

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 493**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/33** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2014** **PCT/EP2014/078732**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015** **WO15097087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2014** **E 14821171 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018** **EP 3087089**

54 Título: **Tratamiento con multiproteasa para el dolor crónico**

30 Prioridad:

**23.12.2013 US 201361920053 P**  
**03.04.2014 US 201414244162**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**06.06.2018**

73 Titular/es:

**DUBLIN CITY UNIVERSITY (100.0%)**  
**Collins Avenue Glasnevin**  
**Dublin 9, IE**

72 Inventor/es:

**DOLLY, JAMES OLIVER;**  
**WANG, JIAFU y**  
**MENG, JIANGHUI**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 671 493 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

Tratamiento con multiproteasa para el dolor crónico

- 5 La presente divulgación señala procedimientos y composiciones que implican derivados de neurotoxina clostrídica que tienen una capacidad mejorada para interrumpir la exocitosis de mediadores del dolor y/o de la inflamación de los nociceptores o inductores de la inflamación, impidiendo así el dolor.

## ANTECEDENTES

10

Los serotipos A-G de la neurotoxina botulínica (BoNT), producidos por *Clostridium botulinum*, son los venenos más potentes conocidos debido al bloqueo específico de la liberación de acetilcolina de los nervios periféricos al escindir proteolíticamente las proteínas SNARE (receptores de proteína de unión a NSF soluble) que median la fusión de la vesícula sináptica con la membrana celular y, por lo tanto, son esenciales para la exocitosis estimulada por  $Ca^{2+}$  de neurotransmisores, péptidos del dolor y citocinas de la neurona.

15

La capacidad de las toxinas clostrídicas, como por ejemplo, neurotoxinas botulínicas (BoNT) (incluyendo los serotipos BoNT de BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F y BoNT/G, así como la toxina tetánica TeTx) para inhibir la transmisión neuronal se explotan en una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas y cosméticas, véase p. ej., Ward AB and Barnes MP, CLINICAL USERS OF BOTULINUM TOXINS (Cambridge University Press, Cambridge 2007). Como ejemplo, el agente BOTOX® derivado de BoNT/A se ha utilizado en uno o más países para cada una de las siguientes indicaciones: acalasia, espasticidad en el adulto, fisura anal, dolor de espalda, blefaroespasma, bruxismo, distonía cervical, temblor esencial, líneas glabellares o líneas faciales hiperkinéticas, dolor de cabeza, espasmo hemifacial, hiperactividad de la vejiga, hiperhidrosis, parálisis cerebral juvenil, esclerosis múltiple, trastornos mioclónicos, líneas labiales nasales, disfonía espasmódica, estrabismo y trastorno del nervio VII.

20

25

Existen toxinas clostrídicas distintas de las toxinas derivadas de *C. botulinum* y *C. tetanus*; estos incluyen, sin limitación, las toxinas de *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. difficile*, *C. spiroforme*, *C. butyricum* y *C. barati*. Sin embargo, se entenderá que en esta memoria descriptiva, una referencia a "toxinas clostrídicas" o una referencia similar, se refiere a las neurotoxinas de *C. subtipos botulinum* y *C. subtipos tetani*, menos que se indique específicamente o contextualmente lo contrario.

30

Además, las terapias de toxina clostrídica se utilizan o se han propuesto para el tratamiento de afecciones que incluyen, sin limitación,

35

**a) trastornos neuromusculares**, véase p. ej., Kei Roger Aoki et al., *Method for Treating Neuromuscular Disorders and Conditions with Botulinum Toxin Types A and B*, patente de EE. UU. N.º 6.872.397 (Mar. 29, 2005); Rhett M. Schiffman, *Methods for Treating Uterine Disorders*, publicación de patente de EE. UU. N.º 2004/0175399 (Sep. 9, 2004); Richard L. Barron, *Methods for Treating Ulcers and Gastroesophageal Reflux Disease*, publicación de patente de EE. UU. N.º 2004/0086531 (May. 7, 2004); y Kei Roger Aoki, et al., *Method for Treating Dystonia with Botulinum Toxin C to G*, patente de EE. UU. N.º 6.319.505 (Nov. 20, 2001);

40

**b) trastornos oculares**, véase p. ej., Eric R. First, *Methods and Compositions for Treating Eye Disorders*, lapublicación de patente de EE. UU. N.º 2004/0234532 (Nov. 25, 2004); Kei Roger Aoki et al., *Botulinum Toxin Treatment for Blepharospasm*, lapublicación de patente de EE. UU. N.º 2004/0151740 (Aug. 5, 2004); y Kei Roger Aoki et al., *Botulinum Toxin Treatment for Strabismus*, publicación de patente de EE. UU. N.º. 2004/0126396 (Jul. 1, 2004);

45

**c) dolor**, véase p. ej., Kei Roger Aoki et al., *Pain Treatment by Peripheral Administration of a Neurotoxin*, patente de EE. UU. N.º 6.869.610 (Mar. 22, 2005); Stephen Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods to Treat Pain*, patente de EE. UU. N.º 6.641.820 (Nov. 4, 2003); Kei Roger Aoki, et al., *Method for Treating Pain by Peripheral Administration of a Neurotoxin*, patente de EE. UU. N.º 6.464.986 (Oct. 15, 2002); Kei Roger Aoki and Minglei Cui, *Methods for Treating Pain*, patente de EE. UU. N.º 6.113.915 (Sep. 5, 2000); Martin A. Voet, *Methods for Treating Fibromyalgia*, patente de EE. UU. N.º 6.623.742 (Sep. 23, 2003); Martin A. Voet, *Botulinum Toxin Therapy for Fibromyalgia*, publicación de la patente de EE. UU. N.º 2004/0062776 (Apr. 1, 2004); y Kei Roger Aoki et al., *Botulinum Toxin Therapy for Lower Back Pain*, publicación de la patente de EE. UU. N.º 2004/0037852 (Feb. 26, 2004);

50

**d) lesiones musculares**, véase p. ej., Gregory F. Brooks, *Methods for Treating Muscle Injuries*, patente de EE. UU.

60

N.º 6.423.319 (Jul. 23, 2002);

**e) dolor de cabeza**, véase p. ej., Martin Voet, *Methods for Treating Sinus Headache*, patente de EE. UU. N.º 6.838.434 (Jan. 4, 2005); Kei Roger Aoki et al., *Methods for Treating Tension Headache*, patente de EE. UU. N.º 6.776.992 (Aug. 17, 2004); y Kei Roger Aoki et al., *Method for Treating Headache*, patente de EE. UU. N.º 6.458.365 (Oct. 1, 2002); William J. Binder, *Method for Reduction of Migraine Headache Pain*, patente de EE. UU. N.º 5.714.469 (Feb. 3, 1998);

**f) enfermedades cardiovasculares**, véase p. ej., Gregory F. Brooks and Stephen Donovan, *Methods for Treating Cardiovascular Diseases with Botulinum Toxin*, patente de EE. UU. N.º 6.767.544 (Jul. 27, 2004);

**e) trastornos neurológicos**, véase p. ej., Stephen Donovan, *Parkinson's Disease Treatment*, lapatente de EE. UU. N.º 6.620.415 (Sep. 16, 2003); y Stephen Donovan, *Method for Treating Parkinson's Disease with a Botulinum Toxin*, patente de EE. UU. N.º 6.306.403 (Oct. 23, 2001);

**g) trastornos neuropsiquiátricos**, véase p. ej., Stephen Donovan, *Botulinum Toxin Therapy for Neuropsychiatric Disorders*, publicación de patente de EE. UU. N.º 2004/0180061 (Sep. 16, 2004); y Steven Donovan, *Therapeutic Treatments for Neuropsychiatric Disorders*, publicación de patente de EE. UU. N.º 2003/0211121 (Nov. 13, 2003);

**f) trastornos endocrinos**, véase p. ej., Stephen Donovan, *Method for Treating Endocrine Disorders*, patente de EE. UU. N.º 6.827.931 (Dec. 7, 2004); Stephen Donovan, *Method for Treating Thyroid Disorders with a Botulinum Toxin*, patente de EE. UU. N.º 6.740.321 (May. 25, 2004); Kei Roger Aoki et al., *Method for Treating a Cholinergic Influenced Sweat Gland*, patente de EE. UU. N.º 6.683.049 (Jan. 27, 2004); Stephen Donovan, *Neurotoxin Therapy for Diabetes*, patente de EE. UU. N.º 6.416.765 (Jul. 9, 2002); Stephen Donovan, *Methods for Treating Diabetes*, lapatente de EE. UU. N.º 6.337.075 (Jan. 8, 2002); Stephen Donovan, *Method for Treating a Pancreatic Disorder with a Neurotoxin*, lapatente de EE. UU. N.º 6.261.572 (Jul. 17, 2001); Stephen Donovan, *Methods for Treating Pancreatic Disorders*, patente de EE. UU. N.º 6.143.306 (Nov. 7, 2000);

**g) cánceres**, véase p. ej., Stephen Donovan, *Methods for Treating Bone Tumors*, patente de EE. UU. N.º 6.565.870 (May 20, 2003); Stephen Donovan, *Method for Treating Cancer with a Neurotoxin to Improve Patient Function*, patente de EE. UU. N.º 6.368.605 (Apr. 9, 2002); Stephen Donovan, *Method for Treating Cancer with a Neurotoxin*, patente de EE. UU. N.º 6.139.845 (Oct. 31, 2000); y Mitchell F. Brin and Stephen Donovan, *Methods for Treating Diverse Cancers*, publicación de patente de EE. UU. N.º 2005/0031648 (Feb. 10, 2005);

**h) trastornos óticos**, véase p. ej., Stephen Donovan, *Neurotoxin Therapy for Inner Ear Disorders*, patente de EE. UU. N.º 6.358.926 (Mar. 19, 2002); y Stephen Donovan, *Method for Treating Otic Disorders*, patente de EE. UU. N.º 6.265.379 (Jul. 24, 2001);

**i) trastornos autonómicos**, véase p. ej., Pankaj J. Pasricha and Anthony N. Kalloo, *Method for Treating Gastrointestinal Muscle Disorders and Other Smooth Muscle Dysfunction*, patente de EE. UU. N.º 5.437.291 (Aug. 1, 1995);

**j) así como otros trastornos**, véase p. ej., William J. Binder, *Method for Treatment of Skin Lesions Associated with Cutaneous Cell-proliferative Disorders*, patente de EE. UU. N.º 5.670.484 (Sep. 23, 1997); Eric R. First, *Application of Botulinum Toxin to the Management of Neurogenic Inflammatory Disorders*, patente de EE. UU. N.º 6.063.768 (May 16, 2000); Marvin Schwartz and Brian J. Freund, *Method to Reduce Hair Loss and Stimulate Hair Growth*, patente de EE. UU. N.º 6.299.893 (Oct. 9, 2001); Jean D. A. Carruthers and Alastair Carruthers, *Cosmetic Use of Botulinum Toxin for Treatment of Downturned Mouth*, patente de EE. UU. N.º 6.358.917 (Mar. 19, 2002); Stephen Donovan, *Use of a Clostridial Toxin to Reduce Appetite*, publicación de patente de EE. UU. N.º 2004/40253274 (Dec. 16, 2004); y Howard I. Katz and Andrew M. Blumenfeld, *Botulinum Toxin Dental Therapies and Procedures*, publicación de patente de EE. UU. N.º 2004/0115139 (Jun. 17, 2004); Kei Roger Aoki, et al., *Treatment of Neuromuscular Disorders and Conditions with Different Botulinum*, la publicación de patente de EE. UU. N.º 2002/0010138 (Jan. 24, 2002); y Kei Roger Aoki, et al., *Use of Botulinum Toxins for Treating Various Disorders and Conditions and Associated Pain*, publicación de patente de EE. UU. N.º 2004/0013692 (Jan. 22, 2004).

La Tabla 2, a continuación, proporciona las secuencias de aminoácidos de los isotipos de diversas toxinas clostrídicas relacionadas con botulina actualmente conocidas (BoNT y TeTX). Estas toxinas poseen un mínimo de aproximadamente el 35 % de identidad de aminoácidos entre sí y comparten la misma organización de dominio funcional general y la arquitectura estructural general. Las toxinas clostrídicas naturales se traducen cada una como un polipéptido monocatenario de aproximadamente 150 kDa que posteriormente se divide por escisión proteolítica

dentro de un bucle disulfuro mediante una proteasa natural, como por ejemplo, una proteasa de toxina clostrídica endógena o una proteasa natural producida en el entorno. Este procesamiento postraducciona produce una molécula bicatenaria madura que comprende una cadena ligera (LC) de aproximadamente 50 kDa y una cadena pesada (HC) de aproximadamente 100 kDa que se mantienen juntas por un único enlace disulfuro entre cadenas e interacciones no covalentes.

- Cada molécula de toxina clostrídica bicatenaria madura comprende tres dominios funcionalmente distintos: 1) un dominio enzimático localizado en la LC que incluye una región de metaloproteasa que contiene una actividad endopeptidasa dependiente de zinc que se dirige específicamente a una o más proteínas SNARE que median en la fusión de la vesícula sináptica con la membrana celular; 2) un dominio de translocación contenido dentro de la mitad amino terminal de la cadena H (denominado "H<sub>N</sub>") que facilita la liberación de al menos la cadena LC de la toxina de un endosoma en el citoplasma de la célula diana; y 3) un dominio de unión encontrado dentro de la mitad carboxilo terminal de la cadena H (H<sub>C</sub>) que determina la actividad de unión y la especificidad de unión de la toxina.
- 15 La H<sub>C</sub> comprende subdominios H<sub>CN</sub> y H<sub>CC</sub> s (Las partes N y C-terminal de H<sub>C</sub>, respectivamente). Ahora hay evidencia sustancial de que la mayoría o todas las toxinas BoNT/X se unen a una célula diana utilizando un "receptor dual", donde la parte H<sub>C</sub> de la toxina que comprende los subdominios H<sub>CN</sub> y H<sub>CC</sub> se une a ciertos gangliósidos de superficie celular y un receptor de proteína (quizás glicosilado); la unión del receptor de proteína facilita la internalización de la toxina dentro de la célula. Por "X" se entiende cualquier serotipo de toxina botulínica. Aunque el término "BoNT/X" se usa generalmente para indicar subtipos de toxina botulínica, el término también puede incluir las regiones TeTX de los mismos. H<sub>CC</sub> se une al complejo receptor localizado en la superficie de la célula diana.

Se entenderá que existen cepas o subtipos de cada serotipo de estas toxinas; estos pueden variar algo en sus secuencias de aminoácidos, particularmente (pero no exclusivamente) en regiones no críticas (denominadas regiones "variables") sin un cambio sustancial en la identidad o en la característica de actividad del dominio de toxina o toxina indicado.

En la Tabla 1 a continuación, se proporcionan los códigos de aminoácidos de una letra y tres letras estándares:

30 Tabla 1

| Aminoácido                   | Código de tres letras | Código de una letra |
|------------------------------|-----------------------|---------------------|
| alanina                      | Ala                   | A                   |
| arginina                     | Arg                   | R                   |
| asparagina                   | Asn                   | N                   |
| ácido aspártico              | Asp                   | D                   |
| asparagina o ácido aspártico | Asx                   | B                   |
| cisteína                     | Cys                   | C                   |
| ácido glutámico              | Glu                   | E                   |
| glutamina                    | Gln                   | Q                   |
| glutamina o ácido glutámico  | Glx                   | Z                   |
| glicina                      | Gly                   | G                   |
| histidina                    | His                   | H                   |
| isoleucina                   | Ile                   | I                   |
| leucina                      | Leu                   | L                   |
| lisina                       | Lys                   | K                   |
| metionina                    | Met                   | M                   |
| fenilalanina                 | Phe                   | F                   |
| prolina                      | Pro                   | P                   |
| serina                       | Ser                   | S                   |
| treonina                     | Thr                   | T                   |
| triptófano                   | Try                   | W                   |
| tirosina                     | Tyr                   | Y                   |
| valina                       | Val                   | V                   |

Tabla 2

| Secuencias y regiones de referencia de toxinas clostrídicas (identificadas de la dirección de amino a carboxi, número de aminoácido a número de aminoácido) |            |         |                |                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------|----------------|----------------|
| Toxina                                                                                                                                                      | SEQ ID NO: | LC      | H <sub>N</sub> | H <sub>C</sub> |
| BoNT/A                                                                                                                                                      | 7          | M1-K448 | A449-K871      | N872-L1296     |
| BoNT/B                                                                                                                                                      | 8          | M1-K441 | A442-S858      | E859-E1291     |
| BoNT/C1                                                                                                                                                     | 9          | M1-K449 | T450-N866      | N867-E1291     |
| BoNT/D                                                                                                                                                      | 10         | M1-R445 | D446-N862      | S863-E1276     |
| BoNT/E                                                                                                                                                      | 11         | M1-R422 | K423-K845      | R846-K1252     |
| BoNT/F                                                                                                                                                      | 12         | M1-K439 | A440-K864      | K865-E1274     |
| BoNT/G                                                                                                                                                      | 13         | M1-K446 | S447-S863      | N864-E1297     |
| TeNT                                                                                                                                                        | 14         | M1-A457 | S458-V879      | I880-D1315     |

Los expertos en la técnica reconocerán que pueden existir variantes de toxina de subtipo clostrídica en la naturaleza, que tienen las variaciones en las secuencias de aminoácidos mostradas anteriormente (o en las secuencias de nucleótidos que codifican estas secuencias de aminoácidos). Como se usa en esta invención, el término "variante de dominio clostrídica natural" significa cualquier dominio clostrídico (endopeptidasa, translocación, y/o dominios de unión) producido por un proceso natural, que incluye, sin limitación, isoformas de dominio clostrídico producidas a partir de transcritos de splicing alternativo, isoformas de dominio clostrídico producidas por mutaciones espontáneas y subtipos de dominio clostrídico. Como se usa en esta invención, una variante de dominio clostrídico natural funciona sustancialmente de la misma manera que el dominio clostrídico de referencia en el que se basa la variante de dominio clostrídico natural y puede sustituirse por el dominio clostrídico de referencia en cualquier aspecto de la presente invención.

Una variante de dominio clostrídico natural puede sustituir uno o más aminoácidos, dos o más aminoácidos, tres o más aminoácidos, cuatro o más aminoácidos, cinco o más aminoácidos, diez o más aminoácidos, 20 o más aminoácidos, 30 o más aminoácidos, 40 o más aminoácidos, 50 o más aminoácidos o 100 o más aminoácidos del dominio clostrídico de referencia en el que se basa la variante de dominio clostrídico natural. Una variante de dominio clostrídico natural también puede sustituir al menos 10 aminoácidos contiguos, al menos 15 aminoácidos contiguos, al menos 20 aminoácidos contiguos o al menos 25 aminoácidos contiguos del dominio clostrídico de referencia en el que se basa la variante de dominio clostrídico natural, que posee al menos 50 % de identidad de aminoácidos, el 65 % de identidad de aminoácidos, el 75 % de identidad de aminoácidos, el 85 % de identidad de aminoácidos o el 95 % de identidad de aminoácidos en el que se basa la variante de dominio clostrídico natural, siempre que la actividad biológica o bioquímica del dominio clostrídico natural esté sustancialmente conservada. También se entenderá que las inserciones y delecciones de aminoácidos conservativas también pueden realizarse siempre que no se alteren sustancialmente la función característica y la identidad del dominio.

Debido a la degeneración del código genético, un experto en la técnica reconocerá que estas secuencias de aminoácidos pueden codificarse por un conjunto finito de diferentes moléculas de ADN que tienen diferentes, pero definidas, secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos degeneradas que codifican un péptido o proteína dados pueden tener diferentes codones adaptados o seleccionados para favorecer la expresión en una célula huésped particular. Usando esta información, se puede construir un marco de lectura de ácido nucleico abierto expresable para el ensamblaje de una molécula de ácido nucleico que comprende cualquier combinación de estas regiones que codifican dominio de aminoácido, solo o con secuencias de ácido nucleico adicionales, insertado en un vector de expresión adecuado y la expresión posterior dentro de una célula huésped elegida. Por ejemplo, la publicación de patente internacional WO01/14570 divulga procedimientos para fabricar derivados y formas quiméricas e híbridas de neurotoxina clostrídica modificados o sin modificar recombinantes escindibles, monocatenarios usando dichos procedimientos. Entre las publicaciones adicionales que describen procedimientos para fabricar neurotoxinas recombinantes expresables y sus derivados se incluyen las patentes de EE.UU N.º 5.989.545; 6.203.794; 6.395.513; los números de publicaciones de los EE.UU U.S. 2003/0166238; U.S. 2002/169942; U.S. 2004/176299; U.S. 2004/126397; U.S. 2005/035730; U.S. 2005/068494; U.S. 2006/011966; las solicitudes de patente internacional WO95/32738; WO 99/55359; WO96/33273; WO98/07864; WO99/17806; WO98/07864; WO02/44199; WO02/40506, y el N.º de serie de la solicitud de patente 13/644,386, depositada el 4 de octubre de 2012.

El uso de técnicas de ADN recombinante permite la construcción de neurotoxinas clostrídicas modificadas que tienen propiedades funcionales diferentes o modificadas a partir de los subtipos y cepas de toxina naturales de las mismas.

Por ejemplo, alterando la secuencia de aminoácidos natural de la cadena ligera de la neurotoxina nativa y/o añadiendo un resto terapéutico diferente permite la construcción de proteínas de transporte diseñadas para transportar un agente terapéutico dentro de una neurona. Véase la Patente de Estados Unidos N.º 6.203.794.

- 5 Alterando el dominio dirigido (unión a célula) se permite que la toxina sea transportada dentro de células pancreáticas, como por ejemplo células acinares, impidiendo así la secreción de enzimas digestivas activadas por dichas células. Véase la patente de EE. UU. N.º 6.843.998, o neuronas aferentes sensoriales, impidiendo así la liberación de neurotransmisores, citocinas y péptidos del dolor y, por tanto, proporcionando alivio del dolor, véase la patente de EE. UU. N.º 6.395.513.

10

- Además, patente de EE. UU. N.º 7.422.877 divulga la creación de derivados de neurotoxina quimérica que comprenden, por ejemplo, el dominio de unión y el dominio de translocación (o versiones modificadas de los mismos) de un subtipo de neurotoxina, por ejemplo, BoNT/A, y la región de cadena ligera de otro subtipo de neurotoxina, por ejemplo, BoNT/E. Se verá que dada la homología estructural general entre los subtipos de neurotoxinas, cualquier combinación de los tres dominios de neurotoxinas clostrídicas básicos, se puede fabricar en una única cadena de aminoácidos (o en moléculas bicatenarias escindidas). Por lo tanto, por ejemplo, un dominio de unión de cualquiera de los subtipos de neurotoxina A, B, C1, D, E, F, G o TeTX puede combinarse independientemente con un dominio de translocación de los subtipos de neurotoxina A, B, C1, D, E, F, G o TeTX, y adicionalmente combinarse de forma independiente con un dominio endopeptidasa de cualquiera de los subtipos de neurotoxina A, B, C1, D, E, F, G o TeTX. Esto puede hacerse, por ejemplo, mediante construcción y expresión recombinantes y de una única cadena quimérica que se escinde posteriormente para producir la toxina bicatenaria, o mediante expresión separada de cadenas H y L únicas, que luego se combinan, por ejemplo, mediante la creación de un enlace disulfuro entre cadenas y posteriormente se purifica. Además, usando dichas técnicas, la actividad de varios dominios puede alterarse (por ejemplo, pueden introducirse mutaciones en un dominio LC para destruir la actividad proteasa de la LC), o los dominios naturales pueden reemplazarse por otros restos, como se describe en otra parte de esta invención, donde, por ejemplo, el dominio HC de BoNT/A (o una parte del mismo) está mutado o eliminado y se ha unido un ligando dirigido (TL).

- 30 Cuando se habla de los tres dominios de neurotoxina generales de cada subtipo de neurotoxina clostrídica (unión, translocación y endopeptidasa), se entenderá que la investigación de la neurotoxina clostrídica es un campo bien desarrollado, y la correlación de las secuencias de aminoácidos que comprende cada uno de estos dominios con sus funciones es bien conocida. Se entenderá que la referencia a cada uno de estos términos ("dominio de translocación", "dominio de unión" y "proteasa", "endopeptidasa", "LC" o "cadena ligera") incluye los dominios correspondientes contenidos en cualquiera de los aminoácidos. secuencias ácidas de subtipos de neurotoxina clostrídica enumeradas en la SEQ ID NO: 7-14 como se enumera en la Tabla 2, así como variantes modificadas de forma conservadora y optimizadas de estas secuencias o dominios dentro de estas secuencias.

- Además, también se conoce la subdivisión de estos dominios generales en subdominios. Por ejemplo, la subdivisión del dominio de unión H<sub>C</sub> en subdominios H<sub>CN</sub> (la parte amino terminal del dominio, que corresponde aproximadamente a los aminoácidos 871-1091 de BoNT/A) y H<sub>CC</sub> (la parte carboxi terminal del dominio H<sub>C</sub>, que corresponde aproximadamente a los aminoácidos 1092-1296 de BoNT/A) también es bien conocido. Véase, p. ej. Lacy DB and Stevens RC, Sequence Homology and Structural Analysis of the Clostridial Neurotoxins, 1999, J. Mol. Biol. 291:1091-1104. El subdominio H<sub>CN</sub> está muy conservado entre los subtipos de toxina botulínica, sin embargo, se sabe poco sobre su función. El subdominio H<sub>CC</sub> está menos conservado.

