,01% de placas recubiertas con PLO (POLO (CDI)). Las neuronas se dejaron madurar durante 14 días, y la sensibilidad a BoNT/A se determinó al exponer neuronas a diluciones en serie de la toxina durante 48 h. Algunas de las neuronas se mantuvieron durante 6 semanas y se probaron de nuevo como arriba.

**Análisis de expresión de receptor:** Para el análisis de expresión de receptor, las neuronas iPS se plaquearon sobre placas de 24 pocillos a una densidad de 210.000 células/pocillo en un volumen de 0,75 ml. Las células de 3 pocillos, respectivamente, fueron recogidas a los 4, 7, 10, 14 y 21 días después de poner en placas en 75  $\mu\text{l}$  de 1 x de tampón de muestra LDS (Invitrogen). Los lisados celulares fueron analizados por transferencia Western para la expresión de las isoformas SV2A, B y C, sinaptotagmina I y II, SNAP-25, VAMP usando un anticuerpo que reconoce VAMP 2 o un anticuerpo que reconoce VAMP isoformas 1, 2 y 3, y sintaxina. Se usó beta-actina como un control de carga, y las células de médula espinal de rata primarias fueron usadas como un control positivo. El anticuerpo SV2C (Janz R y Sudhof TC (1999) *Neuroscience* 94: 1279-1290) fue proporcionado generosamente por Roger Janz. Todos los demás anticuerpos fueron de Synaptic Systems (Göttingen, Alemania). Todos los anticuerpos reconocen proteínas humanas.

Para el análisis de ARNm mediante qPCR en tiempo real, tres cultivos independientes de neuronas iPS fueron mantenidos durante los tiempos indicados, respectivamente. Las células fueron lisadas directamente en la placa y el ARN se purificó usando el Rneasy Mini Kit y el Rnase-Free Dnase Set (Qiagen, Valencia, CA). Para un control positivo, se adquirió ARN de cerebro total adulto humano (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Para todas las muestras, se generó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript VILO (Life Technologies, Carlsbad, CA). La amplificación por qPCR en tiempo real se llevó a cabo en el LightCycler® 480 II (Roche, Basilea, Suiza) usando el TaqMan® Gene Expression Master Mix y los siguientes ensayos de expresión de genes humanos TaqMan: SNAP25 (Hs00938962\_m1); STX1A (Hs00270282\_m1); STX1B (Hs01041315\_m1); VAMP1 (Hs00249911\_m1);

VAMP2 (Hs00360269\_m1); VAMP3 (Hs00922166\_m1); SV2A (Hs00372069\_m1); SV2B (Hs00208178\_m1); SV2C (Hs00392676\_m1); SYT1 (Hs00194572\_m1); SYT2 (Hs00980604\_m1) y el conjunto de cebadores de control endógenos de GAPDH humana (todos de Life Technologies). El análisis derivativo Quant/2° se llevó a cabo en todas las muestras y los valores  $C_p$  se convirtieron en cambio en veces relativo mediante normalización a la  $C_p$  para la expresión de GAPDH endógeno. Se calcularon los promedios y desviación estándar para cada gen dentro de las tres réplicas biológicas. Las reacciones de PCR cuadruplicadas técnicas se llevaron a cabo para cada gen.

**Ensayos de captación de BoNT/A1 dependiente de actividad:** BoNT/A1 se diluyó hasta una concentración de 55 ó 275 U por 50  $\mu$ l de estimulación celular (medio neurobasal personalizado de Invitrogen que contenía 2,2 mM de CaCl y 56 mM de KCl, suplementado con B27 y glutamax) o medios neuronales y se añadieron a neuronas iPS de CDI maduras durante 4 días y células RSC. Las células fueron incubadas con toxina durante 1, 5, 10 y 15 minutos respectivamente. Para el control negativo, el medio respectivo sin toxina se añadió a las células. La toxina fue retirada y las células se lavaron inmediatamente dos veces con 200  $\mu$ l de medio neuronal seguido por incubación en 200  $\mu$ l de medio neuronal fresco durante 24 h. Las muestras se recogieron en réplicas de 4.

Para determinar la concentración de toxina requerida mínima para captación dependiente de actividad de BoNT/A1 dentro de 5 min, la toxina se diluyó a concentraciones de entre 1,72 a 55 U por 50  $\mu$ l de medio de estimulación celular. Las neuronas iPS maduras cuatro días fueron expuestas a las diluciones de toxina durante 5 min, seguido por eliminación de toxina y dos lavados con medio neuronal e incubación en medio neuronal durante 24 h. Todas las diluciones se probaron en réplicas de 4.