45

- Además, se conocen las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de cada uno de estos dominios y subdominios y se han desvelado en esta memoria descriptiva, y por lo tanto se puede hacer uso de la presente divulgación en combinación con el conocimiento del código genético, las secuencias de nucleótidos que codifican una proteína a expresar. Sería, por supuesto, una cuestión de rutina para un experto en la materia a la vista de esta memoria descriptiva, visualizar inmediatamente otras secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos indicados. Además, debido a la redundancia del código genético, es posible un número finito de secuencias de nucleótidos para cada polipéptido. Además, está claro que pueden sintetizarse ácidos nucleicos que comprenden variantes modificadas conservadoramente de estas secuencias de nucleótidos (o partes únicas de ellas) en la región de homología que contienen no más del 10 %, 8 % o 5 % de diferencias de pares de bases de una referencia secuencia.

50

- Además, se entenderá que las secuencias de aminoácidos expuestas en la Tabla 2 y en otros lugares en esta memoria descriptiva o en la lista de secuencias asociada proporciona una divulgación completa de cualquiera y todas las secuencias de nucleótidos que codifican estas secuencias de aminoácidos y en las regiones indicadas de los mismos. Una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio endopeptidasa, dominio de translocación o

60

dominio de unión (incluyendo cualquier subdominio) de un subtipo de neurotoxina dado puede tener respectivamente 60 % o más, o 65 % o más, o 70 % o más, o 75 % o más, u 80 % o más, u 85 % o más, o 90 % o más, o 95 % o más, o 100 % de identidad con cualquiera de dichas regiones de secuencia de aminoácidos de referencia enumeradas en la Tabla 2 o en otra parte.

5

Las neurotoxinas botulínicas se expresan mediante células clostrídicas que también producen una o más "proteínas asociadas a neurotoxina" que no son toxinas o NAP que se asocian no covalentemente con la neurotoxina para formar complejos de hemaglutinina, también conocidos como complejos progenitores. Estos NAP ayudan a la neurotoxina a resistir la degradación de la proteasa en el intestino cuando se ingiere en alimentos contaminados.

10

Las proteínas NAP incluyen tres proteínas (HA1, HA2 y HA3) de hemaglutinina (HA), y una proteína no hemaglutinina no tóxica (NTNH). Los tipos A2, E y F de BoNT no tienen los genes HA, y solo producen un complejo 12S (aproximadamente 300 kDa) que comprende BoNT y NTNH. "S" representa la unidad Svedberg, una unidad de velocidad de sedimentación centrífuga. Los tipos B, C y D producen complejos 12S y 16S (aproximadamente 500 kDa); el complejo 16S incluye BoNT, NTNH, HA1, HA2 y HA3. El tipo A1 tiene los complejos 12S y 16S más un complejo 19S de aproximadamente 900 kDa, que puede representar un dímero de complejos 16S.

15

En la actualidad, los complejos BoNT/A1 y B-hemaglutinina se han aprobado para dichos usos clínicos. Los beneficios terapéuticos del complejo BoNT/A1 son más persistentes que los de BoNT/B debido a que su proteasa tiene una vida útil más larga en las neuronas.

20

Como se indicó anteriormente, BoNT consiste en un dominio de cadena ligera asociada a la proteasa (LC), que está unida a una cadena pesada (HC) a través de un único enlace covalente disulfuro y enlaces no covalentes adicionales. Un resto carboxi terminal (C-terminal) de HC (H<sub>C</sub>) se une a sus aceptores específicos expresados en varios tipos de nervios, incluyendo las neuronas motoras, autonómicas y sensoriales. Cuando se une a una célula diana, la molécula de BoNT se transporta a las vesículas por endocitosis; la mitad amino terminal (N-terminal) de HC (H<sub>N</sub>) forma un canal que permite que la LC se transloque desde vesículas de membrana de tipo "endosomal" hacia el citosol. Posteriormente, la LC escinde un sustrato de la proteína SNARE específico, destruyendo de este modo la capacidad de SNARE para mediar la fusión de vesículas y membranas y, por lo tanto, la liberación de neurotransmisores, citocinas y péptidos del dolor de la célula.

30

Las LC de los diversos serotipos de BoNT son similares, pero no idénticos, y dos LC diferentes pueden escindir diferentes proteínas SNARE, o escindir la misma proteína SNARE de forma diferente. Por ejemplo, LC/A, LC/C y LC/E escinden la SNAP-25; LC/B, LC/D, LC/F y LC/G escinde la sinaptobrevina-2 (VAMP-2); adicionalmente, LC/C escinde la sintaxina, otra proteína SNARE que se ha informado que es necesaria para la división celular. La LC de TeTx escinde la VAMP-2. Las LC de cada serotipo dividen su sustrato en una posición única en la molécula.

35

Por ejemplo, la cadena ligera de BoNT/A (LC/A) elimina 9 aminoácidos del C-terminal de SNAP-25, mientras que la LC/E elimina otros residuos 17 C-terminales y, por tanto, ofrece un bloqueo más disruptivo de la neuroexocitosis mediante la desestabilización de complejos SNARE estables (Meng et al., 2009; Wang et al., 2011). Por ejemplo, la inhibición de la liberación de neurotransmisores por LC/A generalmente puede revertirse elevando la afluencia de Ca<sup>2+</sup>, pero no en el caso de LC/E, presumiblemente debido a la mayor destrucción del sustrato de SNAP-25. Sin embargo, a pesar de la mayor "robustez" de la actividad por LC/E, debido a que LC/E induce solo una parálisis neuromuscular transitoria corta, sus aplicaciones clínicas son limitadas.

45

Es altamente deseable para crear un agente terapéutico que tenga nuevas propiedades. Por ejemplo, los tratamientos en los que dos o más endopeptidasas de cadena ligera derivadas de más de un serotipo pueden combinarse en un derivado de BoNT o TeTx en el que cada cadena ligera está activa y reconoce una secuencia de aminoácidos diferente en su sustrato, la proteína SNARE puede diseñarse para afecciones como dolor crónico, afecciones inflamatorias crónicas (incluida la artritis) y/o afecciones que implican la liberación de citocinas.

50

En un ejemplo, un agente terapéutico se diseña la combinación de la proteasa potente de LC/E combinada con la acción de larga duración de LC/A. Esto es particularmente importante para mejorar la eficacia de BoNT/A para el tratamiento del dolor crónico, incluyendo cefaleas tensionales/migrañas y enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis porque el complejo BoNT/A por sí solo es efectivo en algunos, pero no en todos, dichos pacientes. Véase p. ej., Naumann M. et al. (2008) ASSESSMENT: BOTULINUM NEUROTOXIN IN THE TREATMENT OF AUTONOMIC DISORDERS AND PAIN (AN EVIDENCE-BASED REVIEW): REPORT OF THE THERAPEUTICS AND TECHNOLOGY ASSESSMENT SUBCOMMITTEE OF THE AMERICAN ACADEMY OF NEUROLOGY, Neurology 70:1707-1714. El bloqueo de la exocitosis de los factores asociados al dolor, como las proteínas del dolor y las citocinas, puede ser útil para tratar el dolor crónico, el dolor neuropático y las afecciones inflamatorias.

55

60

BoNT/A no es capaz de bloquear la liberación exocitótica de péptidos estimulantes del dolor [p. ej., péptido relacionado con el gen calcitonina (CGRP) y la sustancia P] a partir de las neuronas sensoriales al ser provocada por la activación de TRPV1 (receptor de potencial transitorio Vallinoid 1), un canal de catión involucrado en la señalización de la mayoría de las formas de dolor (Meng et al., 2007; Meng et al., 2009).

BoNT/E tampoco inhibe la liberación de CGRP y sustancia P en neuronas sensoriales mediada por TRPV1 estimulada por capsaicina, debido a que su aceptor de superficie celular (proteína 2A de vesículas sinápticas glicosiladas (SVP2A) y SVP2B glicosilada) es escasa o está ausente en las neuronas sensoriales. Sin embargo, una proteína quimérica en la que el H<sub>C</sub> (dominio de unión al receptor) de BoNT/E es reemplazado por su homólogo de BoNT/A es capaz de bloquear la liberación de estos péptidos mediadores del dolor, lo que indica que el receptor de superficie celular BoNT/A facilita la endocitosis y la administración de LC/E en fibras C nociceptivas.

Una vez dentro de la neurona, la proteasa LC/E, elimina 26 residuos de aminoácidos de la SNAP-25, evitando así la formación de un complejo SNARE estable requerido para neuroexocitosis (Meng et al., 2009). Aunque la LC/A también escinde la SNAP-25, solo escinde 9 residuos de aminoácidos y el bloqueo de la actividad exocitótica es menos completa y estable.

Para hacer práctico explotar clínicamente una característica tan ventajosa de la proteasa LC/E, es deseable extender considerablemente su duración de acción.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Fig. 1** es un esquema para la creación de una neurotoxina compuesta creando una construcción génica que codifica una LC/E activa unida al resto LC/A N terminal de BoNT/A a través de un engarce, para generar neurotoxina compuesta LC/E- BoNT/A, que contiene dos proteasas activas.

La **Fig. 2A** es una foto de electroforesis en SDS-PAGE que muestra la purificación de los marcados con His6 ("His6" desvelada como SEQ ID NO: 15) construcción de LC/E-BoNT/A mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC), usando resina Superflow de Talon® (fabricada por Clontech Laboratories, Inc.), una resina de agarosa cargada con Co<sup>2+</sup> que tiene un alto grado de selectividad para la etiqueta His6 (SEQ ID NO: 15).

La **Fig. 2B** muestra la absorbancia y la conductividad frente al tiempo en un perfil de elución de fracciones de IMAC que contienen LC/E-BoNT/A posteriormente sometidas a cromatografía de intercambio catiónico.

La **Fig. 3** es una fotografía de electroforesis en SDS-PAGE que muestra el tratamiento de LC/E-BoNT/A purificada con trombina biotinilada para crear toxina de doble cadena y eliminar la etiqueta His6 (SEQ ID NO: 15). Los símbolos + y - respectivamente indican el tratamiento con o sin el agente ditiotretol (DTT) para reducir el enlace disulfuro que une las cadenas LC/E-LC/A y HC/A.

La **Fig. 4** es una foto de bandas Western en la que se analizan diluciones en serie de BoNT/A (gel superior) y LC/E-BoNT/A (gel inferior) para determinar su capacidad para escindir la proteína SNARE SNAP-25 en neuronas granulares de cerebelo de rata cultivado (CGN).

La **Fig. 5** muestra la duración de la parálisis muscular en el músculo gastrocnemio inyectado con LC/E-BoNT/A, BoNT/E o BoNT/A, en el que la dosis máxima tolerada (TD<sub>máx</sub>) se representa en función del tiempo en días.

La **Fig. 6A** es una foto de una banda Western en la que se incuban diluciones en serie de LC/E-BoNT/A con TGN de rata (neuronas ganglionares del trigémino) durante la noche, después se ensayaron los lisados usando anticuerpos anti-SNAP-25 y anti-syntaxina para la capacidad de LC/E-BoNT/A para escindir la SNAP-25 (principalmente para proporcionar el producto de escisión de la SNAP-25 truncada de 26 residuos producido por LC/E), pero sin syntaxina.

La **Fig. 6B** es una curva de respuesta a la dosis por LC/E-BoNT/A que muestra a) la escisión de la SNAP-25 y b) la inhibición de la liberación de CGRP provocada por 60 mM KCl o c) la capsaicina en TGN de rata, y el fracaso de BoNT/A para reducir significativamente la liberación de CGRP provocada por la capsaicina en los TGN incubados con BoNT/A.

La **Fig. 7A** es una curva de la duración de la actividad antinociceptiva en un modelo de rata, la prueba de lesión nerviosa residual (SNI), en animales tratados con solución salina, BoNT/A o LC/E-BoNT/A, seguido de la colocación de la pata en una placa fría (4 °C) y midiendo el tiempo requerido para que la rata retire su pata de la placa, llevada a cabo desde 4 días antes de la cirugía hasta aproximadamente 21 días después de la cirugía.

La **Fig. 7B** es una curva de la duración de la actividad antinociceptiva en un modelo de rata, la prueba de lesión nerviosa residual (SNI) en animales tratados con solución salina, BoNT/A o LC/E-BoNT/A, seguida de la medición de la alodinia inducida por sensibilidad a la aplicación de filamentos von Frey calibrados en la superficie plantar de la pata trasera, llevada a cabo desde 4 días antes de la cirugía hasta aproximadamente 21 días después de la cirugía.

La **Fig. 8A** es un esquema de un polipéptido de doble proteasa de la presente invención. Este polipéptido inactiva dos proteínas SNARE diferentes: VAMP por LC/B y SNAP-25 por LC/A. Un gen de LC/B sintético se fusiona con el extremo 5 terminal de BoNT/A a través de una secuencia de engarce (que codifica residuos "DI") para generar la

neurotoxina compuesta LC/B-BoNT/A. Este último también contiene dos secuencias de reconocimiento de trombina. La **Fig. 8B** es gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie que ilustra la purificación de LC/B-BoNT/A etiquetado con His<sub>6</sub> por IMAC, utilizando resina Superflow de Talon® (fabricada por Clontech Laboratories, Inc.).

La **Fig. 8C** es SDS-PAGE de LC/B-BoNT/A purificada por IMAC después del tratamiento con trombina biotinilada para crear toxina bicatenaria (DC). Los símbolos + y - respectivamente indican tratamiento con o sin el agente reductor ditiotritol (DTT).

La **Fig. 8D** muestra una banda Western de un gel de SDS-PAGE en el que se incuban diluciones en serie de LC/B-BoNT/A con CGN de rata a 37 °C durante 24 h. Después se analizan los lisados utilizando anticuerpos anti-SNAP-25 y anti-VAMP 2 para controlar la escisión de la toxina de las dos proteínas SNARE SNAP-25 y VAMP 2. La sintaxina 1, probada por su anticuerpo específico y no reconocida por LC/B o LC/A, actuó como un control de carga interno.

La **Fig. 8E** muestra curvas de dosis/respuesta para LC/B-BoNT/A que muestra la escisión de la SNAP-25 (rectángulo) y VAMP 2 (triángulo invertido) a concentraciones más altas de la construcción LC/B-BoNT/A.

La **Fig. 9** es otro ejemplo de la presente invención en la que un candidato terapéutico de escisión de múltiples SNARE tiene la capacidad de inactivar los tres tipos principales de proteínas SNARE: SNAP-25 y sintaxina 1-3 por LC/C1 y VAMP1-3 por LC/D. DI es un enlazador entre LC/D and LC/C1.

La **Fig. 10A** muestra una curva de la duración de la actividad antinociceptiva en un modelo de rata, la prueba de lesión nerviosa residual (SNI), en animales tratados con solución salina, PK (LC/E-BoNT/A), o pregabalina seguida de la estimulación de la pata con filamentos de Von Frey y medición del umbral mecánico para que la rata retire su pata, llevada a cabo desde 4 días antes de la cirugía hasta aproximadamente 21 días después de la cirugía.

La **Fig. 10A** muestra una curva de la duración de la actividad antinociceptiva en un modelo de rata, la prueba de lesión nerviosa residual (SNI), en animales tratados con solución salina, PK (LC/ E-BoNT/A fabricada utilizando procesos adaptados para la producción conforme a GMP), o pregabalina seguida de de la colocación de la pata en un frío (4 °C) y midiendo el tiempo requerido para que la rata retire su pata de la placa, llevada a cabo desde 4 días antes de la cirugía hasta aproximadamente 21 días después de la cirugía.

La **Fig. 11** muestra una curva de la duración de la actividad antinociceptiva en un modelo de rata, la prueba de lesión nerviosa residual (SNI), en animales tratados con solución salina o PK (LC/E-BoNT/A fabricado usando procesos adaptados para la producción conforme a GMP) seguido de estimulando la pata con filamentos de Von Frey y midiendo el umbral mecánico para que la rata retire su pata, llevada a cabo desde 4 días antes de la cirugía hasta aproximadamente 36 días después de la cirugía. Se realizó una segunda inyección de PK para un grupo de animales el día 10 después de la cirugía.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a composiciones relacionadas con moléculas de polipéptidos terapéuticos derivados de neurotoxinas botulínicas como se define en la reivindicación 1. En particular, las moléculas comprenden al menos dos dominios de endopeptidasa activa derivados de las cadenas ligeras de diferentes serotipos de BoNT. Muy preferentemente, los dominios de endopeptidasa reconocen y escinden diferentes secuencias de aminoácidos en su sustrato. Los dominios de endopeptidasa se derivan de dos o más serotipos de BoNT.

La capacidad de combinar una cadena pesada de una BoNT seleccionada con al menos dos dominios diferentes de la endopeptidasa de la cadena ligera clostrídica activa proporciona moléculas terapéuticas diseñadas que tienen propiedades mejoradas y personalizadas. Dichos tratamientos se ejemplifican primero por el diseño y la creación de una construcción génica que codifica un compuesto de dos serotipos de BoNT diferentes, y la expresión/purificación procariota de la proteína recombinante que muestra actividades biológicas sinérgicas y múltiples con aplicaciones terapéuticas.

El bloqueo de exocitosis mediante dichos tratamientos multi-endopeptidasas puede tener actividades aditivas como por ejemplo bloquear el tráfico de receptores sensibles al dolor a la superficie de las neuronas sensoriales. Por lo tanto, dichos tratamientos no solo inhiben la exocitosis de factores sinápticos solubles, sino que también pueden inhibir el tráfico de proteínas que son integrales a la membrana neural.

En ciertos tratamientos no ilustrados en la sección de Ejemplos el dominio de unión natural se puede alterar de manera que el tratamiento se redirija a un tipo de célula diferente o adicional. Por ejemplo, en la patente de EE. UU. 6.776.990 Aoki et al., la región de unión de BoNT se reemplaza por colecistoquinina humana, o un análogo de la misma, dirigiendo así la toxina (que tiene solo una sola endopeptidasa) a células acinares pancreáticas. De forma similar, en el N.º de serie de la solicitud de patente n.º 13/644,386, depositada el 4 de octubre de 2012, un ligando dirigido reemplaza el dominio de unión natural en ciertos ejemplos. En un ejemplo de un gen que codifica el antagonista del receptor de interleuquina-1 humana (IL-1RA) se utiliza para reemplazar la región H<sub>C</sub> natural o parte de la misma, dirigiendo así las células secretoras de citocinas.

La molécula actualmente preferida que ejemplifica la invención se basa en un concepto novedoso para la creación de construcciones de ácido nucleico que expresan una proteína que comprende la LC de BoNT/E fusionada al resto de LC/A del recombinante activo de BoNT/A usando procedimientos de biología molecular. Esta molécula única comprende LC/E-BoNT/A (que se muestra en la Fig. 1) que se une a receptores BoNT /A neuronales (p. ej., la proteína 2 y/o gangliósidos vesiculares sinápticos), se somete a endocitosis mediada por receptor y se transloca al citosol, donde la proteína SNARE SNAP-25 se escinde eficazmente, lo que da como resultado la inhibición de la liberación de neurotransmisores, citocinas y péptidos del dolor. Por "se escinde eficazmente" se entiende que la mayoría de las moléculas de SNAP-25 tienen un número suficiente de aminoácidos escindidos para impedir la reversión del bloqueo exocitótico al elevar el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , por ejemplo, como los resultados de la escisión de la SNAP-25 por LC/E.

Las construcciones mencionadas anteriormente se diseñan preferentemente para contener una corta secuencia que codifica los residuos de aminoácidos específicos, situados entre HC y LC de /A, que se reconocen y escinden selectivamente por una proteasa trombina, por lo la proteína recombinante monocatenaria (SC) obtenida se puede convertir a la forma bicatenaria (DC) *in vitro* por exposición a trombina.

Muy preferentemente, la presente invención se ejemplifica por LC/E vinculado al resto de LC/A de BoNT/A a través de un engarce de dos aminoácidos (por ejemplo, ácido-isoleucina aspártico; DI), proporcionando una novedosa toxina compuesta. En experimentos que implican la exposición de neuronas sensoriales a esta construcción, se demostró que las proteasas se liberaban dentro de las neuronas cultivadas, y la LC/E unida se estabilizó lo que, a su vez, produjo neuroparálisis de larga duración como LC/A.

Es importante destacar que, a diferencia de LC/A, esta molécula de acción prolongada produce principalmente productos proteolíticos característicos de LC/E y bloquea la liberación de los mediadores del dolor evocados por capsaicina de neuronas sensoriales cultivadas de rata, debido a la incapacidad de las SNAP-25 escindidas de /E de mediar en la liberación de neurotransmisores, citocinas y péptidos dolorosos. Además, esta proteína compuesta demostró ser más eficaz que la LC/A sola en la atenuación del comportamiento del dolor en un modelo de rata de dolor neuropático (nervio residual inducido por la lesión).

La molécula quimérica ejemplar ofrece por lo tanto grandes ventajas como un tratamiento para el tratamiento del dolor crónico: (a) un tiempo de vida muy deseable y muy prolongado de la proteasa E de acción transitoria, en virtud de los motivos de retención/estabilización del terminal nervioso presentes en la LC/A unida; (b) la escisión predominante de la SNAP-25 por la proteasa /E desestabiliza los complejos SNARE y (c) la inhibición de la exocitosis mediada por TRPV1 de los péptidos del dolor de las neuronas sensoriales. Estos nuevos hallazgos resaltan el potencial antinociceptivo de esta proteína de ingeniería patentada que exhibe efectos compuestos sinérgicos. Sus ventajas sobre la primera generación de BoNT naturales se han demostrado de manera concluyente y, por lo tanto, deberían conducir tratamientos mucho mejores.

Debido a que los BoNT nativos tienen solo un dominio de proteasa, el concepto innovador de la administración de un LC adicional -que o bien escinde el mismo sustrato en una posición diferente (u otro sustrato)- no solo aumenta significativamente sus propiedades inhibitorias, sino la influencia estabilizadora adicional de la LC/A original dando como resultado una acción sinérgica sorprendente, a saber, una duración del beneficio terapéutico muy extendida en comparación con la BoNT/E.

En otros ejemplos, un tratamiento multi-endopeptidasa diferente se ejemplifica por una construcción de una construcción de ácido nucleico LC/B-BoNT/A usando las técnicas empleadas para la construcción del ácido nucleico LC/E-BoNT/A. Al momento de la expresión del polipéptido codificado por el marco de lectura abierto LC/E-BoNT/A, y el corte de los sitios de trombina, la proteína resultante escinde tanto SNAP-25 como VAMP-2. La escisión de dos proteínas SNARE involucradas en el complejo ternario de fusión sináptica puede resultar más efectiva.

De acuerdo con un concepto general de la invención, se proporciona una composición que comprende un derivado de neurotoxina clostrídica, comprendiendo dicho derivado de neurotoxina clostrídica un polipéptido que incluye: un dominio de unión, un dominio de translocación, un primer dominio endopeptidasa, y un segundo dominio endopeptidasa, donde cada uno de dicho primer dominio endopeptidasa y dicho segundo dominio endopeptidasa tiene una actividad proteolítica selectiva contra, y reconoce un sitio de escisión diferente en, una proteína SNARE como se define en la reivindicación 1.

Los ácidos nucleicos que utilizan esta composición de concepto general también se contemplan como se define en la reivindicación 10. Además, una composición terapéutica que comprende un derivado de neurotoxina clostrídica,

comprendiendo dicho derivado de neurotoxina clostrídica un polipéptido que incluye: un dominio de unión, un dominio de translocación, un primer dominio endopeptidasa, y un segundo dominio endopeptidasa, en donde cada uno de dicho primer dominio endopeptidasa y dicha segunda endopeptidasa dominio tiene una actividad proteolítica selectiva contra, y reconoce un sitio de escisión diferente en, una proteína SNARE para uso en el tratamiento del dolor crónico también se contempla como se define en la reivindicación 12. Adicionalmente, el uso de una composición terapéutica que comprende un derivado de neurotoxina clostrídica, comprendiendo dicho derivado de neurotoxina clostrídica un polipéptido que incluye: un dominio de unión, un dominio de translocación, un primer dominio endopeptidasa, y un segundo dominio endopeptidasa, en donde cada uno de dicho primer dominio endopeptidasa y dicho segundo dominio endopeptidasa tiene una actividad proteolítica selectiva contra, y reconoce un sitio de escisión diferente en, una proteína SNARE para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor crónico también se contempla como se define en la reivindicación 14.

De acuerdo con la invención, se proporciona una composición que comprende un derivado de neurotoxina clostrídica, comprendiendo dicho derivado de neurotoxina clostrídica un polipéptido que incluye:

- a) un dominio de unión,
  - b) un dominio de translocación, y
  - c) un primer dominio endopeptidasa derivado de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/A, y
  - d) un segundo dominio endopeptidasa derivado de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/E;
- en el que cada uno del primer dominio endopeptidasa y el segundo dominio endopeptidasa es proteolíticamente activo.

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende un derivado de neurotoxina clostrídica, comprendiendo dicho ácido nucleico un solo marco abierto de lectura que codifica, en la secuencia de carboxi terminal a amino terminal: un dominio de unión, un dominio de translocación, un primer dominio endopeptidasa derivado de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/A, y un segundo dominio endopeptidasa derivado de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/E; en el que cada uno del primer dominio endopeptidasa y el segundo dominio endopeptidasa es proteolíticamente activo.

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona una composición terapéutica que comprende un derivado de neurotoxina clostrídica, comprendiendo dicho derivado de neurotoxina clostrídica un polipéptido que incluye: un dominio de unión, un dominio de translocación, un primer dominio endopeptidasa derivada de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/A y un segundo dominio endopeptidasa derivado de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/E para su uso en el tratamiento del dolor crónico; en el que cada uno del primer dominio endopeptidasa y el segundo dominio endopeptidasa es proteolíticamente activo. De acuerdo con otra realización más de la invención, se proporciona una composición terapéutica que comprende un derivado de neurotoxina clostrídica, comprendiendo dicho derivado de neurotoxina clostrídica un polipéptido que incluye: un dominio de unión, un dominio de translocación, un primer dominio endopeptidasa derivada de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/A, y un segundo dominio endopeptidasa derivado de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/E para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor crónico en el que cada uno del primer dominio endopeptidasa y el segundo dominio endopeptidasa es proteolíticamente activo.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

Un gen BoNT/A sintético, que tiene sus codones optimizados para la expresión mejorada en *E. coli* y tres nucleótidos extra (AAA) que codifican residuo de Lys, se clonó en los sitios Nde I y Sal I de un vector pET29a de expresión procariota (+) para producir pET-29a-BoNT/A.

Después, pET-29a-BoNT/A se modificó más para proporcionar la capacidad de corte específico controlado y eliminación simultánea de la etiqueta hexahistadina (His6 (SEQ ID NO: 15)) codificada por el vector de clonación pET-29a. Una secuencia de nucleótidos que codifica sitios de escisión de trombina se modificó por ingeniería genética en la región de ácido nucleico que codifica el bucle HC/LC de la toxina. Esto se muestra a continuación tanto en forma de ácido nucleico como de aminoácido, como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente.

**Secuencia de nucleótidos del bucle BoNT/A modificada (SEQ ID NO: 1) y su secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 2)**

Sitio de corte de la trombina



C V R G I I T S K T K S L V P R G S N K A L N D L C  
 TGTGTCCGCGGTATTATCACCAGCAAAACCAATCC**TTGGTGCCCCGCGGCTCT**AACAAGGCGCTCAATGATTATGC

Además, se insertó un sitio de trombina adicional entre las regiones que codifica las regiones HC/A y His6 (SEQ ID NO: 15) de la proteína expresada. Esto se muestra a continuación tanto en forma de ácido nucleico como de aminoácido, como SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente.

**Secuencia de nucleótidos fusionada al extremo 3' del gen BoNT/A (SEQ ID NO: 3) y su secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 4)**

Sitio de corte de la trombina

1  
 K V D K L L V P R G S K L Q L E H H H H H H \*

AAAGTCGACAAGCTT**CTGGTACCGCGCGGCAGCAAACTGCAGCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA**

1

Sal I HindIII Pst I Xho I

10

La secuencia de nucleótidos proporcionada anteriormente contiene las siguientes regiones, de izquierda a derecha, respectivamente:

- 15 a) nucleótidos 1-3: se insertó un codón AAA que codifica Lys adicional para proporcionar un sitio de escisión de tripsina opcional, para eliminar el His6 C-terminal (SEQ ID NO: 15);
- b) subrayado único: Sitio de endonucleasa de restricción Sal I;
- c) subrayado doble: Sitio de endonucleasa de restricción Hind III
- d) negrita: secuencia de reconocimiento de trombina;
- 20 e) subrayado único: Sitio de endonucleasa de restricción Pst I;
- f) subrayado doble: Sitio de endonucleasa de restricción Xho I;
- g) nucleótidos 49-66: región de nucleótidos que codifica la etiqueta His6 (SEQ ID NO: 15). Las secuencias de aminoácidos alineadas se muestran por encima de los nucleótidos correspondientes. La flecha indica el sitio de escisión de la trombina, y el asterisco señala el codón de "terminación" traslacional.

25

Esta construcción de ácido nucleico, que comprende el marco de lectura abierto BoNT/A descrito anteriormente, y que comprende tanto la SEQ ID NO: 1 como la SEQ ID NO: 3, se denominó pET29a-BoNT/A-2T.

- 30 Un producto PCR (amplicón) se amplificó a partir de un ácido nucleico sintético que codifica la proteasa LC/E (residuos 1-411), y dos sitios de restricción (Nde I y Eco RV) se incorporaron durante la amplificación en el extremo 5' y 3' del amplicón de ácido nucleico, respectivamente. Este amplicón de PCR se digirió después con Nde I y Eco RV y se clonó en el vector pET29a(+), también digerido con Nde I y Eco RV. La construcción del vector intermedio resultante se denominó pET29a-LC/E.

- 35 La región del gen de BoNT del marco de lectura abierto "monocatenario" intacta mencionada anteriormente se amplificó por PCR usando pET29a-BoNT/A-2T como plantilla con un par de cebadores (un cebador reverso terminal del bacteriófago T7 y un cebador directo que contiene una secuencia de restricción EcoRV en dirección la secuencia codificadora 5' de BoNT/A). El amplicón de PCR resultante se digirió mediante las enzimas EcoRV y Xho I, se purificó y se insertó en el plásmido pET29a-LC/E escindido con Eco RV y Xho I. Esta construcción final se denominó
- 40 pET29a-LC/E-BoNT/A, y el marco de lectura de ácido nucleico abierto se divulga como SEQ ID NO: 5, mientras que la secuencia de aminoácidos correspondiente se divulga en esta invención como SEQ ID NO: 6.

### Ejemplo 2

- 45 Para la expresión de LC/E-BoNT/A, la construcción de la secuencia verificada se transformó en la cepa de *E. coli*

- BL21 (DE3), y al expresar la proteína diana se indujo usando medio de autoinducción de Studier (Studier, F.W., 41 Protein Expr. Purif. 207 (2005)). La purificación parcial (~60%) de la proteína etiquetada de His6 (SEQ ID NO: 15) en el lisado de bacterias se logró con el cromatógrafo de afinidad de metal inmovilizado ( $\text{Co}^{2+}$ ) (IMAC), usando resina Superflow de Talon. Una proteína principal de Mr~200 kDa se eluye por imidazol mayor que o igual a 50 mM; esto  
 5 se demuestra en la **Fig. 2A**, que muestra SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie del gel. Los carriles de gel son los siguientes: Carril 1: lisado limpio antes de la aplicación a la columna IMAC; Carril 2: fracción de flujo de columna IMAC; Carril 3: fracción de lavado de columna IMAC; Carriles 4-9, fracciones eluidas usando imidazol de la columna IMAC.
- 10 Las fracciones eluidas de IMAC extraído eran un intercambio de tampón en tampón de 0,02 M de fosfato de sodio (pH 6,5), y después se purificó adicionalmente mediante la carga en una columna de intercambio catiónico UNO-S1, seguido de lavado con NaCl hasta 150 mM, y después la elución con un gradiente de NaCl; la toxina se eluyó con concentraciones de NaCl iguales o superiores a 220 mM. La **Fig. 2B** muestra el perfil de elución (absorbancia a 280 nm) del polipéptido monocatenario LC/E-BoNT/A en función del tiempo, con el aumento de la conductividad del  
 15 gradiente de NaCl superpuesto. La flecha muestra la ubicación del pico de absorbancia que contiene LC/E-BoNT/A.

### **Ejemplo 3**

- Después del intercambio del tampón de la toxina intacta eluida en 25 mM de HEPES/145 mM NaC (pH 7,4), la  
 20 proteína monocatenaria purificada ("SC") se almacenó a -80 °C, y se tomaron alícuotas para el análisis SDS-PAGE. La **Fig. 3** muestra los resultados de reducir (+) y no reducir (-) SDS-PAGE y el análisis de inmunotransferencia tipo Western del polipéptido purificado, confirmando que esta proteína purificada se expresó en una forma SC, como lo revela una banda única que migra con un peso molecular aparente de aproximadamente 200 kDa. Esta banda se observó en ausencia o presencia de agente reductor. Véase p. ej. los carriles SC (-) y SC (+) de la fotografía del gel  
 25 teñido con Coomassie Brilliant Blue de la **Fig. 3**.

- El corte de este polipéptido SC se intentó por incubación con trombina biotinilada (1 unidad/mg de proteína) a 22 °C durante 3 horas; la proteasa trombina se elimina después tratando la muestra con agarosa estreptavidina. Aparece una banda que tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 100 KDa después del tratamiento con  
 30 trombina de la proteína en muestras procesadas en un gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras; la banda de ~200 KDa no se ve en estas condiciones, pero está presente en geles ejecutados en condiciones no reductoras, mientras que la banda de ~100 KDa está ausente en estas últimas muestras. Véase p. ej. los carriles DC (-) y DC (+) de la fotografía del gel teñido con Coomassie Brilliant Blue de la **Fig. 3**.

- 35 La banda de ~100 KDa se cree que representa tanto las cadenas LC/E-LC/A como HC/A, que tienen tamaños similares. Las identidades de los polipéptidos en esta banda se confirman mediante inmunotransferencia tipo Western de geles de SDS-PAGE ejecutados en LC/E-BoNT/A cortado y sin cortar usando anticuerpos específicos contra cada uno de los polipéptidos monocatenarios postulados LC/E y BoNT/A.
- 40 Como se muestra en la **Fig. 3**, la muestra cortada continúa migrando a ~200 kDa en ausencia de agente reductor, lo que indica que había formado el enlace disulfuro entre cadenas entre LC/E-LC/A y HC/A, y persiste, en todas las muestras como se muestra en los carriles de las bandas Western marcadas (-) y desarrolladas usando anticuerpos anti-LC/E o anti-BoNT/A. Por lo tanto, la SDS-PAGE y la inmunotransferencia tipo Western en condiciones reductoras y no reductoras resaltan el corte específico en la región del bucle que se produce sin degradación de la  
 45 toxina compuesta. Una ligera diferencia en la movilidad de la proteína no cortada y cortada se debe a la eliminación de la etiqueta His6 (SEQ ID NO: 15) en las muestras tratadas con trombina; esto se confirmó usando un anticuerpo específico contra esta etiqueta. Véase la banda Western usando el anticuerpo anti-His6 (SEQ ID NO: 15) de la **Fig. 3**, en el que la etiqueta His6 (SEQ ID NO: 15) es indetectable. Por lo tanto, este experimento también demostró que la trombina proteasa puede cortar simultáneamente la toxina entre los residuos de cisteína unidos del enlace  
 50 disulfuro entre el HC y el primer LC, y eliminar la etiqueta His6 (SEQ ID NO: 15).

### **Ejemplo 4**

- LC/E-BoNT/A y BoNT/A producidos recombinantemente fueron cada uno incubados durante la noche a  
 55 concentraciones diluidas serie de 10 veces de 0,01 pM a 1000 pM de toxina con neuronas cultivadas de gránulos cerebelosos de rata (CGN). Estas células se disocian del cerebelo de ratas de 7-8 días y se suspenden a aproximadamente  $1 \times 10^6$ /ml en 3 partes de medio de Eagle basal y 1 parte de HEPES-NaOH 40 mM, pH 7,3, KCl 78,4 mM, 37,6. D-glucosa mM,  $\text{CaCl}_2$  2,8 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,6 mM y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,0 mM, así como 1 suplemento de N2, L-glutamina 1 mM, penicilina 60 unidades/ml, estreptomycin 60 µg/ml y 2 % (v/v) de suero de caballo dializado. Se  
 60 agrega una alícuota (1 ml) de esta suspensión celular a cada pocillo recubierto con poli-D-lisina de 16 mm de

diámetro (es decir formato de 24 pocillos) y se agrega citosina-β-D-arabinofuranosida (40 μM) después del cultivo durante 20-24 h en 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub>; las neuronas se mantienen por reemplazo cada 10 días con el mismo medio recién preparado. Cuando se especifica, las neuronas se exponen a BoNT/A o LC/E-BoNT/A (0,2 μm esterilizadas por filtración) en medio de cultivo durante 24 h.

Después de 24 h de incubación con la proteína BoNT/A o LC/E-BoNT/A, las células se recogen y se someten a SDS-PAGE e inmunotransferencia tipo Western usando un anticuerpo anti-SNAP-25 que reconoce la SNAP-25 intacta, así como la SNAP-25 escindida por LC/A como la SNAP-25 escindida por LC/E. La sintaxina 1 de la proteína SNARE se usó como un control de carga interno positivo.

Se realizó la inmunotransferencia tipo Western usando anticuerpo anti-SNAP-25. Como se puede ver en la **Fig. 4**, LC/E-BoNT/A fue casi tan activo como BoNT/A en la escisión de la SNAP-25 intacta, produciéndose una escisión significativa a concentraciones de toxina superiores a 1 pM en cada caso. Notablemente, como se puede observar, el tratamiento de CGN con LC/E-BoNT/A también proporciona un producto de escisión de LC/A cuando se utiliza por debajo de aproximadamente 1 pM de toxina. Este producto de escisión ("SNAP-25<sub>A</sub>") parece escindirse sustancialmente además en el producto de escisión de LC/E ("SNAP-25<sub>E</sub>") por la proteasa LC/E coadministrada cuando las concentraciones de la toxina LC/E-BoNT/A se elevan por encima de aproximadamente 0,01 nM (**Fig. 4**). Estos resultados sugieren que el dominio de translocación de cadena pesada BoNT/A es capaz de administrar la proteasas LC/A y LC/E unidas covalentemente al citosol de CGN, donde las proteasas permanecen activas para escindir SNAP-25, inactivando total o parcialmente la proteína SNARE.

#### **Ejemplo 5**

La neurotoxicidad específica de LC/E-BoNT/A se determina por inyección intraperitoneal en ratones de la manera descrita en Maisey, E. A., et al., 177 EUR. J. BIOCHEM. 683-691(1988). La cantidad más baja de toxina que mata al 50 % de los ratones en 4 días se define como una dosis letal mínima (mLD50). La actividad específica de las toxinas se puede expresar como el número de mLD50 en unidades/mg de toxina.

La mLD50 de la preparación de LC/E-BoNT/A se observa que es  $0,7 \times 10^8$ . Esta actividad específica se encuentra entre la observada para BoNT/E recombinante ( $0,4 \times 10^8$ ) y la observada para BoNT/A recombinante ( $2 \times 10^8$ ). Se evaluó la duración de la acción neuromuscular *in vivo* usando un ensayo de puntuación de abducción digital en ratones (DAS), descrito en, p. ej., Aoki, KR, 39 TOXICON 1815-1820 (2001).

La LC/E-BoNT/A recombinante se inyecta en el músculo gastrocnemio de ratón a una dosis de 0,5 unidades de la mLD<sub>50</sub>, que es la dosis máxima tolerada que puede administrarse a animales de experimentación, sin producir síntomas sistémicos. Esta dosis de LC/E-BONT/A causó parálisis durante aproximadamente 27 días; similar al efecto inducido por 6 unidades de BoNT/A nativa; véase la **Fig. 5**. La acción de larga duración de la proteína LC/E-BONT/A en comparación con la BoNT/E aparentemente se debe a la capacidad del resto de la LC/A en la proteína de fusión para estabilizar el resto de la LC/E unido; BoNT/E solo proporciona una parálisis mucho más corta que otras toxinas; véase la comparación de BoNT/E frente a LC/E-BoNT/A en la **Fig. 5**.

#### **Ejemplo 6**

Se examinó el potencial antinociceptivo de la proteína LC/E-BONT/A utilizando neuronas ganglionares del trigémino (TGN). Estas células son un buen modelo para este experimento debido a su implicación en la propagación del dolor y al hecho de que estas células en cultivo proporcionan un buen modelo para investigar la liberación de péptidos del dolor (CGRP, SP) activados por diferentes estímulos; véase p. ej., Baccaglini and Hogan, 80 PROC NATL ACAD SCI U.S.A. 594-598 (1983). La capsaicina, aislada de los chiles, activa el TRPV1, que se expresa principalmente en la fibra C de las neuronas sensoriales. Por lo tanto, la capacidad de la toxina compuesta para bloquear la liberación de CGRP provocada por su agonista, la capsaicina, debería ser una buena indicación de su actividad inhibitoria.

BoNT/A solo elimina 9 residuos de aminoácidos desde el extremo C terminal de la proteína SNARE SNAP-25 (el producto de escisión de SNAP-25 truncado en /A), y no afecta a la exocitosis de CGRP provocada por la capsaicina en las TGN. Por el contrario, la eliminación de 17 residuos adicionales por la proteasa LC/E (que da como resultado el producto de escisión de SNAP-25 truncado en /E) bloquea esta liberación de CGRP estimulada por capsaicina; véase p. ej., Meng et al., 29 J NEUROSCI 4981-4992 (2009).

Dado que el producto de escisión de la SNAP-25 principal de la toxina de acción prolongada, LC/E-BoNT/A, es el producto de escisión de SNAP-25 truncado en /E, en lugar del producto de escisión de SNAP-25 truncado en /A en los CGN (véase la **Fig. 4**), se espera que LC/E-BoNT/A bloqueará la liberación del péptido del dolor CGRP.

Brevemente, las TGN se extraen de ratas Wistar de 5 días postnatales después de haber sido profundamente anestesiadas con una inyección intraperitoneal de Dolethal (50 mg/kg de peso corporal). El tejido se coloca en medio L15 helado y después se lava dos veces en CMF-HBSS estéril helada antes de la centrifugación a 170 g durante 1 minuto. Después de trocear el tejido en piezas pequeñas y pasarlas a través de pipetas Falcon de 10 ml prerrecubiertas con medio L15, el tejido se incuba con agitación a 37 °C durante 30 minutos en una mezcla 1:1 de solución salina balanceada de Hanks exenta de calcio y magnesio (CMF-HBSS) que contiene 2,4 U/ml de dispasa II y 1 mg/ml de colagenasa I. Después, la suspensión se tritura suavemente a través de pipetas Falcon de 10 ml prerrecubiertas con medio L15 hasta que estén turbias, antes de añadir 1 mg/ml de DNasa I durante 15 minutos.

Después de la centrifugación a 170 g durante 5 minutos, el sedimento celular se suspendió y se lavó tres veces en medio de cultivo [solución F12 de Ham (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) que contiene 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina]. Las células se siembran en placas de 24 pocillos prerrecubiertas con poli-L-lisina (0,1 mg/ml) y laminina (20 µg/ml) en medio F12 suplementado con factor de crecimiento nervioso (NGF) (50 ng/ml) y se mantienen en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Después de 24 horas (y todos los días a partir de entonces), el sobrenadante de cultivo se reemplaza por medio de cultivo nuevo que contiene el agente antimitótico citosina-β-D-arabinofuranosida (10 µM).

Después de la incubación durante la noche de las TGN de rata a 37 °C con diluciones en serie de LC/E-BoNT/A, la extensión de la escisión se monitoriza mediante SDS-PAGE seguida de inmunotransferencia tipo Western usando un anticuerpo anti SNAP-25-anticuerpo capaz de unirse a intactos, así como productos truncados en A y truncados en E.

Como se muestra en la **Fig. 6A**, LC/E-BoNT/A da una escisión dependiente de la dosis de la SNAP-25 con principalmente productos de escisión SNAP-25 truncados en /E.

Además, como se esperaba, los bloques de toxina compuestos de la liberación de CGRP por las TGN evocada por 60 mM KCl o capsaicina en una manera dependiente de la dosis (**Fig. 6B**). La liberación de CGRP dependiente de Ca<sup>2+</sup> se estimula mediante tratamiento con 60 mM KCl en HBS (balanceado isotónicamente con NaCl). Para la estimulación con capsaicina, se prepararon soluciones madre (1 mM) en etanol o dimetilsulfóxido, respectivamente, y se diluyeron en BR-HBS a las concentraciones requeridas. En todos los casos, la concentración final del vehículo se mantiene en 0,1 %; esto también se incluye en BR-HBS cuando se mide el flujo basal.

Las células se estimularon con K<sup>+</sup> o capsaicina y se monitorizó la liberación de CGRP durante 30 min. Para determinar las cantidades de CGRP liberados, se añadió 0,1 ml de muestra a placas de 96 pocillos recubiertas con un anticuerpo monoclonal contra CGRP, y se realizó inmunoensayo enzimático siguiendo las instrucciones para el kit.

Los resultados muestran la capacidad del polipéptido LC/E-BoNT/A para inhibir la liberación de péptidos del dolor desde grandes vesículas de núcleo denso, mientras que el tratamiento celular similar con BoNT/A no pudo inhibir la liberación de CGRP de la activación del canal de cationes TRPV1. Véase la **Fig. 6B**.

### Ejemplo 7

La actividad antinociceptiva de LC/E-BoNT/A se evaluó en un modelo de rata de persistente dolor neuropático periférico, a saber, el ensayo de lesión nerviosa residual (SNI). Este modelo se basa en la observación de que prácticamente todo el dolor neuropático (excepto el caso especial del dolor del miembro fantasma, causado por una lesión completa por amputación) es el resultado de una lesión nerviosa parcial. Estos dolores neuropáticos incluyen neuropatía diabética, neuralgia posherpética, neuropatías tóxicas, neuropatías por compresión y traumatismo, y se caracterizan por lancinante espontáneo, dolor ardiente y dolor tipo shock, así como hipersensibilidad al dolor que incluye alodinia táctil, hiperalgesia por pinchazo e hiperpatía.

La cirugía de SNI se realiza en ratas adultas anestesiadas (como por ejemplo ratas Spague-Dawley), e implica la ligadura y transección de dos de las tres ramas distales terminales del nervio ciático (los nervios tibiales y peroneos comunes), que dejan la tercera rama (el nervio sural) intacta; véase Decosterd, I. & Woolf, C.J., 87 PAIN 580-587 (2000). Este modelo tiene la ventaja de ser técnicamente fácil de realizar y está sujeto a una variabilidad mínima en el grado de daño producido.

Las toxinas se inyectan en el lado plantar (palma) de la extremidad posterior distal. Las dosis máximas intraplantares de LC/E-BoNT/A y BoNT/A (sin afectar la función locomotora) se encuentran entre 75 y 15 unidades/Kg de LD50 en

ratón, respectivamente. Las ratas con SNI muestran un comportamiento similar al dolor neuropático de larga duración en contraste con las ratas de control simulado (que están sujetas a la exposición del nervio ciático sin ninguna lesión).

- 5 Los dos modelos de dolor neuropático son pruebas de alodinia al frío y la alodinia mecánica. En la primera prueba, la de la hipersensibilidad al frío, la pata operada se pone en contacto con una placa fría a 4 °C, y la duración de la retirada de la pata se registra en varios momentos, como se indica en la **Fig. 7A**. Como una medida de la modulación de hipersensibilidad al frío, los valores postratamiento se expresan como un porcentaje de los valores de pretratamiento.

- 10 Como muestra la **Fig. 7A**, la hipersensibilidad al frío se reduce eficientemente por LC/E-BoNT/A durante 2 semanas después del tratamiento ( $P < 0,001$  en comparación con el tratado con solución salina), en particular para los primeros 10 días. El efecto antinociceptivo de LC/E-BoNT/A es significativamente mayor que el inducido por BoNT/A ( $P < 0,05$  a los 5 y 7 días después de la inyección). No se observa alodinia inducida por el frío en los controles  
15 simulados, ya sea que se administre toxina o solución salina.

En la segunda prueba, la alodinia mecánica se mide colocando al animal en una rejilla de alambre elevado, y la estimulación de la superficie plantar de la pata tratada con un conjunto de filamentos von Frey para determinar la cantidad de estimulación sensorial que se puede tolerar antes de dolor (indicado por una rápida retirada de la pata).

- 20 Los filamentos Von Frey (o monofilamentos) están calibrados para proporcionar una escala aproximadamente logarítmica de la fuerza real y una escala lineal de intensidad percibida. El umbral mecánico se expresa como el 50 % del promedio de gramos mínimos de fuerza necesarios para provocar la retirada de la pata.

Como se muestra en la **Fig. 7B**, los umbrales mecánicos se reducen drásticamente por la lesión del nervio

- 25 (comparación de los controles simulados con las ratas SNI a las que solamente se dio solución salina). Es alentador que LC/E-BoNT/A comience a revertir esta hipersensibilidad mecánica dentro de los 2 días posteriores a la inyección, y se observa un efecto analgésico máximo a los 7 días después del tratamiento. Se registraron umbrales mecánicos significativamente más altos que las ratas tratadas con solución salina de 3 a 10 días después de la inyección ( $P < 0,001$  frente a la solución salina). Además, aunque el tratamiento con BoNT/A induce un aumento  
30 modesto de los umbrales mecánicos posteriores a la lesión, se encuentra que LC/E-BoNT/A es significativamente más eficaz ( $P < 0,05$ ).

Ni la toxina ni la solución salina afectaron el comportamiento del dolor provocado por el frío y los estímulos mecánicos cuando se administraron a animales simulados (**Fig. 7A, B**). LC/ E-BoNT/A demostró ser mucho más  
35 eficaz que BoNT/A para reducir la duración de la retirada del frío (**Fig. 7A**) y, especialmente, aumentar el umbral de retirada mecánica (**Fig. 7B**). Es importante destacar que la inyección de LC/E-BoNT/A en ratas con SNI normalizó la sensibilidad al frío y los estímulos mecánicos en los días 3 y 7 a valores similares a los de todos los controles simulados. En resumen, LC/E-BoNT/A induce potentes efectos antinociceptivos en modelos de rata de dolor neuropático crónico.