**Análisis de protección de anticuerpos:** se prepararon anticuerpos específicos para BoNT/A1 de acuerdo con Johnson *et al.*, 1993. La inhibición de la actividad de BoNT/A1 en neuronas iPS por anticuerpos neutralizantes se analizó usando dos métodos diferentes. Para el primer ensayo, 55 U de BoNT/A1 se combinaron con anticuerpo diluido en serie en medio de estimulación celular y se incubaron durante 1 h a 37°C para permitir la interacción anticuerpo-toxina. Las neuronas iPS maduras 4 días fueron expuestas a la mezcla toxina-anticuerpo durante 5 minutos, seguido de retirada de la mezcla toxina-anticuerpo y dos etapas de lavado con medio neuronal e incubación en medio neuronal durante 24 h. Para el segundo ensayo, 1,5 U de BoNT/A se combinaron con diluciones en serie de anticuerpo en medio neuronal y se incubó a 37°C durante 1 h. Las neuronas iPS fueron expuestas a las mezclas toxina-anticuerpo durante 24 h. La comparación con el bioensayo de ratón usó dilución en serie del anticuerpo pre-incubado con 5-10 U de BoNT/A1 durante 1,5 h a temperaturas ambiente en un volumen de 167  $\mu$ l. El volumen se ajustó a 500 microlitros y se inyectó en cuatro ratones por dilución.

## B. Resultados

**Las neuronas iPS expresan receptores importantes para la intoxicación por BoNT:** Con el fin de determinar si las neuronas derivadas de iPS humana pueden usarse para detectar la actividad de BoNT, la expresión de los receptores y dianas enzimáticas necesarias para la entrada en las células y la actividad catalítica de BoNT se analizaron por transferencia Western y PCR cuantitativa (qPCR), respectivamente (Figura 1). La transferencia Western dio como resultado señales para SV2A, una banda tenue para SV2B, sinaptotagmina 1, syntaxina, SNAP-25, VAMP2 y beta-actina, que no cambió durante un periodo de tiempo de 21 días después del plaqueo de las células (Figura 1A). Aunque VAMP2 se detectó con un anticuerpo específico para VAMP2, un anticuerpo que reconoce las tres isoformas de VAMP no dio como resultado ninguna señal, indicando que VAMP 2 es la isoforma de VAMP predominante en neuronas iPS. El lisado de células de médula espinal de rata primarias fue usado como un control positivo para la detección de anticuerpos, y las diferentes intensidades en bandas de neuronas iPS frente a células RSC puede deberse a reconocimiento diferencial por el anticuerpo o a niveles de expresión diferentes. El análisis de niveles de ARNm de las mismas proteínas por qPCR indicó la expresión de todas las proteínas analizadas (Figura 2B) incluyendo SV2 isoformas B y C, sinaptotagmina 2 y VAMP1 y 3, que no fueron detectadas por transferencia Western. Sin embargo, los niveles de ARNm de esas isoformas fueron al menos 200 veces más bajos que aquellos de las isoformas detectadas por transferencia Western (SV2A, sinaptotagmina 1 y VAMP2). Así, los datos de qPCR corroboran los datos de transferencia Western e indican que las neuronas iPS expresan principalmente las isoformas SV2A, sinaptotagmina 1 y VAMP 2 de estas proteínas, lo cual es consistente con las neuronas que representan neuronas de prosencéfalo (Janz R y Sudhof TC (1999) *Neuroscience* 94: 1279-1290). Los niveles de expresión de todas las proteínas no cambiaron a lo largo del periodo de estudio, indicando que las células son completamente maduras a los 4 días después del plaqueo y permanecen estables durante al menos 21 días.

**La matriz de superficie no tiene influencia en la calidad de las células para el ensayo de BoNT/A1:** Para determinar si la matriz de plaqueo tenía influencia en la sensibilidad a BoNT, las neuronas plaqueadas en siete matrices diferentes fueron probadas para sensibilidad a BoNT/A1. Las neuronas se fijaron y maduraron sobre todas las matrices, formando una red creciente de axones y dendritas. Se observaron diferencias morfológicas significativas entre las células cultivadas en placas con o sin laminina o matrigel. Las células cultivadas en laminina PDL (BD Biosciences) o placas de matrigel o en placas de laminina PLO (Cellular Dynamics) o matrigel crecieron principalmente en una monocapa, pero formaron algunos agregados con axones largos extendiéndose desde ellas, principalmente alrededor del perímetro de las placas. En contraste, las células cultivadas en placas PLO o PDL permanecieron en una sola monocapa de células con axones y dendritas extendiéndose entre las redes de células. Las células cultivadas en laminina PLO (BD Biosciences) se asemejaron a células cultivadas en placas PLO o PDL.

Las neuronas fueron expuestas a diluciones en serie de BoNT/A después de 14 días de maduración, y el análisis por transferencia Western de lisados celulares indicó que la escisión de SNAP-25 era casi idéntica para todos los sustratos probados (Figura 2). El límite de detección fue 0,05 unidades DL<sub>50</sub> de ratón, y la escisión se completó entre 1,75 y 3,5 U. Las CE<sub>50</sub> variaron de 0,21 a 0,31.

- 5 Estos datos indican que las células pueden ser plaqueadas en cualquiera de las matrices de superficie probadas para este ensayo. Todos los experimentos siguientes se llevaron a cabo en placas recubiertas con PLO-matrigel. Con el fin de reducir la agregación celular, se usaron placas TPP (MidSci), las cuales tienen un área superficial más plana. Esto elimina completamente la agregación alrededor del perímetro del pocillo.