40

### **Ejemplo 8**

El marco de lectura abierto de la neurotoxina sintética compuesta LC/E-BoNT/A y sus aminoácidos codificados (SEQ ID NO: 5 and 6, respectivamente) proporcionado a continuación contiene las siguientes regiones, respectivamente  
45 (identificadas con respecto a los residuos de nucleótidos): residuos 1-1233, LC/E; residuos 1240-5130, BoNT/A. La secuencia de ADN que comprende los nucleótidos (1234-1239) se introduce como un enganche y asegura el marco de lectura apropiado. Las secuencias de aminoácidos alineadas se muestran por encima de los nucleótidos correspondientes. Se inserta una secuencia de reconocimiento de trombina proteasa en el bucle entre LC/A y HN/A; de manera similar, se modificó por ingeniería genética otro sitio de trombina para que tuviera una secuencia de  
50 escisión en el sitio carboxi del gen BoNT/A; estos permiten el corte y eliminación simultáneos del His6 C-terminal (SEQ ID NO: 15).

### **La secuencia del gen compuesto de neurotoxina (LC / E-BoNT / A) y sus aminoácidos codificados (SEQ ID NO: 5 Y 6)**

55

|    |                                                                                   |     |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|
|    | M P K T N S F N Y N D P V N D R T T L Y T K F G G C Q                             |     |
| 1  | ATGCCIAAAATCAATTCGTTCAACCTAATGACCCGCTTAACCAATCCACCAATCCCTGTATATCAAGCCAGGTCGATGTCA | 60  |
|    | F F Y K S F N T M K N T W T T P E R N V T G C T P Q D                             |     |
| 81 | AGAAGTTCACAAATCATCCAAACATCATGAAAAATATTGGATTATCCCGGAACGCAACGTGATCGGCACGACGGCTCAAG  | 160 |

F H P P T S L K N G D S S Y Y D F N Y L Q S D F E K  
 161 ATTTCAGGCGCGGAGCTGCTGAAAAATGCGGAGAGTTCCTATATGACCGCAATTATCTCAACCGGACGAAAGAAAA 240  
 D R F L K I V L K L F N K I N N N L S G G L L L E E L  
 241 GATCGTTTCTTCAAGATCGTCACGAAAAATTTTCAACCGCATCAATAACAATCTGCGCGGTGGCATCTTACCTGAGGAATT 320  
 S K A N P Y L G N D N T P D N Q F E I G D A S A V E I  
 321 ATCTAAAGCTAATCCCTATCTGGGGAACGATAAATACCGCGGAAATCAGTTCACATTCGCGCATGCGAGCGCTCTGCGAAA 400  
 K F S N G S Q D I L L P N V I I Y G A E F D L F E I  
 401 CTAAATTCAGCAACGGCAGTCAAGATATTCTCTGCGCAACGCGGATTATCATGGGCGCTGAACCTGATCTCTTCGAAACT 480  
 N S S N T S L R N N Y M P S N H G F G S I A I V T F S  
 481 AATAGTTCGAATTTTCAGTGGCGAATAATTACATGCGGTGGAACGATGCGTTTGGCTGAATCGAAITGCGAGCTCTCTC 560  
 P E Y S F R F N D N S M N E F T Q D F A I T L M H F L  
 561 AAGTCATATAGTTTTCGTTCTCAACGACAAAGCATGAATTAACCTTATCGAAGAGTGGCGGTGCAITTCAGCTACGCAAC 640  
 L H S L H G L Y S A K S L F L K Y T I T Q K Q N P L  
 641 TGTATCATAGCTTTCAGCGCGCTGATGCGCGTAAAGGATCATCTACCAAAATACAGCATTACGCAAAAAAGAAATCGCTTA 720  
 I T N I R G T N I E E P L T F G G T D L N I I T S A Q  
 721 ATCAGCAACALCGCGCGCACCAACATTCAGCAATTTTCAGCTTTCGCGCGCAACCGCATCTCAAGCAACATTCAGCTTTCGCGCA 800  
 S K D I Y T N L L A E Y K K I A S K L S K V Q V S N P  
 801 AAGCAACGACATCTATACCAATCTCTTACGAGATTATAGAAAAATCGCGAGCAAAATTCCTAAAGTTCAGCTACGCAATC 880  
 I L K P Y K E V F E A K Y G L D K E A S G I Y S V N  
 881 CGCTGTAAACCGGTATATAAGATGTCTTCSAAGCGAATACGGCTTGGACAAAGAGCGTAGTGGCATCTATTCTCGCTCAAT 960  
 I N K F N D I F K K L Y S F T E F D L A T K E Q V K C  
 961 ATTAATAAAGCTAAGCATATCTTCAAAAAATCATATTCCTTCAACGAACTTGACCTGCGCAATCAAAITTCAGCTCAAAATC 1040  
 R Q T Y I G Q Y K Y F K L S N L L N D S I Y N I S E G  
 1041 TCGTCAAAAGCTATATTCGCGCAAAATCAAAATATCTTAAACGAGCAACCGCTTAAAGATTCGATCTCAAAATATTCAGTGAAG 1120  
 Y N I N K L K V K E R S Q N A N I N F R I I T F I T  
 1121 GTTACCAATATTAATAAGCTGAAAGTTAACTTCTGCTGGCGAAAAATGCGAAGCTGAAGCTGGGATCATTAACGAGCTACAG 1200  
 G R G L V K K I I R F D I M P E V N K Q F N Y K D P V  
 1201 GGGCGTGGCTTGGTCAAAAAATTAATCGCTTTCGATATTCAGCGCTTCGTAACCAACAGTTCACATATAAAGACCGAGT 1280  
 N G V D I A Y I K I P N A G Q M Q P V K A F K I H N K  
 1281 CAACGGCGGTGGACATTCGCTATATCAAAATTCGCAATCGCGGTCAAAATGCGAGCGCGTGAAGCATTTAAATTCGATTAACA 1360  
 I W V L E E R D T F T N P E E G D L N F P P P E A K Q  
 1361 AAATTTGGGTGATCGCGGAGCGCGATACGTTTCAGCAACCGCGGAAGAAGGAGATTTAAACCGACCGCTGAGGCTAAAGAG 1440  
 V P V S Y Y D S T Y L S T D N E K D N Y L K Q V I K L  
 1441 GCGCGGTGCTTACIATGATAGCACAACCTGAGTACCGGACAAAGAAAAGGACAACATCCCTGAAGGCTGTACCAAACT 1520  
 F E R I Y S T D L R Y L L I S I V R G I P F W G G S  
 1521 GTTTCAGTGGCATTTATTCGACAGATCTCGGTGCGATGCTCTGAGCTTCATTTCTGCGCGGATCTGCTTTTGGGCTGGTA 1600  
 T T D T E I K V I D T N C I N V I Q F E G S Y R S E  
 1601 CGAGCATCGATACAGAACTGAAAGTCACTGACAGCAACCTGCAATCTGATTCAGCTGATCGAGCTAGTCTGCTTAA 1680  
 E L N L V I I G G E S A D I I Q F E C K S F G H E V L N  
 1681 GAGCTAAACCTGCTAATCATTCGCGCGGACCGCGGATATTAATCAATTCGCAATCTAAATCTTTCGCGCATGAAGCTCTGAA 1760  
 L T R N G Y G S T Q Y I R F S F D F T F G L E E S L E  
 1761 TCTGAGCGGGAATGCTATGGATCGACCGAGTATATTGCTTTCTCTCCAGATTTCAGATTTCGACTTGAAGAAAGCGCTCG 1840  
 V E T N P L L G A S K E A T D P A V T L A H E L I H  
 1841 AAGTGAATAGCAACCTCTCTTAAAGCGCGGAAAAATTCGCGAGCGAACCAGCGGTGACCTTGGCACAAGAACCTTATTCAT 1920  
 A G E R L Y S I A I N E N R V E K V N T N A Y Y E M S  
 1921 GCGCGGATCGCTTCTATGCAATCGCATTAACCGCAACCGCTGTTTTCAAGGTGAATACGAACCGCTATTACGAGATCTC 2000  
 G L E V S F E F L R T F S G E D A K F I D S L Q E N E

# ES 2 671 493 T3

2001 GGGCTTAGAAGTGTCTTTGAAGAACTGCGCACGTTTGGCGGTCATGATGCAAAATTTATTGATAGTCTGCAAGAAAACG 2080

2081 F R L Y Y Y N K F K D I A S T L N K A K S I V G T T  
AATTTGCGGTGTAATTAACAATAAATCAAAGACATTGCATCAACCTTAAACAAGGCGAAAAGCATTGTGGGTACCAG 2160

2161 A S L Q Y M K N V F K E K Y L L S E D T S G K F S V D  
GCTAGCTTACAATATATGAAAACGTTTCAAAGAAAATACTCCTTAGCGAAGACACTTCCGCAAAATCTCTGTGCA 2240

2241 K L K F D K L Y K M L T E I Y T E D N F V K F F K V L  
TAAACTGAAATTTGATAAACTGTATAAAATGCTCACCGAGATCTACACAGAGGATAACTTTGTCAAATCTTCAAGGTCT 2320

2321 N R K T Y L N F D K A V F K I N I V P K V N Y T I Y  
TGAATCGGAAAACCTATCTGAACCTTCGATAAAGCCGCTTTAAGATCAACATCGTACCGAAAAGTTAACTACACCATCTAT 2400

2401 D G F N L R N T N L A A N F N G Q N T E I N N M N F T  
GATGGCTTTAATCTGCGCAATACGAATCTGGCGGCGAACTTTAACGGCCAGAACACCGAAATCAACAACATGAACCTTAC 2480

2481 K L K N F T G L F E F Y K L L C V R G I I T S K T K S  
TAAACTGAAAAATTTTACCGGCTTGTGTAATTTATAAGCTCCTGTGTGTCCGCGGTATTATCACCAGCAAAACCAAAT 2560

Sitio de corte de la trombina  
↓  
**L V P R G S** N K A L N D L C I K V N N W D L F F S P

2561 CCTTGGTGCCCCGCGCTCTAACAAGGCGCTCAATGATTTATGCATCAAGGTGAACAACCTGGGACTTGTTTTTCTCTCCA 2640

2641 S E D N F T N D L N K G E E I T S D T N I E A A E E N  
TCTGAAGATAATTTTACTAAGCACTTGAACAAAGGAGAGGAATTAATCTCCGATACCAACATCGAAGCAGCGGAAGAGAA 2720

2721 I S L D L I Q Q Y Y L T F N F D N E P E N I S I E N L  
TATTAGCCTGGATCTTATTCACAATATTACCTGACCTTTAATTTTGATAACGAGCCTGAGAACATTTCCATTGAGAATC 2800

2801 S S D I I G Q L E L M P N I E R F P N G K K Y E L D  
TCAGCTCTGACATCATCGGCCAGCTGGAAGTATGCGCAATATCGAACGCTTTCCCTAATGGAAAGAAATATGAATTGGAC 2880

2881 K Y T M F H Y L R A Q E F E H G K S R I A L T N S V N  
AAATACACCATGTTCCACTATCTCCGCGCGCAGGAGTTTGAGCACGGCAAGTCTCGTATTGCTCTGACCAATTCCGTAAA 2960

2961 E A L L N P S R V Y T F F S S D Y V K K V N K A T E A  
CGAAGCCCTTTTAAATCCTTCGCGTGTGTACACCTTTTCTCAAGCGATTATGTTAAAAAAGTGAACAAGGCGACCGAAG 3040

3041 A M F L G W V E Q L V Y D F T D E T S E V S T T D K  
CGGCGATGTTTTGGGATGGGTGGAACAACTGGTATATGACTTTACGGATGAAACTTCTGAAGTCTCGACACCGACAAAA 3120

3121 I A D I T I I I P Y I G P A L N I G N M L Y K D D F V  
ATTGCCGATATTACCATATATTCCTATATTGGCCCTGCACTGAACATTGGTAACATGCTGTATAAAGATGATTTTGT 3200

3201 G A L I F S G A V I L L E F I P E I A I P V L G T F A  
GGGCGCCCTGATCTTTTCAGGCGCTGTTATCCTGCTGGAATTTATCCCGGAAATCGCCATTCCAGTACTCGGTACCTTTG 3280

3281 L V S Y I A N K V L T V Q T I D N A L S K R N E K W  
CGCTGGTGTCTATATCGCAACAAAGTTTGTACTGTCCAGACGATCGACAACGCGCTCAGTAAACGTAACGAAAAATGG 3360

3361 D E V Y K Y I V T N W L A K V N T Q I D L I R K K M K  
GATGAGGTGTATAAGTATATTGTTACCAACTGGCTCGCTAAAGTAAACACCCAGATTGACCTGATTGCGAAGAAGATGAA 3440

3441 E A L E N Q A E A T K A I I N Y Q Y N Q Y T E E E K N  
AGAAGCGCTGGAACCAAGCAGAAGCGACCAAGCTATTATCAACTATCAATATAACCAGTACAGAGGAAGAAAAAGA 3520

3521 N I N F N I D D L S S K L N E S I N K A M I N I N K  
ATAACATCAACTTCAACATCGACGACTTATCTTCAAAGCTGAATGAATCTATTAACAAAGCGATGATTAATATTAACAAG 3600

3601 F L N Q C S V S Y L M N S M I P Y G V K R L E D F D A  
TTCTTGAACCAATGTAGTGTGCTATCTGATGAACGATGATCCCATATGGTGTGAAACGCTCTGGAAGACTTCGATGC 3680

3681 S L K D A L L K Y I Y D N R G T L I G Q V D R L K D K  
AAGCCTTAAAGATGCCCTTCTGAAGTATATTTACGATAATCGCGGAACCTCTTATGGCCAAGTGGATCGCTTAAAGATA 3760

3761 V N N T L S T D I P F Q L S K Y V D N Q R L L S T F  
AAGTCAACAACACGCTGAGTACAGACATCCCTTTTACGCTGTCTAAATATGTGGACAATCAGCGCCTGCTGTCCACGTTT 3840

T E Y I K N I I N T S I L N L R Y E S N H L I D L S R

```

3841  ACGGAATACATCAAAAACATCATCAACACTAGTATTCTGAACTTGGCTTACGAGAGTAACCATCTGATTGATCTGAGCCG 3920
      Y A S K I N I G S K V N F D P I D K N Q I Q L F N L E
3921  TTACGCATCTAAAATCAACATCGGCTCGAAGGTGAACCTTCGATCCTATCGACAAAAACCAGATTCAATTGTTCAACTTAG 4000
      S S K I E V I L K N A I V Y N S M Y E N F S T S F W
4001  AATCGTCAAAGATTGAAGTTATCTTAAAAAATGCGATTGTATATAATTCAATGTACGAAAAATTTCTCTACGAGCTTTTGG 4080
      I R I P K Y F N S I S L N N E Y T I I N C M E N N S G
4081  ATTCGTATTCCGAAATATTTCAACAGTATCTCTTTAAACAACGAGTATACTATCATCAATTGTATGGAGAATAACAGCGG 4160
      W K V S L N Y G E I I W T L Q D T Q E I K Q R V V F K
4161  GTGGAAGTGAAGCTTAACTATGGTGAATCATCTGGACTTGCAGGACACTCAAGAAATTAACAACGCGTGGTGTGTTA 4240
      Y S Q M I N I S D Y I N R W I F V T I T N N R L N N
4241  AATACTCACAGATGATTAACATCTCGGATTATTAATCGCTGGATTTTGTGACAATTACTAACAACCGGCTGAACAAC 4320

      S K I Y I N G R L I D Q K P I S N L G N I H A S N N I
4321  AGCAAAATTTACATTAACGGTGCCTGATCGATCAGAAACCAATCAGTAATCTCGGTAACATTACGCATCGAATAATAT 4400
      M F K L D G C R D T H R Y I W I K Y F N L F D K E L N
4401  CATGTTCAAACCTGGATGTTGTGCGGACACGACCGTTACATTTGGATCAAATACTTCAATTTATTCGACAAAGAATCTCA 4480
      E K E I K D L Y D N Q S N S G I L K D F W G D Y L Q
4481  ACGAAAAGGAGATTAAGSATCTTTATGACAATCAGTCTAATTCGGGTATTCTGAAAGACTTTTGGGGTGATTACCTTCAG 4560
      Y D K P Y Y M L N L Y D P N K Y V D V N N V G I R G Y
4561  TACGATAAACCGTATTATATGTTAAACTTATATGATCCGAATAAATACGTTGACGTCAACAACGTTGGCATTGCTGGCTA 4640
      M Y L K G P R G S V M T T N I Y L N S S L Y R G T K F
4641  TATGTATCTGAAAGGGCCGCGTGGCAGCGTGATGACCACCTAACATTTACTTAAACTCCTCCCTCTATCGCGGTACTAAAT 4720
      I I K K Y A S G N K D N I V R N N D R V Y I N V V V
4721  TTATTATCAAGAAATATGCCTCTGGCAACAAGGACAATATCGTACGCAATAACGATCGCGTCTACATTAACGTGGTGGTG 4800
      K N K E Y R L A T N A S Q A G V E K I L S A L E I P D
4801  AAGAATAAAGAAATATCGTCTGGCGACCAATGCTAGTCAGGCGGGCGTGGAGAAAATTCTGTCTGCACTTGAAATCCCGGA 4880
      V G N L S Q V V V M K S K N D Q G I T N K C K M N L Q
4881  TGTGGGTAATTTATCCAGGTGGTTGTGATGAAAAGTAAAAATGACCAAGGGATCACCATAAATGCAAAATGAATCTGC 4960
      D N N G N D I G F I G F H Q E N N I A K L V A S N W
4961  AAGATAACAACGCAACGACATTGGTTTTATCGGCTTCCACCAATTCAATAATATCGCGAAACTGGTGGCCTCAAATTGG 5040
      Y N R Q I E R S S R T L G C S W E F I P V D D G W G E
5041  TACAACCGTCAGATTGAGCGCAGCTCCCGCACTTTAGGCTGTAGCTGGGAGTTCATTCCGGTAGATGACGGTTGGGGAGA 5120
5120

      Sitio de corte de la trombina
      ↓
      R P L K V D K L L V P R G S K L Q L E H H H H H H *
5121  ACGGCCATTGAAAGTCGACAAGCTTCTGGTACCGCGCGGCAGCAAACTGCAGCTCGAGCACCAACCACCACCACCTGA 5199

```

Este ejemplo de la presente invención aborda al menos dos problemas principales que presenta el estado de la técnica. En primer lugar, proporciona una quimera de BoNT de larga duración que ha ampliado el potencial 5 terapéutico antinociceptivo. En segundo lugar, proporciona una terapia terapéutica derivada de BoNT de larga duración con un potencial único para la terapia del dolor crónico.

El tratamiento del dolor crónico plantea un desafío importante para la asistencia sanitaria moderna porque quienes la padecen representan más del 20 % de la población adulta. Una proporción sustancial de la población no responde a 10 los analgésicos de uso común. Además, el aumento de la dependencia y el abuso a fármacos relacionados con la profusión de opiáceos recetados, y la corta vida media de muchos analgésicos en la mayoría de los casos originalmente recetados para el dolor, hace que el uso de opiáceos y fármacos antiinflamatorios no esteroideos sean opciones poco atractivas.

15 Los usos terapéuticos de complejo BoNT/A resultaron beneficiosos para algunos, pero no todos los pacientes con

migraña, debido a una interferencia postulada con las vías del dolor. El fracaso de BoNT/A para atenuar la activación neuronal provocada por un péptido del dolor o la activación de TRPV1 de fibras C in situ y la incapacidad para bloquear la liberación de CGRP de neuronas cultivadas resalta que es esencial desarrollar formas duraderas y más ampliamente efectivas.

5

Una quimera de BoNT/A y BoNT/E derivada de BoNT entra en TGN con éxito, y da / E-como SNAP-25 productos de escisión que, a su vez, inhibe la liberación de mediadores del dolor; sin embargo, su corta duración de acción limita las aplicaciones clínicas.

- 10 La presente invención combina los dominios de al menos dos BoNT de diferentes serotipos juntos para producir nuevos tratamientos. Esta estrategia innovadora se puede usar para generar otros tratamientos quiméricos multicatenarios, que incluyen construcciones que comprenden LC múltiples de diferentes serotipos de BoNT para producir tratamientos que tienen las propiedades deseadas; por ejemplo, un tratamiento de toxina de escisión de múltiples SNARE (escisión de diferentes proteínas SNARE), que puede construirse, por ejemplo, uniendo LC/C1 a
- 15 BoNT/A en lugar de LC/E.

### **Ejemplo 9**

- En otro ejemplo, se creó una construcción multi-endoropeptidasa mediante la sustitución del gen LC/E en el ácido nucleico LC/E-BoNT/A con un gen LC/B sintético para crear un plásmido de codificación final LC/B-BoNT/A como un
- 20 único marco de lectura abierto de una forma sustancialmente similar a la descrita anteriormente.

- Para la expresión de LC/B-BoNT/A, la construcción nucleica de la secuencia verificada se transformó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3), y la proteína resultante se expresó como se ha descrito previamente para LC/E-BoNT/A. Se logró
- 25 la purificación parcial de la toxina etiquetada His<sub>6</sub> a partir del lisado limpio de bacterias usando una etapa de separación de afinidad IMAC, utilizando resina de SuperFlow de Talon. Se eluyó una proteína principal de Mr~200k con imidazol  $\geq 150$  mM; esto se demuestra en la **Fig. 8B**, que muestra SDS-PAGE en condiciones reductoras y de tinción con azul Coomassie del gel. Los carriles de gel son los siguientes: Carriles 1: lisado limpio antes de la aplicación a la columna IMAC; 2: fracción de flujo de columna IMAC; 3: fracción de lavado de columna IMAC; 4-8,
- 30 fracciones eluidas usando imidazol.

- Se cambió el tampón del eluato IMAC extraído en HEPES 25 mM HEPES/145 mM NaCl (pH 7,4) y alícuotas analizadas por SDS-PAGE. La **Fig. 8C** muestra SDS-PAGE de la proteína purificada en la que alícuotas se sometieron a electroforesis en reducción (+) y no reducción (-). La electroforesis confirmó que la proteína realmente
- 35 se expresó en una forma monocatenaria ("SC"), como se revela por una banda principal que migra con un peso molecular aparente de aproximadamente 200 kDa. Esta banda se observó en ausencia o presencia de agente reductor. Véase p. ej. los carriles SC (-) y SC (+) del gel teñido con Coomassie Brilliant Blue en la **Fig. 8C**.

- El corte de esta proteína monocatenaria (y la eliminación de la etiqueta His<sub>6</sub>) se logró mediante la incubación de la
- 40 proteína con trombina biotinilada (1 unidad/mg de toxina) a 22 °C durante 3 h; después se elimina la trombina proteasa tratando la muestra con estreptavidina inmovilizada en agarosa. Dos bandas (no resueltas por SDS-PAGE debido a la similitud en la movilidad de las dos cadenas de proteínas) que tienen un peso molecular aparente de aproximadamente 100 K aparecen después del tratamiento con trombina de la proteína en muestras procesadas en un gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras; la banda de ~200 K no se ve bajo estas condiciones, pero está
- 45 presente en los geles que se ejecutan bajo condiciones no reductoras, mientras que las bandas de ~100 KDa están ausentes en estas últimas muestras. Véase p. ej. los carriles DC (-) y DC (+) del gel teñido con Coomassie Brilliant Blue en la **Fig. 8C**. La banda de ~100 KDa se cree que representa tanto las cadenas LC/E-LC/A como HC/A, que tienen pequeñas deferencias en el tamaño.

- 50 Se incubaron neuronas de gránulos cerebelosos (CGN) cultivadas en rata con LC/B-BoNT/A tratada con trombina a concentraciones diluidas en serie de 5 veces de 0,32 pM a 5000 pM. Después de 24 horas de incubación a 37 °C con LC/B-BoNT/A, las células se recogieron y se sometieron a SDS-PAGE e inmunotransferencia tipo Western, usando a) un anticuerpo anti-SNAP-25 que reconoce tanto SNAP-25 intacto como gran producto de escisión del tratamiento con LC/A, y b) un anticuerpo anti-VAMP2 que recoge la versión intacta. Se usó un anticuerpo anti-
- 55 syntaxina 1 para detectar la syntaxina 1 de la proteína SNARE, que se usó como un control de carga interno positivo. Las bandas Western representativas (**Fig. 8D**) y los datos cuantitativos (**Fig. 8E**) de múltiples bandas muestran que LC/B-BoNT/A escindió SNAP-25 así como VAMP2; sin embargo, VAMP2 se escindió eficazmente a concentraciones más altas de LC/B-BoNT/A. Sin desear estar limitado por la teoría, este resultado puede surgir de la captura de la toxina compuesta en la membrana a través de la LC de BoNT/A que reduciría la escisión de VAMP [Fernández-Salas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004, 101(9):3208-3213].
- 60

**Ejemplo 10**

Como se ilustra por los resultados funcionales positivos de LC/E-BoNT/A (dos proteasas activas que reconocen dos  
 5 secuencias diferentes del mismo sustrato) y LC/B-BoNT/A (dos proteasas que escinden dos sustratos diferentes), y  
 a la vista de la divulgación de esta solicitud de patente, un experto en la técnica sabrá que los ejemplos adicionales  
 de la presente invención pueden implicar composiciones y procedimientos para crear otros diversos agentes  
 terapéuticos multi-endopeptidasa mediante la combinación de diferentes neurotoxinas clostrídicas o subtipos de  
 neurotoxina clostrídica para inhibir la liberación de péptidos, citocinas y neurotransmisores del dolor de varios tipos  
 10 de nervios (p. ej., neuronas sensoriales y simpáticas). Además, la actividad de las acciones de la toxina multi-  
 proteasa bloquearía indirectamente la actividad por dichos mediadores de células liberadoras de citocinas.

Por ejemplo, se crea un único tratamiento que inactiva las tres proteínas SNARE se crea por fusión recombinante de  
 la cadena ligera de BoNT/D (LC/D) al N terminal de BoNT/C1 a través de un engarce (véase la **Fig. 9**). Brevemente,  
 15 un ácido nucleico que codifica la endopeptidasa de LC/D se inserta "en marco de lectura" en LC/E-BoNT/A para  
 reemplazar LC/E. El gen sintético que codifica LC/D está diseñado para tener codones optimizados para una  
 expresión óptima en *E. coli*. El plásmido resultante codifica una proteína intermedia que comprende LC/D-BoNT/A.

Posteriormente, se usa un gen sintético que codifica BoNT/C1 (como la construcción BoNT/A, con un sitio de  
 20 escisión de trombina en su región de bucle) para reemplazar el gen BoNT/A en LC/D-BoNT/A para proporcionar un  
 construcción de ácido nucleico final que comprende un marco de lectura abierto LC/D-BoNT/C1. El tratamiento de  
 LC/D-BoNT/C1 expresada, purificada y cortada tendrá capacidad para inactivar VAMP 1-3 por escisión con LC/D; la  
 proteasa LC/C1 escindiría la sintaxina 1-3 y la SNAP-25. Esta construcción será adecuada para el tratamiento del  
 dolor inflamatorio y neuropático crónico.

**Ejemplo 11**

Un hombre de 60 años de edad presenta dolor articular crónico grave en la cadera izquierda y tiene dificultad para  
 caminar. Después del examen, se diagnostica al paciente con artritis reumatoide de la articulación acetabulofemoral  
 30 (cadera).

Se administra al paciente una dosis efectiva de LC/E/BoNT/A derivada de la neurotoxina clostrídica por inyección  
 directamente el ganglio femoral y el ganglio ciático. La construcción génica se realiza como se describe  
 anteriormente y el derivado de la toxina clostrídica se purifica por afinidad después de la expresión de la misma  
 35 utilizando la etiqueta His<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 15), seguido del corte de trombina y el intercambio iónico y de cromatografía  
 de intercambio iónico antes de su uso.

En 48 horas, hay una mejora notable en la extensión y agudeza del dolor, y en una semana el paciente puede  
 caminar con poca dificultad.

**Ejemplo 12**

Una necesidad eventual proyectada de cantidades suficientes de LC/E/BoNT/A derivada de neurotoxina clostrídica  
 para uso humano necesita una plataforma de producción/purificación para la expresión y purificación de la proteína  
 45 LC/E-BoNT/A compatible con la producción en una buena instalación de buenas prácticas de fabricación (conforme  
 a GMP). La producción y purificación de la proteína LC/E-BoNT/A a mayor escala se realiza esencialmente como se  
 describe anteriormente en los experimentos de laboratorio. Este proceso produce un producto activado puro que  
 tiene el peso molecular aparentemente esperado (~200 kDa) en SDS-PAGE. Después de la reducción del enlace  
 disulfuro intercatenario, la cadena HC y la cadena LC/E-LC/A migran conjuntamente en un gel SDS PAGE reductor,  
 50 cada uno con un peso molecular aparente de aproximadamente 100 kDa; la tinción con Coomassie Brilliant Blue  
 revela un patrón de migración sustancialmente idéntico al que se muestra en la Fig. 3. LC/E-BoNT/A fabricado  
 utilizando procesos adaptados para la producción conforme a GMP se denomina "PK".

La actividad de la proteína GMP PK para escindir SNAP-25, y su neurotoxicidad específica en ratones, coinciden  
 55 con los de la misma proteína producida en laboratorio. De forma similar, el potencial anti-nociceptivo de PK se  
 demuestra por su capacidad de unirse y entrar en neuronas sensoriales que producen predominantemente SNAP-25  
 truncada en LC/E truncado e inhiben la liberación de CGRP estimulada por despolarización o capsaicina, como se  
 muestra repitiendo los experimentos del Ejemplo 6 con el material de PK, y obteniendo resultados sustancialmente  
 idénticos a los mostrados en la Fig. 6A y 6B.

Lo más importante, esta prometedora proteína PK, como la proteína LC/E-BoNT/A producida en laboratorio, también demuestra ser un igualmente un anti-nociceptivo robusto *in vivo*. Una inyección única de PK en una pata trasera de ratas en un modelo de lesión nerviosa residual (SNI) de dolor crónico (véase, p. ej., el Ejemplo 7 y las Fig. 7A y 7B) no afecta la actividad locomotora (como se cuantifica en un Rotarod) o induce cualquier efecto adverso detectable, pero mejora, durante un período prolongado de 14 días, la hipersensibilidad mecánica al nivel de control del grupo Sham. Además, un nivel elevado de alodinia al frío en el modelo SNI también se atenúa de manera similar, como lo indica una marcada disminución de la duración de la retirada. La inyección de vehículo de solución salina en animales operados mediante Sham no altera los niveles de control para los dos parámetros nociceptivos medidos en, por ejemplo, las Fig. 7A y 7B. La proteína PK alivia de manera convincente el nivel elevado de dolor.

Estos hallazgos demuestran ser reproducibles a partir de numerosos conjuntos de extensos experimentos con animales y resaltan la eficacia terapéutica *in vivo* de PK para revertir el dolor intenso debido a una lesión nerviosa grave, y revelan la insuficiencia de BoNT/A solo para el tratamiento del dolor, particularmente el dolor crónico.

### 15 **Ejemplo 13**

La alta eficiencia de este anti-nociceptivo similar a GMP novedoso se demuestra además por la evaluación en el modelo SNI de una sola inyección de PK (75 U/Kg) en relación con la administración diaria sistémica (I.P.) de 10 mg/Kg de pregabalina, un fármaco analgésico usado clínicamente como tratamiento de primera línea para el dolor neuropático, también se sabe que ejerce notables reacciones adversas y efectos analgésicos limitados en una proporción de pacientes.

De nuevo usando la lesión nerviosa residual (SNI) y los modelos de alodinia al frío de dolor crónico en ratas y la misma dosis de agentes activos que en el párrafo anterior, una sola inyección intraplantar de PK produce una duración del beneficio mucho más larga que la de pregabalina diaria que, a diferencia de PK, es incapaz de lograr significativamente la reversión de la hipersensibilidad mecánica (**Fig. 10A**) e induce una atenuación más modesta de la reactividad aumentada al frío (**Fig. 10B**). Una segunda inyección de PK prolonga su potente efecto analgésico tanto en la sensibilidad mecánica (**Fig. 11**) como en la alodinia al frío (no mostrada), produciendo un alivio del dolor significativamente superior al valor de referencia de control que dura más de 25 días después del tratamiento inicial.

La invención se describirá ahora mediante el siguiente conjunto de realizaciones (no reivindicadas) presentado a continuación en formato de reivindicación.

- 1) Una composición que comprende un derivado de neurotoxina clostrídica, comprendiendo dicho derivado de neurotoxina clostrídica un polipéptido que incluye: un dominio de unión, un dominio de translocación, un primer dominio endopeptidasa, y un segundo dominio endopeptidasa, donde cada uno de dicho primer dominio endopeptidasa y dicho segundo dominio endopeptidasa tiene una actividad proteolítica selectiva contra, y reconoce un sitio de escisión diferente en, una proteína SNARE.
- 2) La composición de la reivindicación 1, donde dichos dominio de unión, dominio de translocación, primer dominio endopeptidasa y segundo dominio endopeptidasa están comprendidos en una sola cadena polipeptídica.
- 3) La composición de la reivindicación 2 donde dicho polipéptido comprende además un sitio de escisión de endopeptidasa selectiva localizado entre una primera región que comprende dicho dominio de unión y dicho dominio de translocación, y una segunda región que comprende dichos primer dominio endopeptidasa y segundo dominio endopeptidasa.
- 4) La composición de la reivindicación 1, donde dichos dominio de unión, dominio de translocación, primer dominio endopeptidasa y segundo dominio endopeptidasa están comprendidos en más de una cadena polipeptídica.
- 5) La composición de la reivindicación 4, donde al menos dos de dichas cadenas polipeptídicas están unidas mediante un enlace disulfuro.
- 6) La composición de la reivindicación 1 comprende una primera cadena polipeptídica que comprende dicho dominio de unión y dicho dominio de translocación, y una segunda cadena polipeptídica que comprende dichos primer dominio endopeptidasa y segundo dominio endopeptidasa.
- 7) La composición de la reivindicación 5 comprende una primera cadena polipeptídica que comprende dicho dominio de unión y dicho dominio de translocación, y una segunda cadena polipeptídica que comprende dichos primer dominio endopeptidasa y segundo dominio endopeptidasa.
- 8) La composición de la reivindicación 1, donde el dominio de unión y el dominio de translocación se derivan de una primera neurotoxina clostrídica o un subtipo de neurotoxina clostrídica y donde al menos uno de dicho primer dominio endopeptidasa y dicho segundo dominio endopeptidasa se derivan de una segunda neurotoxina clostrídica o subtipo de neurotoxina clostrídica.
- 9) La composición de la reivindicación 8, donde el dominio de unión, el dominio de translocación y al menos uno de dicho primer dominio endopeptidasa y dicho segundo dominio endopeptidasa se derivan de una primera neurotoxina

clostrídica o un subtipo de neurotoxina clostrídica.

- 10) La composición de la reivindicación 9, donde el dominio de unión, dominio de translocación y dicho primer dominio endopeptidasa se derivan de una primera neurotoxina clostrídica o un subtipo de neurotoxina clostrídica, y dicho segundo dominio endopeptidasa se deriva de una segunda neurotoxina clostrídica o un subtipo de neurotoxina clostrídica.
- 11) La composición de la reivindicación 10 donde la primera neurotoxina clostrídica o el subtipo de neurotoxina clostrídica es BoNT/A y la segunda neurotoxina clostrídica o el subtipo de neurotoxina clostrídica es BoNT/E.
- 12) La composición de la reivindicación 11, donde la primera neurotoxina clostrídica o el subtipo de neurotoxina clostrídica es BoNT/A y la segunda neurotoxina clostrídica o el subtipo de neurotoxina clostrídica es BoNT/C1.
- 13) La composición de la reivindicación 11 comprende una primera cadena polipeptídica que comprende dicho dominio de unión y dicho dominio de translocación, y una segunda cadena polipeptídica que comprende dichos primer dominio endopeptidasa y segundo dominio endopeptidasa.
- 14) La composición de la reivindicación 13, donde dichas cadena polipeptídica y segunda cadena polipeptídica están unidas mediante un enlace disulfuro.
- 15) La composición de la reivindicación 11, donde dichos dominio de unión, dominio de translocación, primer dominio endopeptidasa y segunda cadena polipeptídica están comprendidos en una sola cadena polipeptídica.
- 16) La composición de la reivindicación 11 comprende una primera secuencia de aminoácidos que comprende un primer sitio de escisión de proteasa localizado entre el dominio de translocación y el primer dominio endopeptidasa.
- 17) La composición de la reivindicación 11 comprende además:
  - a) una secuencia de aminoácidos de polihistadina situada en el lado carboxilo terminal del dominio de unión, o en el extremo amino terminal de dicho segundo dominio endopeptidasa;
  - b) una primera secuencia de aminoácidos que comprende una primera secuencia de aminoácidos que comprende un primer sitio de escisión de proteasa localizado entre el dominio de translocación y el primer dominio endopeptidasa; y
  - c) una segunda secuencia de aminoácidos que comprende un segundo sitio de escisión de proteasa localizado entre dicho segundo dominio endopeptidasa y la secuencia de aminoácidos de la polihistadina, o entre dicho dominio de unión y la secuencia de aminoácidos de la polihistadina.
- 18) Un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende un derivado de neurotoxina clostrídica, comprendiendo dicho ácido nucleico una codificación de un único marco de lectura abierto, en la secuencia de carboxi terminal a amino terminal: un dominio de unión, un dominio de translocación, un primer dominio endopeptidasa y un segundo dominio endopeptidasa, donde cada uno de dicho primer dominio endopeptidasa y dicho segundo dominio endopeptidasa tiene una actividad proteolítica selectiva contra, y reconoce un sitio de escisión diferente en, una proteína SNARE.
- 19) El ácido nucleico de la reivindicación 18, donde los codones que codifican cada uno del dominio de unión, el dominio de translocación, el primer dominio endopeptidasa y el segundo dominio endopeptidasa están optimizados para la expresión en un tipo de célula seleccionada de entre el grupo que consiste en: una célula bacteriana, una célula de mamífero, una célula de levadura y una célula de insecto.
- 20) El ácido nucleico de la reivindicación 19, donde los codones están optimizados para la expresión en una célula bacteriana de *E. coli*.
- 21) El ácido nucleico de la reivindicación 18, donde al menos dos dominios seleccionados de entre el grupo que consiste en el dominio de unión, el dominio de translocación, el primer dominio endopeptidasa y el segundo dominio endopeptidasa están codificados por secuencias de ácido nucleico derivadas de diferentes neurotoxinas clostrídicas o subtipos de neurotoxina clostrídica seleccionados entre un grupo formado por: BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G, y TeTX.
- 22) El ácido nucleico de la reivindicación 21, donde el primer dominio endopeptidasa y el segundo dominio endopeptidasa están codificados por secuencias de ácido nucleico derivadas a partir de diferentes neurotoxinas clostrídicas o subtipos de neurotoxina clostrídica seleccionados de entre el grupo que consiste en: BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G, y TeTX.
- 23) El ácido nucleico de la reivindicación 22, donde el primer dominio endopeptidasa está codificado por secuencias de ácido nucleico derivadas a partir de BoNT/A y dicho segundo dominio endopeptidasa está codificado por secuencias de ácido nucleico derivadas a partir de BoNT/C1.
- 24) El ácido nucleico de la reivindicación 22, donde el primer dominio endopeptidasa está codificado por secuencias de ácido nucleico derivadas a partir de BoNT/A y dicho segundo dominio endopeptidasa está codificado por secuencias de ácido nucleico derivadas a partir de BoNT/E.
- 25) El ácido nucleico de la reivindicación 24, donde dicho marco de lectura abierto codifica al menos seis residuos de histadina entre la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de unión a endopeptidasa y al codón de terminación.
- 26) Un procedimiento para el tratamiento del dolor crónico que comprende la administración de una composición

terapéutica que comprende un derivado de neurotoxina clostrídica, comprendiendo dicho derivado de neurotoxina clostrídica un polipéptido que incluye: un dominio de unión, un dominio de translocación, un primer dominio endopeptidasa, y un segundo dominio endopeptidasa, donde cada uno de dicho primer dominio endopeptidasa y dicho segundo dominio endopeptidasa tiene una actividad proteolítica selectiva contra, y reconoce un sitio de

5 escisión diferente en, una proteína SNARE.

27) El procedimiento de la reivindicación 26, donde dicho dolor crónico se selecciona de entre el grupo que consiste en dolor nociceptivo inflamatorio y dolor neuropático.

28) El procedimiento de la reivindicación 27, donde dicho dolor crónico es dolor neuropático.

10 29) El procedimiento de la reivindicación 28, donde dicho dolor neuropático se selecciona de entre el grupo que consiste en dolor por cáncer, dolor postoperatorio, dolor neuropático, alodinia, neuralgia posherpética, síndrome del colon irritable y otro dolor visceral, dolor óseo, neuropatía periférica, dolor relacionado con el sistema circulatorio y dolor de cabeza.

30) El procedimiento de la reivindicación 27, donde dicho dolor crónico es dolor nociceptivo inflamatorio.

31) El procedimiento de la reivindicación 27, donde dicho dolor crónico es dolor artrítico.

15 32) El procedimiento de la reivindicación 26, donde el dominio de unión y el dominio de translocación de dicha composición terapéutica se deriva de una primera neurotoxina clostrídica o un subtipo de neurotoxina clostrídica y donde al menos uno de dicho primer dominio endopeptidasa y dicho segundo dominio endopeptidasa de dicha composición se derivan a partir de una segunda neurotoxina clostrídica o subtipo de neurotoxina clostrídica.

20 Aunque se han descrito aspectos de la presente invención con referencia a las realizaciones desveladas, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los ejemplos específicos desvelados son solo ilustrativos de estos aspectos y de ninguna manera limitan la presente invención. Además, se entenderá que cualquier composición o aparato de la invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en uno o más elementos de la reivindicación, y adicionalmente, se considerará que cada elemento no incluido específicamente como un elemento

25 de una reivindicación tiene base aquí para excluirse específicamente en una limitación negativa de esa reivindicación.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Dublin City University

<120> TRATAMIENTO CON MULTIPROTEASA PARA EL DOLOR CRÓNICO

<130> A-05047

<140>

<141>

35 <150> 61/920,053

<151> 2013-12-23

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

40 <211> 78

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

45 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(78)

<400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| tgt | gtc | cgc | ggt | att | atc | acc | agc | aaa | acc | aaa | tcc | ttg | gtg | ccc | cgc | 48 |
| Cys | Val | Arg | Gly | Ile | Ile | Thr | Ser | Lys | Thr | Lys | Ser | Leu | Val | Pro | Arg |    |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |    |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| ggc | tct | aac | aag | gcg | ctc | aat | gat | tta | tgc | 78 |
| Gly | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Asn | Asp | Leu | Cys |    |
|     |     |     | 20  |     |     |     | 25  |     |     |    |

50 <210> 2

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 2  
 Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Val Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys  
 20 25  
 <210> 3  
 <211> 69  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 10 <221> CDS  
 <222> (1)..(66)  
 <400> 3  
 aaa gtc gac aag ctt ctg gta ccg cgc ggc agc aaa ctg cag ctc gag 48  
 Lys Val Asp Lys Leu Leu Val Pro Arg Gly Ser Lys Leu Gln Leu Glu  
 1 5 10 15  
 cac cac cac cac cac cac tga 69  
 His His His His His His  
 20  
 <210> 4  
 15 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 20 <400> 4  
 Lys Val Asp Lys Leu Leu Val Pro Arg Gly Ser Lys Leu Gln Leu Glu  
 1 5 10 15  
 His His His His His His  
 20  
 <210> 5  
 <211> 5199  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético  
 <220>  
 <221> CDS  
 30 <222> (1)..(5196)  
 <400> 5  
 atg cct aaa atc aat tcg ttc aac tat aat gac ccg gtt aac gat cgc 48  
 Met Pro Lys Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp Arg  
 1 5 10 15  
 acg atc ctg tat atc aag cca ggt gga tgt caa gaa ttt tat aaa tca 96  
 Thr Ile Leu Tyr Ile Lys Pro Gly Gly Cys Gln Glu Phe Tyr Lys Ser  
 20 25 30  
 ttc aac atc atg aaa aat att tgg att atc ccg gaa cgc aac gtg atc 144

# ES 2 671 493 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Phe | Asn | Ile | Met | Lys | Asn | Ile | Trp | Ile | Ile | Pro | Glu | Arg | Asn | Val | Ile |     |  |
|     | 35  |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |  |
| ggc | acg | acg | cct | caa | gat | ttt | cac | ccg | ccg | acc | tcc | ctg | aaa | aat | ggc | 192 |  |
| Gly | Thr | Thr | Pro | Gln | Asp | Phe | His | Pro | Pro | Thr | Ser | Leu | Lys | Asn | Gly |     |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |  |
| gac | agt | tcc | tac | tat | gac | ccg | aat | tat | tta | caa | tcg | gat | gaa | gaa | aaa | 240 |  |
| Asp | Ser | Ser | Tyr | Tyr | Asp | Pro | Asn | Tyr | Leu | Gln | Ser | Asp | Glu | Glu | Lys |     |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |  |
| gat | cgt | ttc | ctc | aag | atc | gtc | acg | aaa | att | ttc | aac | cgc | atc | aat | aac | 288 |  |
| Asp | Arg | Phe | Leu | Lys | Ile | Val | Thr | Lys | Ile | Phe | Asn | Arg | Ile | Asn | Asn |     |  |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |     |  |
| aat | ctg | tcc | ggt | ggc | atc | tta | ctt | gag | gaa | tta | tct | aaa | gct | aat | ccg | 336 |  |
| Asn | Leu | Ser | Gly | Gly | Ile | Leu | Leu | Glu | Glu | Leu | Ser | Lys | Ala | Asn | Pro |     |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |  |
| tat | ctg | ggg | aac | gat | aat | acc | ccg | gat | aat | cag | ttc | cac | att | ggc | gat | 384 |  |
| Tyr | Leu | Gly | Asn | Asp | Asn | Thr | Pro | Asp | Asn | Gln | Phe | His | Ile | Gly | Asp |     |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |  |
| gcg | agc | gct | gtg | gaa | att | aaa | ttc | agc | aac | ggc | agt | caa | gat | att | ctt | 432 |  |
| Ala | Ser | Ala | Val | Glu | Ile | Lys | Phe | Ser | Asn | Gly | Ser | Gln | Asp | Ile | Leu |     |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |  |
| ctc | cca | aac | gtg | att | atc | atg | ggg | gct | gaa | cct | gat | ctt | ttc | gaa | act | 480 |  |
| Leu | Pro | Asn | Val | Ile | Ile | Met | Gly | Ala | Glu | Pro | Asp | Leu | Phe | Glu | Thr |     |  |
|     | 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |     |  |
| aat | agt | tcc | aat | att | tca | ctg | cgc | aat | aat | tat | atg | ccg | tcg | aac | cat | 528 |  |
| Asn | Ser | Ser | Asn | Ile | Ser | Leu | Arg | Asn | Asn | Tyr | Met | Pro | Ser | Asn | His |     |  |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |     |  |
| ggc | ttt | ggc | tca | atc | gca | att | gtg | acg | ttc | tca | cct | gaa | tat | agt | ttt | 576 |  |
| Gly | Phe | Gly | Ser | Ile | Ala | Ile | Val | Thr | Phe | Ser | Pro | Glu | Tyr | Ser | Phe |     |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |  |
| cgt | ttt | aac | gac | aac | agc | atg | aat | gaa | ttt | atc | caa | gac | ccg | gcg | ctg | 624 |  |
| Arg | Phe | Asn | Asp | Asn | Ser | Met | Asn | Glu | Phe | Ile | Gln | Asp | Pro | Ala | Leu |     |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |  |
| act | ttg | atg | cat | gaa | ctg | atc | cat | agc | ttg | cac | ggc | ctg | tat | ggc | gct | 672 |  |
| Thr | Leu | Met | His | Glu | Leu | Ile | His | Ser | Leu | His | Gly | Leu | Tyr | Gly | Ala |     |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |  |
| aaa | ggc | atc | act | acc | aaa | tac | acg | att | acg | caa | aaa | caa | aat | ccc | tta | 720 |  |
| Lys | Gly | Ile | Thr | Thr | Lys | Tyr | Thr | Ile | Thr | Gln | Lys | Gln | Asn | Pro | Leu |     |  |
|     | 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |     |  |
| atc | acc | aac | atc | cgc | ggc | acc | aac | att | gaa | gaa | ttt | ctg | acc | ttc | ggc | 768 |  |
| Ile | Thr | Asn | Ile | Arg | Gly | Thr | Asn | Ile | Glu | Glu | Phe | Leu | Thr | Phe | Gly |     |  |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |  |
| gga | acg | gat | ctg | aac | atc | att | aca | tct | gcc | caa | agc | aac | gac | atc | tat | 816 |  |
| Gly | Thr | Asp | Leu | Asn | Ile | Ile | Thr | Ser | Ala | Gln | Ser | Asn | Asp | Ile | Tyr |     |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |     |  |
| acc | aat | ctg | tta | gca | gat | tat | aag | aaa | atc | gcc | agc | aaa | tta | tct | aaa | 864 |  |
| Thr | Asn | Leu | Leu | Ala | Asp | Tyr | Lys | Lys | Ile | Ala | Ser | Lys | Leu | Ser | Lys |     |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     |  |

# ES 2 671 493 T3

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| gtt cag gtc agc aat ccg ctg tta aac ccg tat aaa gat gtg ttc gaa<br>Val Gln Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu<br>290 295 300     | 912  |
| gcg aaa tac ggc ttg gac aaa gac gct agt ggc atc tat tcc gtc aat<br>Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn<br>305 310 315 320 | 960  |
| att aat aaa ttt aac gat att ttc aaa aaa tta tat tcc ttc acc gaa<br>Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu<br>325 330 335     | 1008 |
| ttt gat ttg gcc acc aaa ttc cag gtc aaa tgt cgt caa acc tat att<br>Phe Asp Leu Ala Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile<br>340 345 350     | 1056 |
| ggc caa tac aaa tat ttt aaa ctg agc aac ctg ctt aat gat tcc atc<br>Gly Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile<br>355 360 365     | 1104 |
| tac aat att agt gaa ggt tac aat att aat aac ctg aaa gtt aac ttt<br>Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe<br>370 375 380     | 1152 |
| cgt ggg caa aat gcg aat ctg aac ccc cgc atc att aca ccc atc acg<br>Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr<br>385 390 395 400 | 1200 |
| ggc cgt ggg ttg gtc aaa aaa att att cgc ttt gat atc atg ccg ttc<br>Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Asp Ile Met Pro Phe<br>405 410 415     | 1248 |
| gta aac aaa cag ttc aac tat aaa gac cca gtc aac ggc gtg gac att<br>Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly Val Asp Ile<br>420 425 430     | 1296 |
| gcc tat atc aaa atc ccg aat gcg ggt caa atg cag ccc gtg aaa gca<br>Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro Val Lys Ala<br>435 440 445     | 1344 |
| ttt aaa atc cat aac aaa att tgg gtg atc ccg gag cgc gat acg ttc<br>Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe<br>450 455 460     | 1392 |
| acg aac ccg gaa gaa gga gat tta aac cca ccg cct gag gct aaa cag<br>Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln<br>465 470 475 480 | 1440 |
| gtc ccg gtg tct tac tat gat agc aca tac ctg agt acc gac aat gaa<br>Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr Asp Asn Glu<br>485 490 495     | 1488 |
| aag gac aac tac ctg aaa ggt gtt acc aaa ctg ttc gag cgc att tat<br>Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu Arg Ile Tyr<br>500 505 510     | 1536 |
| tcg aca gat ctg ggt cgc atg ttg ctg act tct att gtg cgc ggc att<br>Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val Arg Gly Ile<br>515 520 525     | 1584 |
| ccg ttt tgg ggt ggt agc acc atc gat aca gaa ctc aaa gtg att gac<br>Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys Val Ile Asp<br>530 535 540     | 1632 |