10 **Un tiempo de maduración celular de 4-14 días proporciona una plataforma para ensayos de BoNT/A1 excelente y sensible:** Con el fin de determinar si el tiempo de maduración celular afecta la sensibilidad a BoNT de neuronas iPS las células fueron analizadas para sensibilidad a BoNT/A1 4 y 7 días después del plaqueo en paralelo usando las mismas diluciones de toxinas. Las células de médula espinal de rata primarias (células RSC) también fueron probadas en paralelo, para comparar la sensibilidad de las neuronas iPS a células RSC, las cuales son actualmente las células más sensibles descritas para detección de BoNT (Pellet et al., 2007, citado arriba; Pellett et al., (2010) *J Pharmacol Toxicol Methods*). Los datos resultantes mostraron de manera consistente diferencias no estadísticamente significativas en sensibilidad de las células maduradas durante 4 ó 7 días, con CE<sub>50</sub> de ~ 0,3 U (Figura 3). Esto es similar a la CE<sub>50</sub> observada arriba para células del día 14 (Figura 2) y para células RSC. La curva de respuesta a la dosis para las neuronas iPS fue significativamente más pronunciada que para células RSC, y el 100% de escisión se alcanzó con 1,75 U, mientras que el 100% de escisión no se alcanzó en células RSC con las concentraciones de toxina usadas. Esto se debe probablemente a la alta pureza de las neuronas iPS. Así, las células maduradas 4-14 días proporcionan un modelo a base de células reproducible y altamente sensible para la detección y cuantificación de BoNT/A1. Además, los ensayos de cuatro lotes de células iPS diferentes no indicaron una diferencia importante en la sensibilidad a BoNT/A1.

25 **La sensibilidad de neuronas iPS se incrementa con tiempos de exposición más largos:** La dependencia de tiempo de la detección de BoNT en neuronas iPS se examinó al exponer las células a diluciones de BoNT/A1 en serie y al recoger muestras a las 6, 16, 24 y 48 h después de la adición de toxinas. Los datos resultantes indicaron consistentemente que una exposición de 48 h produjo la sensibilidad más alta, con un incremento de ~3 veces en comparación con un ensayo de 24 h y un incremento de ~ 6 veces en comparación con un ensayo de 16 h (Figura 4). Una exposición a toxina de 6 h dio como resultado una reducción de ~130 veces en sensibilidad, con una CE<sub>50</sub> de aproximadamente 40 unidades.

35 **Las neuronas iPS tienen una velocidad de captación de BoNT/A1 más rápida que las células RSC:** La velocidad de captación de BoNT/A1 en neuronas iPS en comparación con células RSC se examinó al exponer neuronas iPS y células RSC a 82 U de BoNT/A1 en paralelo y evaluar la escisión de SNAP-25 a las 2, 4, 6, 8 y 10 h. Se usaron dos medios diferentes para diferenciar entre captación de toxina dependiente e independiente de actividad, toda vez que la actividad neuronal se ha reportado que se traduce en una captación más rápida de las BoNT (Keller et al., (2004), citado arriba). El primer medio fue medio neuronal (NM), y el segundo fue medio de estimulación celular (CSM), el cual es una versión modificada del medio neuronal que contiene 56 mM de KCl y 2,2 mM de CaCl<sub>2</sub> para estimular químicamente la actividad de células neuronales.

40 Las neuronas iPS dieron como resultado una escisión de SNAP-25 significativamente más prematura y más completa que las células RSC. En neuronas iPS, el 100% de la escisión de SNAP-25 se logró a las 8 h y el 50% de la escisión de SNAP-25 a las ~4 h (figura 5). Las células RSC, en contraste, alcanzaron sólo el ~70-80% de escisión de SNAP-25 después de 10 h, y el ~50% de escisión de SNAP-25 se observó a las 6 h. No se observó diferencia entre el medio neuronal y de estimulación celular para ningún tipo de célula, indicando que en el marco de tiempo probado la actividad neuronal no afecta la captación de BoNT en las células. Estos datos indican que las neuronas iPS son significativamente más sensibles a BoNT/A que las células RSC y captan la toxina a una velocidad más rápida, aunque este ensayo no diferencia entre captación de toxina más rápida y escisión más rápida de SNAP-25.

45 **Las neuronas iPS captan BoNT/A1 significativamente más rápido que las células RSC en un ensayo dependiente de actividad:** Con el fin de examinar más si las neuronas iPS captan BoNT en una forma dependiente de actividad, neuronas iPS maduradas 4 días y células RSC fueron expuestas a 55 y 275 U de BoNT/A1 en medio de estimulación celular, respectivamente. Las células fueron expuestas a toxina durante 1, 5, 10 ó 15 min, seguido por la retirada de toxina completa e incubación en medio neuronal durante 24 h para permitir la escisión de SNAP-25. Una escisión de SNAP-25 significativa se observó en neuronas iPS tan pronto como 1 min después de exposición con 55 U de BoNT/A1 (Figura 6A). Después de 5 min aproximadamente el 75% de SNAP-25 fue escindida, y no hubo cambio significativo con exposiciones a toxina más largas, indicando la captación completa a los 5 minutos. La exposición a 275 U se tradujo en escisión completa de SNAP-25 a todos los tiempos de exposición probados (Figura 6A). En contraste, la exposición de células RSC a 55 unidades de BoNT/A1 no dio como resultado una escisión de SNAP-25 significativa después de tiempos de exposición de hasta 15 min, y sólo aproximadamente el 30-40% de SNAP-25 fue escindida después de una exposición de al menos 10 min a 275 U (Figura 6A). Esto indica que las neuronas iPS captan BoNT/A1 de una forma dependiente de actividad, y que esta captación se presenta notoriamente de manera más eficiente y más rápida que en células RSC.