# ES 2 671 493 T3

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| acc aac tgc atc aat gtg att cag cct gat ggg agc tac cgg tcc gaa<br>Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Glu<br>545 550 555 560 | 1680 |
| gag ctt aac ctc gta atc att ggc ccg agc gcg gat att atc caa ttc<br>Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile Ile Gln Phe<br>565 570 575     | 1728 |
| gaa tgt aaa tct ttt ggg cat gaa gtc ctg aat ctg acg cgg aat ggc<br>Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr Arg Asn Gly<br>580 585 590     | 1776 |
| tat gga tgc acg cag tat att cgt ttt tct cca gat ttc aca ttt gga<br>Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe Thr Phe Gly<br>595 600 605     | 1824 |
| ttt gaa gaa agc ctc gaa gtt gat acg aac cct ctt tta ggc gcg gga<br>Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu Gly Ala Gly<br>610 615 620     | 1872 |
| aaa ttc gcg acg gac cca gcg gtg acc ttg gca cat gaa ctt att cat<br>Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu Leu Ile His<br>625 630 635 640 | 1920 |
| gcc ggg cat cgc ttg tat gga atc gcc att aac ccg aac cgt gtt ttc<br>Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn Arg Val Phe<br>645 650 655     | 1968 |
| aag gtg aat acg aac gcg tat tac gag atg tgc ggc tta gaa gtg tcc<br>Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu Glu Val Ser<br>660 665 670     | 2016 |
| ttt gaa gaa ctg cgc acg ttt ggc ggt cat gat gca aaa ttt att gat<br>Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys Phe Ile Asp<br>675 680 685     | 2064 |
| agt ctg caa gaa aac gaa ttt cgg ctg tac tat tac aat aaa ttc aaa<br>Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys<br>690 695 700     | 2112 |
| gac att gca tca acc tta aac aag gcg aaa agc att gtg ggt acc acg<br>Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val Gly Thr Thr<br>705 710 715 720 | 2160 |
| gct agc tta caa tat atg aaa aac gtt ttc aaa gaa aaa tac ctc ctt<br>Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys Tyr Leu Leu<br>725 730 735     | 2208 |
| agc gaa gac act tcc ggc aaa ttc tct gtc gat aaa ctg aaa ttt gat<br>Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu Lys Phe Asp<br>740 745 750     | 2256 |
| aaa ctg tat aaa atg ctc acc gag atc tac aca gag gat aac ttt gtc<br>Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp Asn Phe Val<br>755 760 765     | 2304 |
| aaa ttc ttc aag gtc ttg aat cgg aaa acc tat ctg aac ttc gat aaa<br>Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn Phe Asp Lys<br>770 775 780     | 2352 |
| gcc gtc ttt aag atc aac atc gta ccg aaa gtt aac tac acc atc tat<br>Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr Thr Ile Tyr                    | 2400 |

# ES 2 671 493 T3

| 785                                                                                                                                | 790  | 795  | 800  |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
| gat ggc ttt aat ctg cgc aat acg aat ctg gcg gcg aac ttt aac ggc<br>Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn Phe Asn Gly | 805  | 810  | 815  | 2448 |
| cag aac acc gaa atc aac aac atg aac ttt act aaa ctg aaa aat ttt<br>Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe | 820  | 825  | 830  | 2496 |
| acc ggc ttg ttt gaa ttt tat aag ctc ctg tgt gtc cgc ggt att atc<br>Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile | 835  | 840  | 845  | 2544 |
| acc agc aaa acc aaa tcc ttg gtg ccc cgc ggc tct aac aag gcg ctc<br>Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Asn Lys Ala Leu | 850  | 855  | 860  | 2592 |
| aat gat tta tgc atc aag gtg aac aac tgg gac ttg ttt ttc tct cca<br>Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser Pro | 865  | 870  | 875  | 2640 |
| tct gaa gat aat ttt act aac gac ttg aac aaa gga gag gaa att act<br>Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile Thr | 885  | 890  | 895  | 2688 |
| tcc gat acc aac atc gaa gca gcg gaa gag aat att agc ctg gat ctt<br>Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp Leu | 900  | 905  | 910  | 2736 |
| att caa caa tat tac ctg acc ttt aat ttt gat aac gag cct gag aac<br>Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu Asn | 915  | 920  | 925  | 2784 |
| att tcc att gag aat ctc agc tct gac atc atc ggc cag ctg gaa ctg<br>Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu Leu | 930  | 935  | 940  | 2832 |
| atg ccg aat atc gaa cgc ttt cct aat gga aag aaa tat gaa ttg gac<br>Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu Asp | 945  | 950  | 955  | 2880 |
| aaa tac acc atg ttc cac tat ctc cgc gcg cag gag ttt gag cac ggc<br>Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His Gly | 965  | 970  | 975  | 2928 |
| aag tct cgt att gct ctg acc aat tcg gta aac gaa gcc ctt tta aat<br>Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu Asn | 980  | 985  | 990  | 2976 |
| cct tcg cgt gtg tac acc ttt ttc tca agc gat tat gtt aaa aaa gtg<br>Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys Val | 995  | 1000 | 1005 | 3024 |
| aac aag gcg acc gaa gcg gcg atg ttt ttg gga tgg gtg gaa caa<br>Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln         | 1010 | 1015 | 1020 | 3069 |
| ctg gta tat gac ttt acg gat gaa act tct gaa gtc tcg acc acc<br>Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr         | 1025 | 1030 | 1035 | 3114 |
| gac aaa att gcc gat att acc att atc att ccc tat att gcc cct                                                                        |      |      |      | 3159 |

ES 2 671 493 T3

|                                                             |      |
|-------------------------------------------------------------|------|
| Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro |      |
| 1040 1045 1050                                              |      |
| gca ctg aac att ggt aac atg ctg tat aaa gat gat ttt gtg ggc | 3204 |
| Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly |      |
| 1055 1060 1065                                              |      |
| gcc ctg atc ttt tca ggc gct gtt atc ctg ctg gaa ttt atc ccg | 3249 |
| Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro |      |
| 1070 1075 1080                                              |      |
| gaa atc gcc att cca gta ctc ggt acc ttt gcg ctg gtg tcc tat | 3294 |
| Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr |      |
| 1085 1090 1095                                              |      |
| atc gca aac aaa gtt ttg act gtc cag acg atc gac aac gcg ctc | 3339 |
| Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu |      |
| 1100 1105 1110                                              |      |
| agt aaa cgt aac gaa aaa tgg gat gag gtg tat aag tat att gtt | 3384 |
| Ser Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val |      |
| 1115 1120 1125                                              |      |
| acc aac tgg ctc gct aaa gta aac acc cag att gac ctg att cgc | 3429 |
| Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg |      |
| 1130 1135 1140                                              |      |
| aag aag atg aaa gaa gcg ctg gaa aac caa gca gaa gcg acc aaa | 3474 |
| Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys |      |
| 1145 1150 1155                                              |      |
| gct att atc aac tat caa tat aac cag tac aca gag gaa gaa aag | 3519 |
| Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys |      |
| 1160 1165 1170                                              |      |
| aat aac atc aac ttc aac atc gac gac tta tct tca aag ctg aat | 3564 |
| Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn |      |
| 1175 1180 1185                                              |      |
| gaa tct att aac aaa gcg atg att aat att aac aag ttc ttg aac | 3609 |
| Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn |      |
| 1190 1195 1200                                              |      |
| caa tgt agt gtc agc tat ctg atg aac tcg atg atc cca tat ggt | 3654 |
| Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly |      |
| 1205 1210 1215                                              |      |
| gtg aaa cgt ctg gaa gac ttc gat gca agc ctt aaa gat gcc ctt | 3699 |
| Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu |      |
| 1220 1225 1230                                              |      |
| ctg aag tat att tac gat aat cgc gga act ctt att ggc caa gtg | 3744 |
| Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln Val |      |
| 1235 1240 1245                                              |      |
| gat cgc tta aaa gat aaa gtc aac aac acg ctg agt aca gac atc | 3789 |
| Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile |      |
| 1250 1255 1260                                              |      |
| cct ttt cag ctg tct aaa tat gtg gac aat cag cgc ctg ctg tcc | 3834 |
| Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser |      |
| 1265 1270 1275                                              |      |

# ES 2 671 493 T3

|                            |                                    |                    |                                    |                    |                            |      |
|----------------------------|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|----------------------------|------|
| acg ttt<br>Thr Phe<br>1280 | acg gaa tac atc<br>Thr Glu Tyr Ile | aaa<br>Lys<br>1285 | aac atc atc aac<br>Asn Ile Ile Asn | act<br>Thr<br>1290 | agt att ctg<br>Ser Ile Leu | 3879 |
| aac ttg<br>Asn Leu<br>1295 | cgt tac gag agt<br>Arg Tyr Glu Ser | aac<br>Asn<br>1300 | cat ctg att gat<br>His Leu Ile Asp | ctg<br>Leu<br>1305 | agc cgt tac<br>Ser Arg Tyr | 3924 |
| gca tct<br>Ala Ser<br>1310 | aaa atc aac atc<br>Lys Ile Asn Ile | ggc<br>Gly<br>1315 | tcg aag gtg aac<br>Ser Lys Val Asn | ttc<br>Phe<br>1320 | gat cct atc<br>Asp Pro Ile | 3969 |
| gac aaa<br>Asp Lys<br>1325 | aac cag att caa<br>Asn Gln Ile Gln | ttg<br>Leu<br>1330 | ttc aac tta gaa<br>Phe Asn Leu Glu | tcg<br>Ser<br>1335 | tca aag att<br>Ser Lys Ile | 4014 |
| gaa gtt<br>Glu Val<br>1340 | atc tta aaa aat<br>Ile Leu Lys Asn | gcg<br>Ala<br>1345 | att gta tat aat<br>Ile Val Tyr Asn | tca<br>Ser<br>1350 | atg tac gaa<br>Met Tyr Glu | 4059 |
| aat ttc<br>Asn Phe<br>1355 | tct acg agc ttt<br>Ser Thr Ser Phe | tgg<br>Trp<br>1360 | att cgt att ccg<br>Ile Arg Ile Pro | aaa<br>Lys<br>1365 | tat ttc aac<br>Tyr Phe Asn | 4104 |
| agt atc<br>Ser Ile<br>1370 | tct tta aac aac<br>Ser Leu Asn Asn | gag<br>Glu<br>1375 | tat act atc atc<br>Tyr Thr Ile Ile | aat<br>Asn<br>1380 | tgt atg gag<br>Cys Met Glu | 4149 |
| aat aac<br>Asn Asn<br>1385 | agc ggg tgg aaa<br>Ser Gly Trp Lys | gtg<br>Val<br>1390 | agc ctt aac tat<br>Ser Leu Asn Tyr | ggt<br>Gly<br>1395 | gaa atc atc<br>Glu Ile Ile | 4194 |
| tgg act<br>Trp Thr<br>1400 | ctg cag gac act<br>Leu Gln Asp Thr | caa<br>Gln<br>1405 | gaa att aaa caa<br>Glu Ile Lys Gln | cgc<br>Arg<br>1410 | gtg gtg ttt<br>Val Val Phe | 4239 |
| aaa tac<br>Lys Tyr<br>1415 | tca cag atg att<br>Ser Gln Met Ile | aac<br>Asn<br>1420 | atc tcg gat tat<br>Ile Ser Asp Tyr | att<br>Ile<br>1425 | aat cgc tgg<br>Asn Arg Trp | 4284 |
| att ttt<br>Ile Phe<br>1430 | gtg aca att act<br>Val Thr Ile Thr | aac<br>Asn<br>1435 | aac cgg ctg aac<br>Asn Arg Leu Asn | aac<br>Asn<br>1440 | agc aaa att<br>Ser Lys Ile | 4329 |
| tac att<br>Tyr Ile<br>1445 | aac ggt cgc ctg<br>Asn Gly Arg Leu | atc<br>Ile<br>1450 | gat cag aaa cca<br>Asp Gln Lys Pro | atc<br>Ile<br>1455 | agt aat ctc<br>Ser Asn Leu | 4374 |
| ggt aac<br>Gly Asn<br>1460 | att cac gca tcg<br>Ile His Ala Ser | aat<br>Asn<br>1465 | aat atc atg ttc<br>Asn Ile Met Phe | aaa<br>Lys<br>1470 | ctg gat ggt<br>Leu Asp Gly | 4419 |
| tgt cgc<br>Cys Arg<br>1475 | gac acg cac cgt<br>Asp Thr His Arg | tac<br>Tyr<br>1480 | att tgg atc aaa<br>Ile Trp Ile Lys | tac<br>Tyr<br>1485 | ttc aat tta<br>Phe Asn Leu | 4464 |
| ttc gac<br>Phe Asp<br>1490 | aaa gaa ctc aac<br>Lys Glu Leu Asn | gaa<br>Glu<br>1495 | aag gag att aag<br>Lys Glu Ile Lys | gat<br>Asp<br>1500 | ctt tat gac<br>Leu Tyr Asp | 4509 |
| aat cag<br>Asn Gln<br>1505 | tct aat tcg ggt<br>Ser Asn Ser Gly | att<br>Ile<br>1510 | ctg aaa gac ttt<br>Leu Lys Asp Phe | tgg<br>Trp<br>1515 | ggt gat tac<br>Gly Asp Tyr | 4554 |

# ES 2 671 493 T3

|                             |                     |             |      |
|-----------------------------|---------------------|-------------|------|
| ctt cag tac gat aaa ccg tat | tat atg tta aac tta | tat gat ccg | 4599 |
| Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr | Tyr Met Leu Asn Leu | Tyr Asp Pro |      |
| 1520                        | 1525                | 1530        |      |
| aat aaa tac gtt gac gtc aac | aac gtt ggc att cgt | ggc tat atg | 4644 |
| Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn | Asn Val Gly Ile Arg | Gly Tyr Met |      |
| 1535                        | 1540                | 1545        |      |
| tat ctg aaa ggg ccg cgt ggc | agc gtg atg acc act | aac att tac | 4689 |
| Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly | Ser Val Met Thr Thr | Asn Ile Tyr |      |
| 1550                        | 1555                | 1560        |      |
| tta aac tcc tcc ctc tat cgc | ggg act aaa ttt att | atc aag aaa | 4734 |
| Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg | Gly Thr Lys Phe Ile | Ile Lys Lys |      |
| 1565                        | 1570                | 1575        |      |
| tat gcc tct ggc aac aag gac | aat atc gta cgc aat | aac gat cgc | 4779 |
| Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp | Asn Ile Val Arg Asn | Asn Asp Arg |      |
| 1580                        | 1585                | 1590        |      |
| gtc tac att aac gtg gtg gtg | aag aat aaa gaa tat | cgt ctg gcg | 4824 |
| Val Tyr Ile Asn Val Val Val | Lys Asn Lys Glu Tyr | Arg Leu Ala |      |
| 1595                        | 1600                | 1605        |      |
| acc aat gct agt cag gcg ggc | gtg gag aaa att ctg | tct gca ctt | 4869 |
| Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly | Val Glu Lys Ile Leu | Ser Ala Leu |      |
| 1610                        | 1615                | 1620        |      |
| gaa atc ccg gat gtg ggt aat | tta tcc cag gtg gtt | gtg atg aaa | 4914 |
| Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn | Leu Ser Gln Val Val | Val Met Lys |      |
| 1625                        | 1630                | 1635        |      |
| agt aaa aat gac caa ggg atc | acc aat aaa tgc aaa | atg aat ctg | 4959 |
| Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile | Thr Asn Lys Cys Lys | Met Asn Leu |      |
| 1640                        | 1645                | 1650        |      |
| caa gat aac aac ggc aac gac | att ggt ttt atc ggc | ttc cac caa | 5004 |
| Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp | Ile Gly Phe Ile Gly | Phe His Gln |      |
| 1655                        | 1660                | 1665        |      |
| ttc aat aat atc gcg aaa ctg | gtg gcc tca aat tgg | tac aac cgt | 5049 |
| Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu | Val Ala Ser Asn Trp | Tyr Asn Arg |      |
| 1670                        | 1675                | 1680        |      |
| cag att gag cgc agc tcc cgc | act tta ggc tgt agc | tgg gag ttc | 5094 |
| Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg | Thr Leu Gly Cys Ser | Trp Glu Phe |      |
| 1685                        | 1690                | 1695        |      |
| att ccg gta gat gac ggt tgg | gga gaa cgc cca ttg | aaa gtc gac | 5139 |
| Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp | Gly Glu Arg Pro Leu | Lys Val Asp |      |
| 1700                        | 1705                | 1710        |      |
| aag ctt ctg gta ccg cgc ggc | agc aaa ctg cag ctc | gag cac cac | 5184 |
| Lys Leu Leu Val Pro Arg Gly | Ser Lys Leu Gln Leu | Glu His His |      |
| 1715                        | 1720                | 1725        |      |
| cac cac cac cac tga         |                     |             | 5199 |
| His His His His             |                     |             |      |
| 1730                        |                     |             |      |

<210> 6

<211> 1732

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

# ES 2 671 493 T3

<400> 6

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

# ES 2 671 493 T3

Lys Gly Ile Thr Thr Lys Tyr Thr Ile Thr Gln Lys Gln Asn Pro Leu  
 225 230 235 240  
 Ile Thr Asn Ile Arg Gly Thr Asn Ile Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly  
 245 250 255  
 Gly Thr Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Gln Ser Asn Asp Ile Tyr  
 260 265 270  
 Thr Asn Leu Leu Ala Asp Tyr Lys Lys Ile Ala Ser Lys Leu Ser Lys  
 275 280 285  
 Val Gln Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu  
 290 295 300  
 Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn  
 305 310 315 320  
 Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu  
 325 330 335  
 Phe Asp Leu Ala Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile  
 340 345 350  
 Gly Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile  
 355 360 365  
 Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe  
 370 375 380  
 Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr  
 385 390 395 400  
 Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Asp Ile Met Pro Phe  
 405 410 415  
 Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly Val Asp Ile  
 420 425 430  
 Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro Val Lys Ala  
 435 440 445  
 Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe  
 450 455 460  
 Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln

# ES 2 671 493 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 465 |     | 470 |     | 475 |     | 480 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Pro | Val | Ser | Tyr | Tyr | Asp | Ser | Thr | Tyr | Leu | Ser | Thr | Asp | Asn | Glu |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Lys | Asp | Asn | Tyr | Leu | Lys | Gly | Val | Thr | Lys | Leu | Phe | Glu | Arg | Ile | Tyr |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Ser | Thr | Asp | Leu | Gly | Arg | Met | Leu | Leu | Thr | Ser | Ile | Val | Arg | Gly | Ile |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Pro | Phe | Trp | Gly | Gly | Ser | Thr | Ile | Asp | Thr | Glu | Leu | Lys | Val | Ile | Asp |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Thr | Asn | Cys | Ile | Asn | Val | Ile | Gln | Pro | Asp | Gly | Ser | Tyr | Arg | Ser | Glu |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Glu | Leu | Asn | Leu | Val | Ile | Ile | Gly | Pro | Ser | Ala | Asp | Ile | Ile | Gln | Phe |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Glu | Cys | Lys | Ser | Phe | Gly | His | Glu | Val | Leu | Asn | Leu | Thr | Arg | Asn | Gly |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Tyr | Gly | Ser | Thr | Gln | Tyr | Ile | Arg | Phe | Ser | Pro | Asp | Phe | Thr | Phe | Gly |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Phe | Glu | Glu | Ser | Leu | Glu | Val | Asp | Thr | Asn | Pro | Leu | Leu | Gly | Ala | Gly |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Lys | Phe | Ala | Thr | Asp | Pro | Ala | Val | Thr | Leu | Ala | His | Glu | Leu | Ile | His |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Ala | Gly | His | Arg | Leu | Tyr | Gly | Ile | Ala | Ile | Asn | Pro | Asn | Arg | Val | Phe |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Lys | Val | Asn | Thr | Asn | Ala | Tyr | Tyr | Glu | Met | Ser | Gly | Leu | Glu | Val | Ser |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Phe | Glu | Glu | Leu | Arg | Thr | Phe | Gly | Gly | His | Asp | Ala | Lys | Phe | Ile | Asp |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Ser | Leu | Gln | Glu | Asn | Glu | Phe | Arg | Leu | Tyr | Tyr | Tyr | Asn | Lys | Phe | Lys |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| Asp | Ile | Ala | Ser | Thr | Leu | Asn | Lys | Ala | Lys | Ser | Ile | Val | Gly | Thr | Thr |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |

# ES 2 671 493 T3

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

# ES 2 671 493 T3

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

# ES 2 671 493 T3

|         |                     |                     |             |
|---------|---------------------|---------------------|-------------|
| Val Lys | Arg Leu Glu Asp Phe | Asp Ala Ser Leu Lys | Asp Ala Leu |
| 1220    | 1225                | 1230                |             |
| Leu Lys | Tyr Ile Tyr Asp Asn | Arg Gly Thr Leu Ile | Gly Gln Val |
| 1235    | 1240                | 1245                |             |
| Asp Arg | Leu Lys Asp Lys Val | Asn Asn Thr Leu Ser | Thr Asp Ile |
| 1250    | 1255                | 1260                |             |
| Pro Phe | Gln Leu Ser Lys Tyr | Val Asp Asn Gln Arg | Leu Leu Ser |
| 1265    | 1270                | 1275                |             |
| Thr Phe | Thr Glu Tyr Ile Lys | Asn Ile Ile Asn Thr | Ser Ile Leu |
| 1280    | 1285                | 1290                |             |
| Asn Leu | Arg Tyr Glu Ser Asn | His Leu Ile Asp Leu | Ser Arg Tyr |
| 1295    | 1300                | 1305                |             |
| Ala Ser | Lys Ile Asn Ile Gly | Ser Lys Val Asn Phe | Asp Pro Ile |
| 1310    | 1315                | 1320                |             |
| Asp Lys | Asn Gln Ile Gln Leu | Phe Asn Leu Glu Ser | Ser Lys Ile |
| 1325    | 1330                | 1335                |             |
| Glu Val | Ile Leu Lys Asn Ala | Ile Val Tyr Asn Ser | Met Tyr Glu |
| 1340    | 1345                | 1350                |             |
| Asn Phe | Ser Thr Ser Phe Trp | Ile Arg Ile Pro Lys | Tyr Phe Asn |
| 1355    | 1360                | 1365                |             |
| Ser Ile | Ser Leu Asn Asn Glu | Tyr Thr Ile Ile Asn | Cys Met Glu |
| 1370    | 1375                | 1380                |             |
| Asn Asn | Ser Gly Trp Lys Val | Ser Leu Asn Tyr Gly | Glu Ile Ile |
| 1385    | 1390                | 1395                |             |
| Trp Thr | Leu Gln Asp Thr Gln | Glu Ile Lys Gln Arg | Val Val Phe |
| 1400    | 1405                | 1410                |             |
| Lys Tyr | Ser Gln Met Ile Asn | Ile Ser Asp Tyr Ile | Asn Arg Trp |
| 1415    | 1420                | 1425                |             |
| Ile Phe | Val Thr Ile Thr Asn | Asn Arg Leu Asn Asn | Ser Lys Ile |
| 1430    | 1435                | 1440                |             |
| Tyr Ile | Asn Gly Arg Leu Ile | Asp Gln Lys Pro Ile | Ser Asn Leu |

# ES 2 671 493 T3

|                                                             |      |      |
|-------------------------------------------------------------|------|------|
| 1445                                                        | 1450 | 1455 |
| Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys Leu Asp Gly | 1460 | 1470 |
| Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe Asn Leu | 1480 | 1485 |
| Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr Asp | 1490 | 1500 |
| Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr | 1505 | 1515 |
| Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro | 1520 | 1530 |
| Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met | 1535 | 1545 |
| Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr | 1550 | 1560 |
| Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys | 1565 | 1575 |
| Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg | 1580 | 1590 |
| Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala | 1595 | 1605 |
| Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu | 1610 | 1620 |
| Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys | 1625 | 1635 |
| Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu | 1640 | 1650 |
| Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly Phe Ile Gly Phe His Gln | 1655 | 1665 |
| Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser Asn Trp Tyr Asn Arg | 1670 | 1680 |

# ES 2 671 493 T3

Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys Ser Trp Glu Phe  
1685 1690 1695

Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu Lys Val Asp  
1700 1705 1710

Lys Leu Leu Val Pro Arg Gly Ser Lys Leu Gln Leu Glu His His  
1715 1720 1725

His His His His  
1730

<210> 7

<211> 1296

<212> PRT

5 <213> Clostridium botulinum

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 671 493 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|-----|--|-----|--|--|--|--|
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |  |     |  | 175 |  |  |  |  |
| Arg | Asn | Gly | Tyr | Gly | Ser | Thr | Gln | Tyr | Ile | Arg | Phe | Ser | Pro | Asp | Phe |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |     |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
| Thr | Phe | Gly | Phe | Glu | Glu | Ser | Leu | Glu | Val | Asp | Thr | Asn | Pro | Leu | Leu |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
| Gly | Ala | Gly | Lys | Phe | Ala | Thr | Asp | Pro | Ala | Val | Thr | Leu | Ala | His | Glu |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
| Leu | Ile | His | Ala | Gly | His | Arg | Leu | Tyr | Gly | Ile | Ala | Ile | Asn | Pro | Asn |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     | 235 |     |     | 240 |  |     |  |     |  |  |  |  |
| Arg | Val | Phe | Lys | Val | Asn | Thr | Asn | Ala | Tyr | Tyr | Glu | Met | Ser | Gly | Leu |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     | 255 |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
| Glu | Val | Ser | Phe | Glu | Glu | Leu | Arg | Thr | Phe | Gly | Gly | His | Asp | Ala | Lys |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
| Phe | Ile | Asp | Ser | Leu | Gln | Glu | Asn | Glu | Phe | Arg | Leu | Tyr | Tyr | Tyr | Asn |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
| Lys | Phe | Lys | Asp | Ile | Ala | Ser | Thr | Leu | Asn | Lys | Ala | Lys | Ser | Ile | Val |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 290 |     |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
| Gly | Thr | Thr | Ala | Ser | Leu | Gln | Tyr | Met | Lys | Asn | Val | Phe | Lys | Glu | Lys |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 305 |     |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |  | 320 |  |     |  |  |  |  |
| Tyr | Leu | Leu | Ser | Glu | Asp | Thr | Ser | Gly | Lys | Phe | Ser | Val | Asp | Lys | Leu |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     |     | 335 |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
| Lys | Phe | Asp | Lys | Leu | Tyr | Lys | Met | Leu | Thr | Glu | Ile | Tyr | Thr | Glu | Asp |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     | 350 |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
| Asn | Phe | Val | Lys | Phe | Phe | Lys | Val | Leu | Asn | Arg | Lys | Thr | Tyr | Leu | Asn |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 355 |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     | 365 |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
| Phe | Asp | Lys | Ala | Val | Phe | Lys | Ile | Asn | Ile | Val | Pro | Lys | Val | Asn | Tyr |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 370 |     |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     | 380 |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
| Thr | Ile | Tyr | Asp | Gly | Phe | Asn | Leu | Arg | Asn | Thr | Asn | Leu | Ala | Ala | Asn |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 385 |     |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     |     | 395 |     |  | 400 |  |     |  |  |  |  |
| Phe | Asn | Gly | Gln | Asn | Thr | Glu | Ile | Asn | Asn | Met | Asn | Phe | Thr | Lys | Leu |     |  |     |  |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     |     | 415 |     |  |     |  |     |  |  |  |  |

# ES 2 671 493 T3

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg  
 420 425 430  
 Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys  
 435 440 445  
 Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe  
 450 455 460  
 Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu  
 465 470 475 480  
 Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu  
 485 490 495  
 Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro  
 500 505 510  
 Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu  
 515 520 525  
 Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu  
 530 535 540  
 Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu  
 545 550 555 560  
 His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu  
 565 570 575  
 Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys  
 580 585 590  
 Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu  
 595 600 605  
 Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr  
 610 615 620  
 Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala  
 625 630 635 640  
 Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu  
 645 650 655  
 Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala  
 660 665 670

# ES 2 671 493 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Pro | Val | Leu | Gly | Thr | Phe | Ala | Leu | Val | Ser | Tyr | Ile | Ala | Asn | Lys | 675 | 680 | 685 |
| Val | Leu | Thr | Val | Gln | Thr | Ile | Asp | Asn | Ala | Leu | Ser | Lys | Arg | Asn | Glu | 690 | 695 | 700 |
| Lys | Trp | Asp | Glu | Val | Tyr | Lys | Tyr | Ile | Val | Thr | Asn | Trp | Leu | Ala | Lys | 705 | 710 | 715 |
| Val | Asn | Thr | Gln | Ile | Asp | Leu | Ile | Arg | Lys | Lys | Met | Lys | Glu | Ala | Leu | 725 | 730 | 735 |
| Glu | Asn | Gln | Ala | Glu | Ala | Thr | Lys | Ala | Ile | Ile | Asn | Tyr | Gln | Tyr | Asn | 740 | 745 | 750 |
| Gln | Tyr | Thr | Glu | Glu | Glu | Lys | Asn | Asn | Ile | Asn | Phe | Asn | Ile | Asp | Asp | 755 | 760 | 765 |
| Leu | Ser | Ser | Lys | Leu | Asn | Glu | Ser | Ile | Asn | Lys | Ala | Met | Ile | Asn | Ile | 770 | 775 | 780 |
| Asn | Lys | Phe | Leu | Asn | Gln | Cys | Ser | Val | Ser | Tyr | Leu | Met | Asn | Ser | Met | 785 | 790 | 795 |
| Ile | Pro | Tyr | Gly | Val | Lys | Arg | Leu | Glu | Asp | Phe | Asp | Ala | Ser | Leu | Lys | 805 | 810 | 815 |
| Asp | Ala | Leu | Leu | Lys | Tyr | Ile | Tyr | Asp | Asn | Arg | Gly | Thr | Leu | Ile | Gly | 820 | 825 | 830 |
| Gln | Val | Asp | Arg | Leu | Lys | Asp | Lys | Val | Asn | Asn | Thr | Leu | Ser | Thr | Asp | 835 | 840 | 845 |
| Ile | Pro | Phe | Gln | Leu | Ser | Lys | Tyr | Val | Asp | Asn | Gln | Arg | Leu | Leu | Ser | 850 | 855 | 860 |
| Thr | Phe | Thr | Glu | Tyr | Ile | Lys | Asn | Ile | Ile | Asn | Thr | Ser | Ile | Leu | Asn | 865 | 870 | 875 |
| Leu | Arg | Tyr | Glu | Ser | Asn | His | Leu | Ile | Asp | Leu | Ser | Arg | Tyr | Ala | Ser | 885 | 890 | 895 |
| Lys | Ile | Asn | Ile | Gly | Ser | Lys | Val | Asn | Phe | Asp | Pro | Ile | Asp | Lys | Asn | 900 | 905 | 910 |
| Gln | Ile | Gln | Leu | Phe | Asn | Leu | Glu | Ser | Ser | Lys | Ile | Glu | Val | Ile | Leu | 915 | 920 | 925 |

# ES 2 671 493 T3

Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser  
 930 935 940  
 Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn  
 945 950 955 960  
 Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val  
 965 970 975  
 Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu  
 980 985 990  
 Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser  
 995 1000 1005  
 Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg  
 1010 1015 1020  
 Leu Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln  
 1025 1030 1035  
 Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile  
 1040 1045 1050  
 Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp  
 1055 1060 1065  
 Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu  
 1070 1075 1080  
 Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys  
 1085 1090 1095  
 Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met  
 1100 1105 1110  
 Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val  
 1115 1120 1125  
 Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val  
 1130 1135 1140  
 Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr  
 1145 1150 1155  
 Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile

# ES 2 671 493 T3

|         |                     |                     |                 |      |
|---------|---------------------|---------------------|-----------------|------|
| 1160    |                     | 1165                |                 | 1170 |
| Val Arg | Asn Asn Asp Arg Val | Tyr Ile Asn Val     | Val Val Lys Asn |      |
| 1175    |                     | 1180                | 1185            |      |
| Lys Glu | Tyr Arg Leu Ala Thr | Asn Ala Ser Gln Ala | Gly Val Glu     |      |
| 1190    |                     | 1195                | 1200            |      |
| Lys Ile | Leu Ser Ala Leu Glu | Ile Pro Asp Val     | Gly Asn Leu Ser |      |
| 1205    |                     | 1210                | 1215            |      |
| Gln Val | Val Val Met Lys Ser | Lys Asn Asp Gln Gly | Ile Thr Asn     |      |
| 1220    |                     | 1225                | 1230            |      |
| Lys Cys | Lys Met Asn Leu Gln | Asp Asn Asn Gly Asn | Asp Ile Gly     |      |
| 1235    |                     | 1240                | 1245            |      |
| Phe Ile | Gly Phe His Gln Phe | Asn Asn Ile Ala Lys | Leu Val Ala     |      |
| 1250    |                     | 1255                | 1260            |      |
| Ser Asn | Trp Tyr Asn Arg Gln | Ile Glu Arg Ser Ser | Arg Thr Leu     |      |
| 1265    |                     | 1270                | 1275            |      |
| Gly Cys | Ser Trp Glu Phe Ile | Pro Val Asp Asp Gly | Trp Gly Glu     |      |
| 1280    |                     | 1285                | 1290            |      |
| Arg Pro | Leu                 |                     |                 |      |
|         | 1295                |                     |                 |      |

<210> 8

<211> 1291

<212> PRT

5 <213> Clostridium botulinum

<400> 8

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Met Pro Val Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asp Asn |
| 1 5 10 15                                                       |
| Asn Asn Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Phe Ala Arg Gly Thr Gly Arg |
| 20 25 30                                                        |
| Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Ile Pro Glu |
| 35 40 45                                                        |
| Arg Tyr Thr Phe Gly Tyr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Lys Ser Ser Gly |
| 50 55 60                                                        |
| Ile Phe Asn Arg Asp Val Cys Glu Tyr Tyr Asp Pro Asp Tyr Leu Asn |
| 65 70 75 80                                                     |

# ES 2 671 493 T3

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

ES 2 671 493 T3

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

# ES 2 671 493 T3

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

# ES 2 671 493 T3

Lys Thr Ile Met Pro Phe Asp Leu Ser Ile Tyr Thr Asn Asp Thr Ile  
 835 840 845  
 Leu Ile Glu Met Phe Asn Lys Tyr Asn Ser Glu Ile Leu Asn Asn Ile  
 850 855 860  
 Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Lys Asp Asn Asn Leu Ile Asp Leu Ser Gly  
 865 870 875 880  
 Tyr Gly Ala Lys Val Glu Val Tyr Asp Gly Val Glu Leu Asn Asp Lys  
 885 890 895  
 Asn Gln Phe Lys Leu Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys Ile Arg Val Thr  
 900 905 910  
 Gln Asn Gln Asn Ile Ile Phe Asn Ser Val Phe Leu Asp Phe Ser Val  
 915 920 925  
 Ser Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Lys Asn Asp Gly Ile Gln Asn  
 930 935 940  
 Tyr Ile His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Lys Asn Asn Ser  
 945 950 955 960  
 Gly Trp Lys Ile Ser Ile Arg Gly Asn Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile  
 965 970 975  
 Asp Ile Asn Gly Lys Thr Lys Ser Val Phe Phe Glu Tyr Asn Ile Arg  
 980 985 990  
 Glu Asp Ile Ser Glu Tyr Ile Asn Arg Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr  
 995 1000 1005  
 Asn Asn Leu Asn Asn Ala Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Lys Leu Glu  
 1010 1015 1020  
 Ser Asn Thr Asp Ile Lys Asp Ile Arg Glu Val Ile Ala Asn Gly  
 1025 1030 1035  
 Glu Ile Ile Phe Lys Leu Asp Gly Asp Ile Asp Arg Thr Gln Phe  
 1040 1045 1050  
 Ile Trp Met Lys Tyr Phe Ser Ile Phe Asn Thr Glu Leu Ser Gln  
 1055 1060 1065  
 Ser Asn Ile Glu Glu Arg Tyr Lys Ile Gln Ser Tyr Ser Glu Tyr  
 1070 1075 1080

# ES 2 671 493 T3

|         |                     |                     |             |
|---------|---------------------|---------------------|-------------|
| Leu Lys | Asp Phe Trp Gly Asn | Pro Leu Met Tyr Asn | Lys Glu Tyr |
| 1085    | 1090                | 1095                |             |
| Tyr Met | Phe Asn Ala Gly Asn | Lys Asn Ser Tyr Ile | Lys Leu Lys |
| 1100    | 1105                | 1110                |             |
| Lys Asp | Ser Pro Val Gly Glu | Ile Leu Thr Arg Ser | Lys Tyr Asn |
| 1115    | 1120                | 1125                |             |
| Gln Asn | Ser Lys Tyr Ile Asn | Tyr Arg Asp Leu Tyr | Ile Gly Glu |
| 1130    | 1135                | 1140                |             |
| Lys Phe | Ile Ile Arg Arg Lys | Ser Asn Ser Gln Ser | Ile Asn Asp |
| 1145    | 1150                | 1155                |             |
| Asp Ile | Val Arg Lys Glu Asp | Tyr Ile Tyr Leu Asp | Phe Phe Asn |
| 1160    | 1165                | 1170                |             |
| Leu Asn | Gln Glu Trp Arg Val | Tyr Thr Tyr Lys Tyr | Phe Lys Lys |
| 1175    | 1180                | 1185                |             |
| Glu Glu | Glu Lys Leu Phe Leu | Ala Pro Ile Ser Asp | Ser Asp Glu |
| 1190    | 1195                | 1200                |             |
| Phe Tyr | Asn Thr Ile Gln Ile | Lys Glu Tyr Asp Glu | Gln Pro Thr |
| 1205    | 1210                | 1215                |             |
| Tyr Ser | Cys Gln Leu Leu Phe | Lys Lys Asp Glu Glu | Ser Thr Asp |
| 1220    | 1225                | 1230                |             |
| Glu Ile | Gly Leu Ile Gly Ile | His Arg Phe Tyr Glu | Ser Gly Ile |
| 1235    | 1240                | 1245                |             |
| Val Phe | Glu Glu Tyr Lys Asp | Tyr Phe Cys Ile Ser | Lys Trp Tyr |
| 1250    | 1255                | 1260                |             |
| Leu Lys | Glu Val Lys Arg Lys | Pro Tyr Asn Leu Lys | Leu Gly Cys |
| 1265    | 1270                | 1275                |             |
| Asn Trp | Gln Phe Ile Pro Lys | Asp Glu Gly Trp Thr | Glu         |
| 1280    | 1285                | 1290                |             |

<210> 9

<211> 1291

<212> PRT

5 <213> Clostridium botulinum

<400> 9

# ES 2 671 493 T3

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

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

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

Arg Phe Ser Arg Asn Ser Asn Pro Asn Leu Asn Lys Pro Pro Arg Val  
50 55 60

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

Ser Asp Lys Asp Pro Phe Leu Lys Glu Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg  
85 90 95

Ile Asn Ser Arg Glu Ile Gly Glu Glu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Thr  
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Pro Gly Asn Asn Asn Thr Pro Ile Asn Thr Phe Asp  
115 120 125

Phe Asp Val Asp Phe Asn Ser Val Asp Val Lys Thr Arg Gln Gly Asn  
130 135 140

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

Pro Arg Glu Asn Ile Ile Asp Pro Glu Thr Ser Thr Phe Lys Leu Thr  
165 170 175

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

Ser Ile Ser Pro Arg Phe Met Leu Thr Tyr Ser Asn Ala Thr Asn Asp  
195 200 205

Val Gly Glu Gly Arg Phe Ser Lys Ser Glu Phe Cys Met Asp Pro Ile  
210 215 220

Leu Ile Leu Met His Glu Leu Asn His Ala Met His Asn Leu Tyr Gly  
225 230 235 240

Ile Ala Ile Pro Asn Asp Gln Thr Ile Ser Ser Val Thr Ser Asn Ile  
245 250 255

Phe Tyr Ser Gln Tyr Asn Val Lys Leu Glu Tyr Ala Glu Ile Tyr Ala  
 260 265 270  
 Phe Gly Gly Pro Thr Ile Asp Leu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Lys Tyr  
 275 280 285  
 Phe Glu Glu Lys Ala Leu Asp Tyr Tyr Arg Ser Ile Ala Lys Arg Leu  
 290 295 300  
 Asn Ser Ile Thr Thr Ala Asn Pro Ser Ser Phe Asn Lys Tyr Ile Gly  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Gln Lys Leu Ile Arg Lys Tyr Arg Phe Val Val Glu Ser  
 325 330 335  
 Ser Gly Glu Val Thr Val Asn Arg Asn Lys Phe Val Glu Leu Tyr Asn  
 340 345 350  
 Glu Leu Thr Gln Ile Phe Thr Glu Phe Asn Tyr Ala Lys Ile Tyr Asn  
 355 360 365  
 Val Gln Asn Arg Lys Ile Tyr Leu Ser Asn Val Tyr Thr Pro Val Thr  
 370 375 380  
 Ala Asn Ile Leu Asp Asp Asn Val Tyr Asp Ile Gln Asn Gly Phe Asn  
 385 390 395 400  
 Ile Pro Lys Ser Asn Leu Asn Val Leu Phe Met Gly Gln Asn Leu Ser  
 405 410 415  
 Arg Asn Pro Ala Leu Arg Lys Val Asn Pro Glu Asn Met Leu Tyr Leu  
 420 425 430  
 Phe Thr Lys Phe Cys His Lys Ala Ile Asp Gly Arg Ser Leu Tyr Asn  
 435 440 445  
 Lys Thr Leu Asp Cys Arg Glu Leu Leu Val Lys Asn Thr Asp Leu Pro  
 450 455 460  
 Phe Ile Gly Asp Ile Ser Asp Val Lys Thr Asp Ile Phe Leu Arg Lys  
 465 470 475 480  
 Asp Ile Asn Glu Glu Thr Glu Val Ile Tyr Tyr Pro Asp Asn Val Ser  
 485 490 495  
 Val Asp Gln Val Ile Leu Ser Lys Asn Thr Ser Glu His Gly Gln Leu

# ES 2 671 493 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| 500 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |  |  |  |  |
| Asp | Leu | Leu | Tyr | Pro | Ser | Ile | Asp | Ser | Glu | Ser | Glu | Ile | Leu | Pro | Gly |  |  |  |  |
|     | 515 |     |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |  |  |  |  |
| Glu | Asn | Gln | Val | Phe | Tyr | Asp | Asn | Arg | Thr | Gln | Asn | Val | Asp | Tyr | Leu |  |  |  |  |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Asn | Ser | Tyr | Tyr | Tyr | Leu | Glu | Ser | Gln | Lys | Leu | Ser | Asp | Asn | Val | Glu |  |  |  |  |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |  |  |  |  |
| Asp | Phe | Thr | Phe | Thr | Arg | Ser | Ile | Glu | Glu | Ala | Leu | Asp | Asn | Ser | Ala |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     |     | 575 |  |  |  |  |
| Lys | Val | Tyr | Thr | Tyr | Phe | Pro | Thr | Leu | Ala | Asn | Lys | Val | Asn | Ala | Gly |  |  |  |  |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |  |  |  |  |
| Val | Gln | Gly | Gly | Leu | Phe | Leu | Met | Trp | Ala | Asn | Asp | Val | Val | Glu | Asp |  |  |  |  |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |  |  |  |  |
| Phe | Thr | Thr | Asn | Ile | Leu | Arg | Lys | Asp | Thr | Leu | Asp | Lys | Ile | Ser | Asp |  |  |  |  |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Val | Ser | Ala | Ile | Ile | Pro | Tyr | Ile | Gly | Pro | Ala | Leu | Asn | Ile | Ser | Asn |  |  |  |  |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |  |  |  |  |
| Ser | Val | Arg | Arg | Gly | Asn | Phe | Thr | Glu | Ala | Phe | Ala | Val | Thr | Gly | Val |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |  |  |  |  |
| Thr | Ile | Leu | Leu | Glu | Ala | Phe | Pro | Glu | Phe | Thr | Ile | Pro | Ala | Leu | Gly |  |  |  |  |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |  |  |  |  |
| Ala | Phe | Val | Ile | Tyr | Ser | Lys | Val | Gln | Glu | Arg | Asn | Glu | Ile | Ile | Lys |  |  |  |  |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |  |  |  |  |
| Thr | Ile | Asp | Asn | Cys | Leu | Glu | Gln | Arg | Ile | Lys | Arg | Trp | Lys | Asp | Ser |  |  |  |  |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Tyr | Glu | Trp | Met | Met | Gly | Thr | Trp | Leu | Ser | Arg | Ile | Ile | Thr | Gln | Phe |  |  |  |  |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |  |  |  |  |
| Asn | Asn | Ile | Ser | Tyr | Gln | Met | Tyr | Asp | Ser | Leu | Asn | Tyr | Gln | Ala | Gly |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |  |  |  |  |
| Ala | Ile | Lys | Ala | Lys | Ile | Asp | Leu | Glu | Tyr | Lys | Lys | Tyr | Ser | Gly | Ser |  |  |  |  |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     |     | 750 |     |  |  |  |  |

# ES 2 671 493 T3

Asp Lys Glu Asn Ile Lys Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Asn Ser Leu  
 755 760 765  
 Asp Val Lys Ile Ser Glu Ala Met Asn Asn Ile Asn Lys Phe Ile Arg  
 770 775 780  
 Glu Cys Ser Val Thr Tyr Leu Phe Lys Asn Met Leu Pro Lys Val Ile  
 785 790 795 800  
 Asp Glu Leu Asn Glu Phe Asp Arg Asn Thr Lys Ala Lys Leu Ile Asn  
 805 810 815  
 Leu Ile Asp Ser His Asn Ile Ile Leu Val Gly Glu Val Asp Lys Leu  
 820 825 830  
 Lys Ala Lys Val Asn Asn Ser Phe Gln Asn Thr Ile Pro Phe Asn Ile  
 835 840 845  
 Phe Ser Tyr Thr Asn Asn Ser Leu Leu Lys Asp Ile Ile Asn Glu Tyr  
 850 855 860  
 Phe Asn Asn Ile Asn Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Arg Lys  
 865 870 875 880  
 Asn Thr Leu Val Asp Thr Ser Gly Tyr Asn Ala Glu Val Ser Glu Glu  
 885 890 895  
 Gly Asp Val Gln Leu Asn Pro Ile Phe Pro Phe Asp Phe Lys Leu Gly  
 900 905 910  
 Ser Ser Gly Glu Asp Arg Gly Lys Val Ile Val Thr Gln Asn Glu Asn  
 915 920 925  
 Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Ser Phe Ser Ile Ser Phe Trp Ile  
 930 935 940  
 Arg Ile Asn Lys Trp Val Ser Asn Leu Pro Gly Tyr Thr Ile Ile Asp  
 945 950 955 960  
 Ser Val Lys Asn Asn Ser Gly Trp Ser Ile Gly Ile Ile Ser Asn Phe  
 965 970 975  
 Leu Val Phe Thr Leu Lys Gln Asn Glu Asp Ser Glu Gln Ser Ile Asn  
 980 985 990  
 Phe Ser Tyr Asp Ile Ser Asn Asn Ala Pro Gly Tyr Asn Lys Trp Phe  
 995 1000 1005

# ES 2 671 493 T3

|         |         |         |         |         |         |         |     |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|
| Phe Val | Thr Val | Thr Asn | Asn Met | Met Gly | Asn Met | Lys Ile | Tyr |
| 1010    |         |         | 1015    |         | 1020    |         |     |
| Ile Asn | Gly Lys | Leu Ile | Asp Thr | Ile Lys | Val Lys | Glu Leu | Thr |
| 1025    |         |         | 1030    |         | 1035    |         |     |
| Gly Ile | Asn Phe | Ser Lys | Thr Ile | Thr Phe | Glu Ile | Asn Lys | Ile |
| 1040    |         |         | 1045    |         | 1050    |         |     |
| Pro Asp | Thr Gly | Leu Ile | Thr Ser | Asp Ser | Asp Asn | Ile Asn | Met |
| 1055    |         |         | 1060    |         | 1065    |         |     |
| Trp Ile | Arg Asp | Phe Tyr | Ile Phe | Ala Lys | Glu Leu | Asp Gly | Lys |
| 1070    |         |         | 1075    |         | 1080    |         |     |
| Asp Ile | Asn Ile | Leu Phe | Asn Ser | Leu Gln | Tyr Thr | Asn Val | Val |
| 1085    |         |         | 1090    |         | 1095    |         |     |
| Lys Asp | Tyr Trp | Gly Asn | Asp Leu | Arg Tyr | Asn Lys | Glu Tyr | Tyr |
| 1100    |         |         | 1105    |         | 1110    |         |     |
| Met Val | Asn Ile | Asp Tyr | Leu Asn | Arg Tyr | Met Tyr | Ala Asn | Ser |
| 1115    |         |         | 1120    |         | 1125    |         |     |
| Arg Gln | Ile Val | Phe Asn | Thr Arg | Arg Asn | Asn Asn | Asp Phe | Asn |
| 1130    |         |         | 1135    |         | 1140    |         |     |
| Glu Gly | Tyr Lys | Ile Ile | Ile Lys | Arg Ile | Arg Gly | Asn Thr | Asn |
| 1145    |         |         | 1150    |         | 1155    |         |     |
| Asp Thr | Arg Val | Arg Gly | Gly Asp | Ile Leu | Tyr Phe | Asp Met | Thr |
| 1160    |         |         | 1165    |         | 1170    |         |     |
| Ile Asn | Asn Lys | Ala Tyr | Asn Leu | Phe Met | Lys Asn | Glu Thr | Met |
| 1175    |         |         | 1180    |         | 1185    |         |     |
| Tyr Ala | Asp Asn | His Ser | Thr Glu | Asp Ile | Tyr Ala | Ile Gly | Leu |
| 1190    |         |         | 1195    |         | 1200    |         |     |
| Arg Glu | Gln Thr | Lys Asp | Ile Asn | Asp Asn | Ile Ile | Phe Gln | Ile |
| 1205    |         |         | 1210    |         | 1215    |         |     |
| Gln Pro | Met Asn | Asn Thr | Tyr Tyr | Tyr Ala | Ser Gln | Ile Phe | Lys |
| 1220    |         |         | 1225    |         | 1230    |         |     |
| Ser Asn | Phe Asn | Gly Glu | Asn Ile | Ser Gly | Ile Cys | Ser Ile | Gly |
| 1235    |         |         | 1240    |         | 1245    |         |     |