Con el fin de confirmar que la captación rápida en neuronas iPS es dependiente de actividad, las neuronas fueron expuestas a 55 U de BoNT/A durante 1, 5 ó 10 min en medio de estimulación celular o medio neuronal. Hubo significativamente más escisión de SNAP-25 en las células tratadas con medio de estimulación celular, con 50% de escisión de SNAP-25 observada después de 1 min y 70% de escisión después de 5 min (Figura 6B). En medio neuronal, en contraste, sólo aproximadamente el 20% de SNAP-25 se escindió después de 10 minutos (Figura 6B). Esto indica que la captación rápida de BoNT/A1 en neuronas iPS depende de actividad.

Con el fin de determinar la dependencia de concentración de la captación de BoNT/A1 dependiente de actividad por neuronas iPS, las células fueron expuestas a 1,7-55 U de BoNT/A1 en medio de estimulación celular durante 5 min. Después de la retirada de la toxina, las células fueron incubadas durante 24 h para permitir que se produjera la escisión de SNAP-25. Se observó un incremento dependiente de concentración en la escisión de SNAP-25 con una concentración de toxina creciente, ocurriendo el 50% de la escisión de SNAP-25 con aproximadamente 30 U (Figura 6C).

#### **Anticuerpos específicos para BoNT/A1 protegen a las neuronas iPS de la escisión de SNAP-25 por BoNT/A1:**

La especificidad del ensayo de BoNT en iPS se confirmó por un ensayo de protección de anticuerpos usando dos formatos de ensayo diferentes. En el primer ensayo, las células fueron expuestas a las mezclas de toxinas y anticuerpos durante 24 h, usando la cantidad mínima de toxinas requeridas para lograr una escisión de SNAP-25 casi completa (1,5 unidades). En el segundo ensayo, las células fueron expuestas a mezclas de 55 U de BoNT/A y anticuerpo diluido en serie durante 5 min en medio de estimulación celular, seguido por la retirada de toxinas e incubación durante 24 h. El primer ensayo produjo una sensibilidad significativamente más alta en detección de anticuerpos. Las neuronas fueron completamente protegidas de la escisión de SNAP-25 con tan poco como 0,0025 µl de anticuerpo. Se observó una protección parcial significativa hasta 0,00625 µl de anticuerpo (Figura 7A). El mismo patrón de protección se observó previamente cuando el anticuerpo se probó en células RSC usando 0,5 U de BoNT/A1 y una exposición de 48 h. El ensayo de las mismas diluciones de anticuerpo por el bioensayo de ratón indicó una sensibilidad al menos ~10 veces más grande de los ensayos a base de células en comparación con el bioensayo de ratón como también habían indicado datos previos. El ensayo de RSC ha mostrado ser más sensible en la detección de anticuerpos neutralizantes que el bioensayo de ratón (Pellett, S. 2007, citado arriba). El segundo ensayo (dependiente de actividad) fue aproximadamente 10 veces menos sensible, requiriendo 0,016 µl de anticuerpo por 50 µl para protección completa, y se observó protección parcial con 0,004 µl (Figura 7B).

Esto confirma la especificidad de este ensayo e indica que las neuronas iPS proporcionan un ensayo excelente y altamente sensible para la detección de anticuerpos neutralizantes, y que una exposición más larga con menos toxina es más sensible que un ensayo dependiente de actividad que requiere más toxina pero un tiempo de exposición más corto. El ensayo dependiente de actividad es útil para algunos propósitos, tal como el cribado de compuestos o antitoxina que pudiera ser citotóxica o tuviera que ser disuelta en solventes que pudieran dañar neuronas con el tiempo.

**La detección de toxina BoNT/A1 en su complejo natural es más sensible que la detección de toxina purificada:** Las BoNT se expresan en clostridios como un complejo con varias otras proteínas (proteína no hemaglutinina no tóxica (NTNH) y hemaglutininas (HA) en el caso de BoNT/A (revisado en Johnson EA y Bradshaw M (2001) *Toxicon* 39: 1703-1722). Las proteínas de complejo no tóxicas se cree que protegen a la toxina del pH degradante del tracto gastrointestinal (Ogurna et al., (2000), *Microbial Foodborne Diseases: Mechanisms of Pathogenesis and Toxin Synthesis* 273-293). Las preparaciones médicas más comúnmente usadas del BoNT/A (preparaciones BOTOX® y Dysport®) consisten en el complejo de toxinas completo, aunque formulaciones más nuevas que contienen sólo la BoNT purificada (preparación Xeomin®) han sido ahora aprobadas por la FDA. Con el fin de determinar si BoNT/A1 en su complejo natural se detecta con sensibilidad igual como BoNT/A1 pura en neuronas iPS, las células fueron expuestas a cantidades iguales de complejo BoNT/A1 o BoNT/A1 purificada en paralelo. El complejo consiste en aproximadamente 24% de BoNT/A1 y 76% de otras proteínas asociadas no tóxicas, según se determina por densitometría (Figura 8A). La preparación de BoNT/A1 purificada y complejo de BoNT/A1 tuvieron actividades específicas similares ( $7 \times 10^7$  U/mg y  $7,3 \times 10^7$  U/mg). En una comparación directa, se requirió significativamente menos del componente de toxina del complejo para alcanzar la escisión completa de SNAP-25 (Figura 8B). Este descubrimiento indica que las proteínas no tóxicas del complejo incrementan la actividad de BoNT/A1 en este ensayo, posiblemente debido a un efecto protector en el medio neuronal.

#### **Las neuronas iPS son un modelo celular altamente sensible para la detección de BoNT serotipos B, C y E:**

Los análisis de receptor de BoNT indicaron que las neuronas iPS expresan las proteínas SNARE y receptores requeridos para la entrada celular de todos los serotipos de BoNT (Figura 1). BoNT/A y /E escinden SNAP-25, BoNT/B escinde VAMP y BoNT/C escinde SNAP-25 y syntaxina (Humeau et al, (2000) *Biochimie* 82: 427-446). Para probar las sensibilidades de neuronas a diferentes serotipos, diluciones en serie de BoNT/B, C o E fueron añadidas a neuronas iPS o células RSC durante 48 h en paralelo, y los lisados celulares fueron ensayados mediante transferencia Western para la escisión de su substrato neuronal respectivo. Las neuronas iPS detectaron de manera consistente todos los serotipos de BoNT con una sensibilidad igual o mayor que las células RSC (Figura 9). Los valores de  $CE_{50}$  para neuronas iPS y células RSC fueron 15,71 U y 29,22 U para BoNT/B (Figura 9A), 0,4 U y 0,36 U para BoNT/C (Figura 9B) y 1,79 U para BoNT/E en neuronas iPS (Figura 9C). No pudo obtenerse un valor de  $CE_{50}$  para BoNT/E en células RSC con el software PRISM, pero se estima que es similar a aquél de las neuronas iPS (Figura 9C).



**REIVINDICACIONES**

1. Un método de ensayo de una neurotoxina de *Clostridium botulinum* (BoNT) para actividad, que comprende:
  - a) poner en contacto una célula neuronal derivada de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPS) con una composición que comprende una BoNT; y
  - b) ensayar dicha BoNT para actividad biológica.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de poner en contacto dicha BoNT con un compuesto de ensayo antes de poner en contacto dichas células neuronales derivadas de hPS.
3. El método de la reivindicación 2, en el que dicho compuesto de ensayo es un anticuerpo.
4. El método de la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo neutralizante.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo neutralizante se encuentra en una muestra seleccionada del grupo que consiste en anticuerpos purificados, suero y antitoxinas.
6. Un método de ensayo de una neurotoxina de *Clostridium botulinum* (BoNT) para actividad, que comprende:
  - a) poner en contacto una célula neuronal derivada de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPS) con una composición que comprende i) una BoNT, y ii) un anticuerpo neutralizante; y
  - b) ensayar la BoNT para actividad biológica.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha BoNT tiene un serotipo seleccionado del grupo que consiste en A, B, C, E y variantes modificadas de dicha BoNT.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la actividad biológica se selecciona del grupo que consiste en escisión de SNAP-25, escisión de VAMP2 y liberación de neurotransmisores.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho ensayo es cualitativo.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho ensayo es cuantitativo.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha BoNT es purificada.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha BoNT está en un complejo.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en el que dicho anticuerpo neutralizante se encuentra en una muestra seleccionada del grupo que consiste en anticuerpos purificados, suero y antitoxinas.
14. Un método para determinar la cantidad de BoNT biológicamente activa en una preparación que comprende BoNT biológicamente activa, comprendiendo dicho método las etapas de:
  - (a) poner en contacto una célula neuronal derivada de células hiPS con una muestra de una preparación que comprende BoNT biológicamente activa; y
  - (b) determinar la cantidad de BoNT biológicamente activa presente en la preparación mediante el ensayo de dicha muestra para la actividad biológica de BoNT.
15. El uso de una célula neuronal derivada de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPS) para el ensayo de una BoNT para actividad.

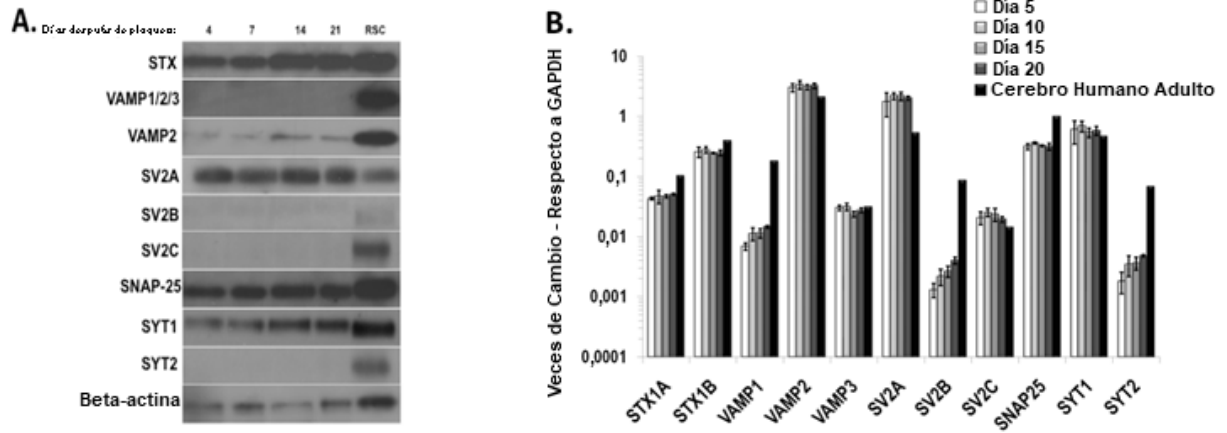
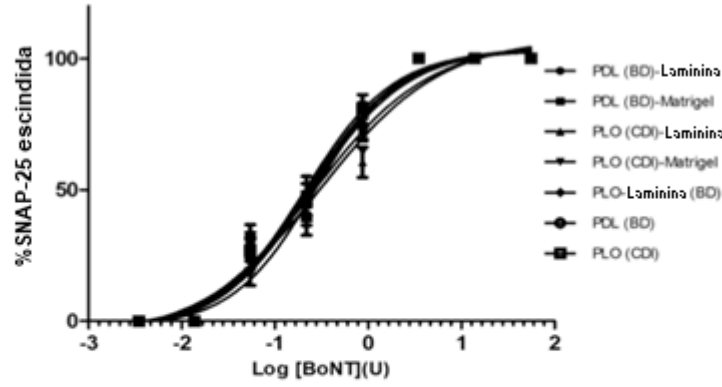


Figura 1

Neuronas iCell (Día 14): Ensayo BoNT



	PDL (BD)-Laminina	PDL (BD)-Matrigel	PLo (CDi)-Laminina	PLo (CDi)-Matrigel	PLo-Laminina(BD)	PDL (BD)	PLo (CDi)
CE50	0.2719	0.2435	0.3131	0.2623	0.2412	0.2306	0.2097

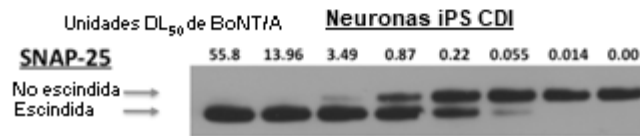
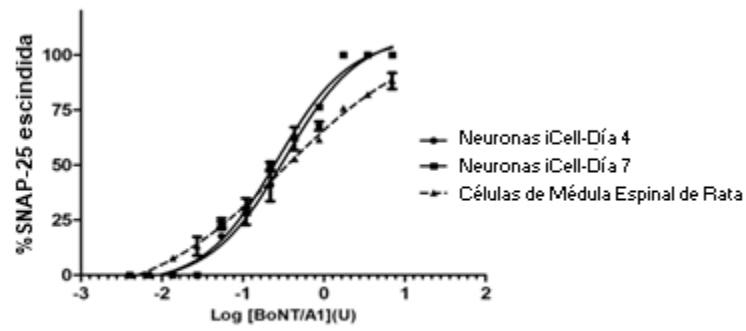
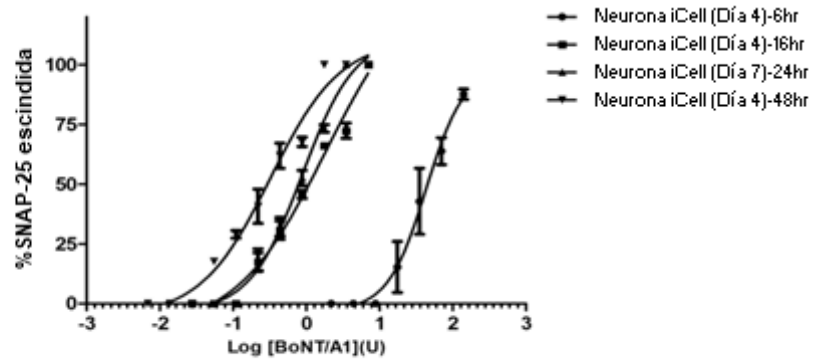


Figura 2



	Neuronas iCell-Día 4	Neuronas iCell-Día 7	Células de Médula Espinal de Rata
CE50	0.3310	0.2619	0.3160

Figura 3



	Neurona iCell (Día 4)-6hr	Neurona iCell (Día 4)-16hr	Neurona iCell (Día 7)-24hr	Neurona iCell (Día 4)-48hr
CE50	43.12	1.813	0.8627	0.3233

Figura 4

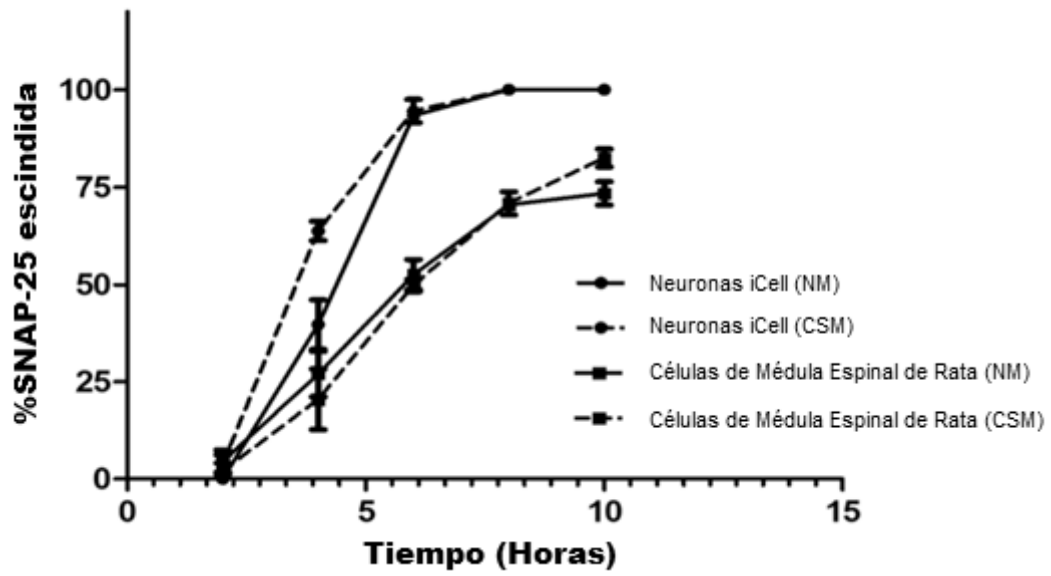


Figura 5

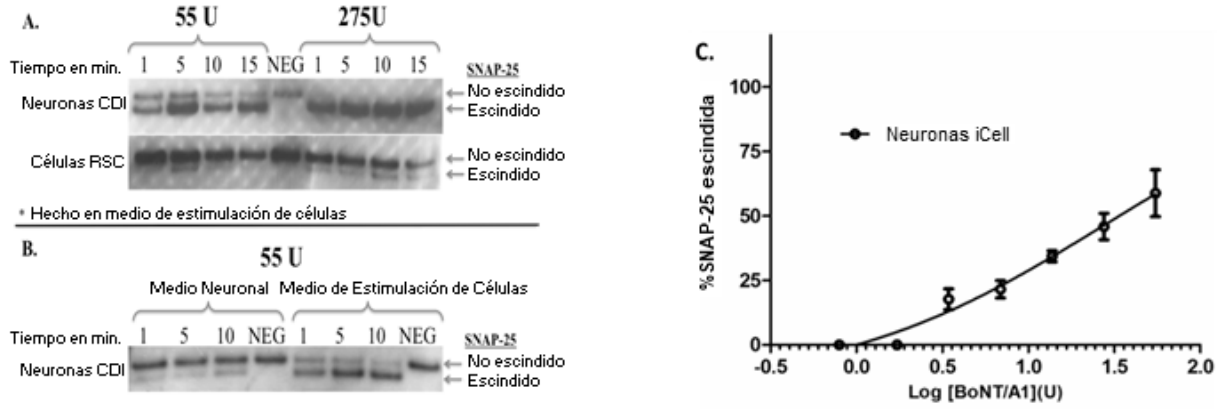


Figura 6

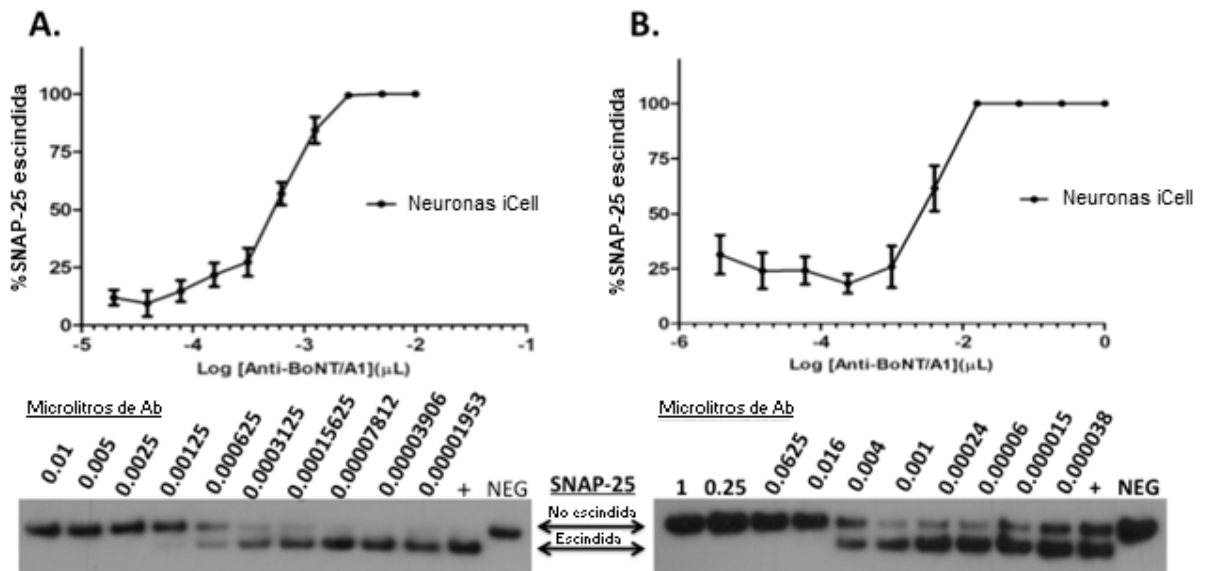


Figura 7

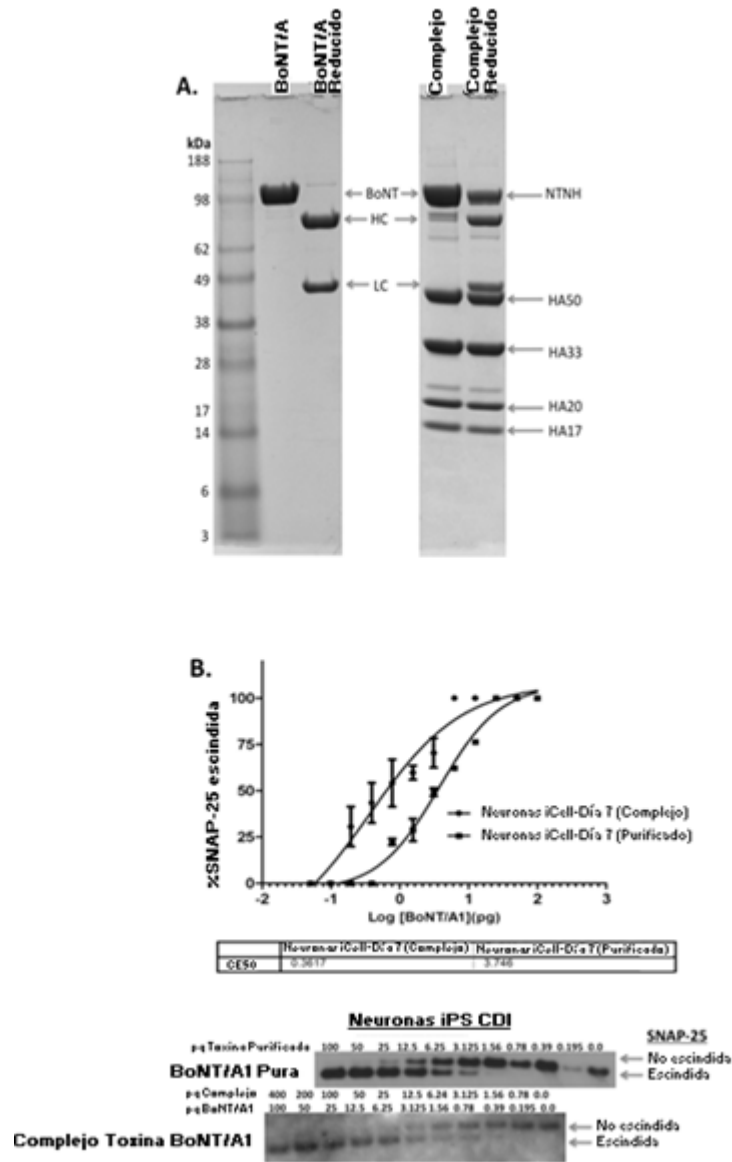


Figura 8

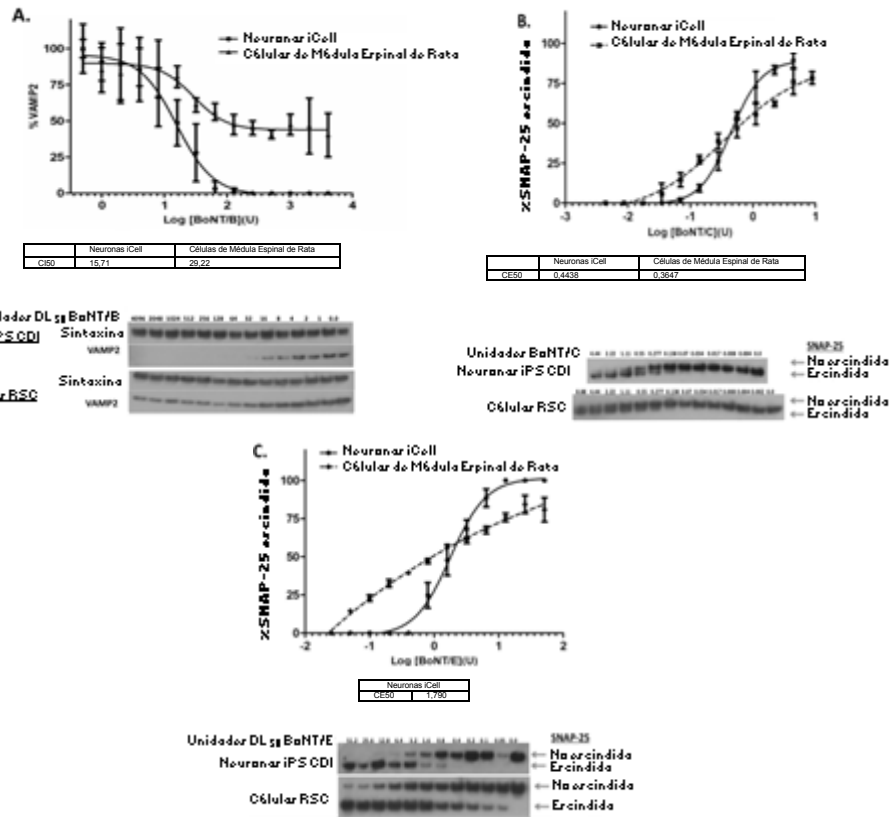


Figura 9