# ES 2 671 493 T3

Thr Tyr Arg Phe Arg Leu Gly Gly Asp Trp Tyr Arg His Asn Tyr  
1250 1255 1260

Leu Val Pro Thr Val Lys Gln Gly Asn Tyr Ala Ser Leu Leu Glu  
1265 1270 1275

Ser Thr Ser Thr His Trp Gly Phe Val Pro Val Ser Glu  
1280 1285 1290

<210> 10

<211> 1276

<212> PRT

5 <213> Clostridium botulinum

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 671 493 T3

Gln Gln Ser Asn Pro Ser Phe Glu Gly Phe Gly Thr Leu Ser Ile Leu  
 180 185 190  
 Lys Val Ala Pro Glu Phe Leu Leu Thr Phe Ser Asp Val Thr Ser Asn  
 195 200 205  
 Gln Ser Ser Ala Val Leu Gly Lys Ser Ile Phe Cys Met Asp Pro Val  
 210 215 220  
 Ile Ala Leu Met His Glu Leu Thr His Ser Leu His Gln Leu Tyr Gly  
 225 230 235 240  
 Ile Asn Ile Pro Ser Asp Lys Arg Ile Arg Pro Gln Val Ser Glu Gly  
 245 250 255  
 Phe Phe Ser Gln Asp Gly Pro Asn Val Gln Phe Glu Glu Leu Tyr Thr  
 260 265 270  
 Phe Gly Gly Leu Asp Val Glu Ile Ile Pro Gln Ile Glu Arg Ser Gln  
 275 280 285  
 Leu Arg Glu Lys Ala Leu Gly His Tyr Lys Asp Ile Ala Lys Arg Leu  
 290 295 300  
 Asn Asn Ile Asn Lys Thr Ile Pro Ser Ser Trp Ile Ser Asn Ile Asp  
 305 310 315 320  
 Lys Tyr Lys Lys Ile Phe Ser Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Lys Asp Asn  
 325 330 335  
 Thr Gly Asn Phe Val Val Asn Ile Asp Lys Phe Asn Ser Leu Tyr Ser  
 340 345 350  
 Asp Leu Thr Asn Val Met Ser Glu Val Val Tyr Ser Ser Gln Tyr Asn  
 355 360 365  
 Val Lys Asn Arg Thr His Tyr Phe Ser Arg His Tyr Leu Pro Val Phe  
 370 375 380  
 Ala Asn Ile Leu Asp Asp Asn Ile Tyr Thr Ile Arg Asp Gly Phe Asn  
 385 390 395 400  
 Leu Thr Asn Lys Gly Phe Asn Ile Glu Asn Ser Gly Gln Asn Ile Glu  
 405 410 415  
 Arg Asn Pro Ala Leu Gln Lys Leu Ser Ser Glu Ser Val Val Asp Leu  
 420 425 430

# ES 2 671 493 T3

Phe Thr Lys Val Cys Leu Arg Leu Thr Lys Asn Ser Arg Asp Asp Ser  
 435 440 445  
 Thr Cys Ile Lys Val Lys Asn Asn Arg Leu Pro Tyr Val Ala Asp Lys  
 450 455 460  
 Asp Ser Ile Ser Gln Glu Ile Phe Glu Asn Lys Ile Ile Thr Asp Glu  
 465 470 475 480  
 Thr Asn Val Gln Asn Tyr Ser Asp Lys Phe Ser Leu Asp Glu Ser Ile  
 485 490 495  
 Leu Asp Gly Gln Val Pro Ile Asn Pro Glu Ile Val Asp Pro Leu Leu  
 500 505 510  
 Pro Asn Val Asn Met Glu Pro Leu Asn Leu Pro Gly Glu Glu Ile Val  
 515 520 525  
 Phe Tyr Asp Asp Ile Thr Lys Tyr Val Asp Tyr Leu Asn Ser Tyr Tyr  
 530 535 540  
 Tyr Leu Glu Ser Gln Lys Leu Ser Asn Asn Val Glu Asn Ile Thr Leu  
 545 550 555 560  
 Thr Thr Ser Val Glu Glu Ala Leu Gly Tyr Ser Asn Lys Ile Tyr Thr  
 565 570 575  
 Phe Leu Pro Ser Leu Ala Glu Lys Val Asn Lys Gly Val Gln Ala Gly  
 580 585 590  
 Leu Phe Leu Asn Trp Ala Asn Glu Val Val Glu Asp Phe Thr Thr Asn  
 595 600 605  
 Ile Met Lys Lys Asp Thr Leu Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Val Ile  
 610 615 620  
 Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Ser Ala Leu Arg  
 625 630 635 640  
 Gly Asn Phe Asn Gln Ala Phe Ala Thr Ala Gly Val Ala Phe Leu Leu  
 645 650 655  
 Glu Gly Phe Pro Glu Phe Thr Ile Pro Ala Leu Gly Val Phe Thr Phe  
 660 665 670  
 Tyr Ser Ser Ile Gln Glu Arg Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile Glu Asn

# ES 2 671 493 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 675 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     |     |  |  |  |  | 685 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Cys | Leu | Glu | Gln | Arg | Val | Lys | Arg | Trp | Lys | Asp | Ser | Tyr | Gln | Trp | Met |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 690 |     |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Val | Ser | Asn | Trp | Leu | Ser | Arg | Ile | Thr | Thr | Gln | Phe | Asn | His | Ile | Asn |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Tyr | Gln | Met | Tyr | Asp | Ser | Leu | Ser | Tyr | Gln | Ala | Asp | Ala | Ile | Lys | Ala |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Lys | Ile | Asp | Leu | Glu | Tyr | Lys | Lys | Tyr | Ser | Gly | Ser | Asp | Lys | Glu | Asn |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ile | Lys | Ser | Gln | Val | Glu | Asn | Leu | Lys | Asn | Ser | Leu | Asp | Val | Lys | Ile |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 755 |     |     |     | 760 |     |     |     |     |     | 765 |     |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ser | Glu | Ala | Met | Asn | Asn | Ile | Asn | Lys | Phe | Ile | Arg | Glu | Cys | Ser | Val |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 770 |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Thr | Tyr | Leu | Phe | Lys | Asn | Met | Leu | Pro | Lys | Val | Ile | Asp | Glu | Leu | Asn |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     | 795 |     |     |     |     | 800 |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Lys | Phe | Asp | Leu | Arg | Thr | Lys | Thr | Glu | Leu | Ile | Asn | Leu | Ile | Asp | Ser |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 805 |     |     |     |     | 810 |     |     |     |     | 815 |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| His | Asn | Ile | Ile | Leu | Val | Gly | Glu | Val | Asp | Arg | Leu | Lys | Ala | Lys | Val |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 820 |     |     |     |     | 825 |     |     |     |     | 830 |     |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Asn | Glu | Ser | Phe | Glu | Asn | Thr | Met | Pro | Phe | Asn | Ile | Phe | Ser | Tyr | Thr |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 835 |     |     |     | 840 |     |     |     |     |     | 845 |     |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Asn | Asn | Ser | Leu | Leu | Lys | Asp | Ile | Ile | Asn | Glu | Tyr | Phe | Asn | Ser | Ile |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 850 |     |     | 855 |     |     |     |     | 860 |     |     |     |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Asn | Asp | Ser | Lys | Ile | Leu | Ser | Leu | Gln | Asn | Lys | Lys | Asn | Ala | Leu | Val |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 865 |     |     |     |     | 870 |     |     |     |     | 875 |     |     |     |     | 880 |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Asp | Thr | Ser | Gly | Tyr | Asn | Ala | Glu | Val | Arg | Val | Gly | Asp | Asn | Val | Gln |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 885 |     |     |     |     | 890 |     |     |     |     | 895 |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Leu | Asn | Thr | Ile | Tyr | Thr | Asn | Asp | Phe | Lys | Leu | Ser | Ser | Ser | Gly | Asp |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 900 |     |     |     |     | 905 |     |     |     |     |     | 910 |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Lys | Ile | Ile | Val | Asn | Leu | Asn | Asn | Asn | Ile | Leu | Tyr | Ser | Ala | Ile | Tyr |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 915 |     |     |     | 920 |     |     |     |     |     | 925 |     |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

# ES 2 671 493 T3

|      |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |      |      |     |     |     |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|
| Glu  | Asn | Ser | Ser | Val | Ser | Phe  | Trp  | Ile | Lys | Ile | Ser  | Lys  | Asp | Leu | Thr |
| 930  |     |     |     |     |     | 935  |      |     |     |     | 940  |      |     |     |     |
| Asn  | Ser | His | Asn | Glu | Tyr | Thr  | Ile  | Ile | Asn | Ser | Ile  | Glu  | Gln | Asn | Ser |
| 945  |     |     |     |     | 950 |      |      |     |     | 955 |      |      |     |     | 960 |
| Gly  | Trp | Lys | Leu | Cys | Ile | Arg  | Asn  | Gly | Asn | Ile | Glu  | Trp  | Ile | Leu | Gln |
|      |     |     |     | 965 |     |      |      |     | 970 |     |      |      |     | 975 |     |
| Asp  | Val | Asn | Arg | Lys | Tyr | Lys  | Ser  | Leu | Ile | Phe | Asp  | Tyr  | Ser | Glu | Ser |
|      |     |     |     | 980 |     |      |      | 985 |     |     |      |      | 990 |     |     |
| Leu  | Ser | His | Thr | Gly | Tyr | Thr  | Asn  | Lys | Trp | Phe | Phe  | Val  | Thr | Ile | Thr |
|      |     | 995 |     |     |     |      | 1000 |     |     |     |      | 1005 |     |     |     |
| Asn  | Asn | Ile | Met | Gly | Tyr | Met  | Lys  | Leu | Tyr | Ile | Asn  | Gly  | Glu | Leu |     |
| 1010 |     |     |     |     |     | 1015 |      |     |     |     | 1020 |      |     |     |     |
| Lys  | Gln | Ser | Gln | Lys | Ile | Glu  | Asp  | Leu | Asp | Glu | Val  | Lys  | Leu | Asp |     |
| 1025 |     |     |     |     |     | 1030 |      |     |     |     | 1035 |      |     |     |     |
| Lys  | Thr | Ile | Val | Phe | Gly | Ile  | Asp  | Glu | Asn | Ile | Asp  | Glu  | Asn | Gln |     |
| 1040 |     |     |     |     |     | 1045 |      |     |     |     | 1050 |      |     |     |     |
| Met  | Leu | Trp | Ile | Arg | Asp | Phe  | Asn  | Ile | Phe | Ser | Lys  | Glu  | Leu | Ser |     |
| 1055 |     |     |     |     |     | 1060 |      |     |     |     | 1065 |      |     |     |     |
| Asn  | Glu | Asp | Ile | Asn | Ile | Val  | Tyr  | Glu | Gly | Gln | Ile  | Leu  | Arg | Asn |     |
| 1070 |     |     |     |     |     | 1075 |      |     |     |     | 1080 |      |     |     |     |
| Val  | Ile | Lys | Asp | Tyr | Trp | Gly  | Asn  | Pro | Leu | Lys | Phe  | Asp  | Thr | Glu |     |
| 1085 |     |     |     |     |     | 1090 |      |     |     |     | 1095 |      |     |     |     |
| Tyr  | Tyr | Ile | Ile | Asn | Asp | Asn  | Tyr  | Ile | Asp | Arg | Tyr  | Ile  | Ala | Pro |     |
| 1100 |     |     |     |     |     | 1105 |      |     |     |     | 1110 |      |     |     |     |
| Glu  | Ser | Asn | Val | Leu | Val | Leu  | Val  | Gln | Tyr | Pro | Asp  | Arg  | Ser | Lys |     |
| 1115 |     |     |     |     |     | 1120 |      |     |     |     | 1125 |      |     |     |     |
| Leu  | Tyr | Thr | Gly | Asn | Pro | Ile  | Thr  | Ile | Lys | Ser | Val  | Ser  | Asp | Lys |     |
| 1130 |     |     |     |     |     | 1135 |      |     |     |     | 1140 |      |     |     |     |
| Asn  | Pro | Tyr | Ser | Arg | Ile | Leu  | Asn  | Gly | Asp | Asn | Ile  | Ile  | Leu | His |     |
| 1145 |     |     |     |     |     | 1150 |      |     |     |     | 1155 |      |     |     |     |
| Met  | Leu | Tyr | Asn | Ser | Arg | Lys  | Tyr  | Met | Ile | Ile | Arg  | Asp  | Thr | Asp |     |
| 1160 |     |     |     |     |     | 1165 |      |     |     |     | 1170 |      |     |     |     |

# ES 2 671 493 T3

Thr Ile Tyr Ala Thr Gln Gly Gly Glu Cys Ser Gln Asn Cys Val  
1175 1180 1185

Tyr Ala Leu Lys Leu Gln Ser Asn Leu Gly Asn Tyr Gly Ile Gly  
1190 1195 1200

Ile Phe Ser Ile Lys Asn Ile Val Ser Lys Asn Lys Tyr Cys Ser  
1205 1210 1215

Gln Ile Phe Ser Ser Phe Arg Glu Asn Thr Met Leu Leu Ala Asp  
1220 1225 1230

Ile Tyr Lys Pro Trp Arg Phe Ser Phe Lys Asn Ala Tyr Thr Pro  
1235 1240 1245

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

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

<210> 11

<211> 1252

<212> PRT

5 <213> Clostridium botulinum

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 671 493 T3

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

# ES 2 671 493 T3

Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe  
 370 375 380  
 Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr  
 385 390 395 400  
 Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val  
 405 410 415  
 Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys Ile Glu Ile Asn Asn Gly  
 420 425 430  
 Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Asn Ser Tyr Asn Asp Asp Asn Ile  
 435 440 445  
 Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Val Thr Ser Asn Asn Asn Tyr  
 450 455 460  
 Glu Asn Asp Leu Asp Gln Val Ile Leu Asn Phe Asn Ser Glu Ser Ala  
 465 470 475 480  
 Pro Gly Leu Ser Asp Glu Lys Leu Asn Leu Thr Ile Gln Asn Asp Ala  
 485 490 495  
 Tyr Ile Pro Lys Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Asp Ile Glu Gln His  
 500 505 510  
 Asp Val Asn Glu Leu Asn Val Phe Phe Tyr Leu Asp Ala Gln Lys Val  
 515 520 525  
 Pro Glu Gly Glu Asn Asn Val Asn Leu Thr Ser Ser Ile Asp Thr Ala  
 530 535 540  
 Leu Leu Glu Gln Pro Lys Ile Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Glu Phe Ile  
 545 550 555 560  
 Asn Asn Val Asn Lys Pro Val Gln Ala Ala Leu Phe Val Ser Trp Ile  
 565 570 575  
 Gln Gln Val Leu Val Asp Phe Thr Thr Glu Ala Asn Gln Lys Ser Thr  
 580 585 590  
 Val Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Ile Val Val Pro Tyr Ile Gly Leu  
 595 600 605  
 Ala Leu Asn Ile Gly Asn Glu Ala Gln Lys Gly Asn Phe Lys Asp Ala  
 610 615 620

# ES 2 671 493 T3

Leu Glu Leu Leu Gly Ala Gly Ile Leu Leu Glu Phe Glu Pro Glu Leu  
 625 630 635 640

Leu Ile Pro Thr Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Phe Leu Gly Ser  
 645 650 655

Ser Asp Asn Lys Asn Lys Val Ile Lys Ala Ile Asn Asn Ala Leu Lys  
 660 665 670

Glu Arg Asp Glu Lys Trp Lys Glu Val Tyr Ser Phe Ile Val Ser Asn  
 675 680 685

Trp Met Thr Lys Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys Glu Gln Met  
 690 695 700

Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asn Ala Ile Lys Thr Ile Ile Glu  
 705 710 715 720

Ser Lys Tyr Asn Ser Tyr Thr Leu Glu Glu Lys Asn Glu Leu Thr Asn  
 725 730 735

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Gly Tyr Asp Ser Asn Ile Asn Ile Asn Gly Asp Val Tyr Lys

# ES 2 671 493 T3

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

# ES 2 671 493 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gln Glu Lys  
1250

<210> 12

<211> 1274

<212> PRT

5 <213> Clostridium botulinum

<400> 12

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

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

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

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

Leu Lys Asn Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Thr Thr

# ES 2 671 493 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |
| Asp | Ala | Glu | Lys | Asp | Arg | Tyr | Leu | Lys | Thr | Thr | Ile | Lys | Leu | Phe | Lys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Arg | Ile | Asn | Ser | Asn | Pro | Ala | Gly | Lys | Val | Leu | Leu | Gln | Glu | Ile | Ser |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Tyr | Ala | Lys | Pro | Tyr | Leu | Gly | Asn | Asp | His | Thr | Pro | Ile | Asp | Glu | Phe |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Ser | Pro | Val | Thr | Arg | Thr | Thr | Ser | Val | Asn | Ile | Lys | Leu | Ser | Thr | Asn |
|     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Val | Glu | Ser | Ser | Met | Leu | Leu | Asn | Leu | Leu | Val | Leu | Gly | Ala | Gly | Pro |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Asp | Ile | Phe | Glu | Ser | Cys | Cys | Tyr | Pro | Val | Arg | Lys | Leu | Ile | Asp | Pro |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Asp | Val | Val | Tyr | Asp | Pro | Ser | Asn | Tyr | Gly | Phe | Gly | Ser | Ile | Asn | Ile |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Val | Thr | Phe | Ser | Pro | Glu | Tyr | Glu | Tyr | Thr | Phe | Asn | Asp | Ile | Ser | Gly |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Gly | His | Asn | Ser | Ser | Thr | Glu | Ser | Phe | Ile | Ala | Asp | Pro | Ala | Ile | Ser |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Leu | Ala | His | Glu | Leu | Ile | His | Ala | Leu | His | Gly | Leu | Tyr | Gly | Ala | Arg |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Gly | Val | Thr | Tyr | Glu | Glu | Thr | Ile | Glu | Val | Lys | Gln | Ala | Pro | Leu | Met |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     | 255 |     |
| Ile | Ala | Glu | Lys | Pro | Ile | Arg | Leu | Glu | Glu | Phe | Leu | Thr | Phe | Gly | Gly |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Gln | Asp | Leu | Asn | Ile | Ile | Thr | Ser | Ala | Met | Lys | Glu | Lys | Ile | Tyr | Asn |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Asn | Leu | Leu | Ala | Asn | Tyr | Glu | Lys | Ile | Ala | Thr | Arg | Leu | Ser | Glu | Val |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Asn | Ser | Ala | Pro | Pro | Glu | Tyr | Asp | Ile | Asn | Glu | Tyr | Lys | Asp | Tyr | Phe |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |

# ES 2 671 493 T3

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

# ES 2 671 493 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Met Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asp Ala Ile Lys Thr Ala  
 725 730 735

Ile Glu Tyr Lys Tyr Asn Asn Tyr Thr Ser Asp Glu Lys Asn Arg Leu  
 740 745 750

Glu Ser Glu Tyr Asn Ile Asn Asn Ile Glu Glu Glu Leu Asn Lys Lys  
 755 760 765

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

Ile Ser Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Ala Lys Val Gly Lys Leu  
 785 790 795 800

Lys Lys Tyr Asp Asn His Val Lys Ser Asp Leu Leu Asn Tyr Ile Leu  
 805 810 815

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

# ES 2 671 493 T3

Val Thr Ser Thr Leu Asn Ser Ser Ile Pro Phe Glu Leu Ser Ser Tyr  
 835 840 845  
 Thr Asn Asp Lys Ile Leu Ile Ile Tyr Phe Asn Arg Leu Tyr Lys Lys  
 850 855 860  
 Ile Lys Asp Ser Ser Ile Leu Asp Met Arg Tyr Glu Asn Asn Lys Phe  
 865 870 875 880  
 Ile Asp Ile Ser Gly Tyr Gly Ser Asn Ile Ser Ile Asn Gly Asn Val  
 885 890 895  
 Tyr Ile Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Ser Arg  
 900 905 910  
 Leu Ser Glu Val Asn Ile Ala Gln Asn Asn Asp Ile Ile Tyr Asn Ser  
 915 920 925  
 Arg Tyr Gln Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Lys His  
 930 935 940  
 Tyr Lys Pro Met Asn His Asn Arg Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met  
 945 950 955 960  
 Gly Asn Asn Asn Ser Gly Trp Lys Ile Ser Leu Arg Thr Val Arg Asp  
 965 970 975  
 Cys Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Ser Gly Asn Lys Glu Asn  
 980 985 990  
 Leu Ile Phe Arg Tyr Glu Glu Leu Asn Arg Ile Ser Asn Tyr Ile Asn  
 995 1000 1005  
 Lys Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Gly Asn Ser  
 1010 1015 1020  
 Arg Ile Tyr Ile Asn Gly Asn Leu Ile Val Glu Lys Ser Ile Ser  
 1025 1030 1035  
 Asn Leu Gly Asp Ile His Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile  
 1040 1045 1050  
 Val Gly Cys Asp Asp Glu Thr Tyr Val Gly Ile Arg Tyr Phe Lys  
 1055 1060 1065  
 Val Phe Asn Thr Glu Leu Asp Lys Thr Glu Ile Glu Thr Leu Tyr

# ES 2 671 493 T3

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

<210> 13

<211> 1297

<212> PRT

5 <213> Clostridium botulinum

<400> 13

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

# ES 2 671 493 T3

Asp Asp Ile Ile Met Met Glu Pro Phe Asn Asp Pro Gly Pro Gly Thr  
 20 25 30  
 Tyr Tyr Lys Ala Phe Arg Ile Ile Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu  
 35 40 45  
 Arg Phe Thr Tyr Gly Phe Gln Pro Asp Gln Phe Asn Ala Ser Thr Gly  
 50 55 60  
 Val Phe Ser Lys Asp Val Tyr Glu Tyr Tyr Asp Pro Thr Tyr Leu Lys  
 65 70 75 80  
 Thr Asp Ala Glu Lys Asp Lys Phe Leu Lys Thr Met Ile Lys Leu Phe  
 85 90 95  
 Asn Arg Ile Asn Ser Lys Pro Ser Gly Gln Arg Leu Leu Asp Met Ile  
 100 105 110  
 Val Asp Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn Ala Ser Thr Pro Pro Asp Lys  
 115 120 125  
 Phe Ala Ala Asn Val Ala Asn Val Ser Ile Asn Lys Lys Ile Ile Gln  
 130 135 140  
 Pro Gly Ala Glu Asp Gln Ile Lys Gly Leu Met Thr Asn Leu Ile Ile  
 145 150 155 160  
 Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Ser Asp Asn Phe Thr Asp Ser Met Ile  
 165 170 175  
 Met Asn Gly His Ser Pro Ile Ser Glu Gly Phe Gly Ala Arg Met Met  
 180 185 190  
 Ile Arg Phe Cys Pro Ser Cys Leu Asn Val Phe Asn Asn Val Gln Glu  
 195 200 205  
 Asn Lys Asp Thr Ser Ile Phe Ser Arg Arg Ala Tyr Phe Ala Asp Pro  
 210 215 220  
 Ala Leu Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr  
 225 230 235 240  
 Gly Ile Lys Ile Ser Asn Leu Pro Ile Thr Pro Asn Thr Lys Glu Phe  
 245 250 255  
 Phe Met Gln His Ser Asp Pro Val Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe

ES 2 671 493 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| 260 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |  |  |  |  |
| Gly | Gly | His | Asp | Pro | Ser | Val | Ile | Ser | Pro | Ser | Thr | Asp | Met | Asn | Ile |  |  |  |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |  |  |
| Tyr | Asn | Lys | Ala | Leu | Gln | Asn | Phe | Gln | Asp | Ile | Ala | Asn | Arg | Leu | Asn |  |  |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ile | Val | Ser | Ser | Ala | Gln | Gly | Ser | Gly | Ile | Asp | Ile | Ser | Leu | Tyr | Lys |  |  |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |  |  |
| Gln | Ile | Tyr | Lys | Asn | Lys | Tyr | Asp | Phe | Val | Glu | Asp | Pro | Asn | Gly | Lys |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |  |  |  |
| Tyr | Ser | Val | Asp | Lys | Asp | Lys | Phe | Asp | Lys | Leu | Tyr | Lys | Ala | Leu | Met |  |  |  |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |  |  |
| Phe | Gly | Phe | Thr | Glu | Thr | Asn | Leu | Ala | Gly | Glu | Tyr | Gly | Ile | Lys | Thr |  |  |  |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |  |  |  |
| Arg | Tyr | Ser | Tyr | Phe | Ser | Glu | Tyr | Leu | Pro | Pro | Ile | Lys | Thr | Glu | Lys |  |  |  |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Leu | Leu | Asp | Asn | Thr | Ile | Tyr | Thr | Gln | Asn | Glu | Gly | Phe | Asn | Ile | Ala |  |  |  |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |  |  |  |
| Ser | Lys | Asn | Leu | Lys | Thr | Glu | Phe | Asn | Gly | Gln | Asn | Lys | Ala | Val | Asn |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |  |  |  |
| Lys | Glu | Ala | Tyr | Glu | Glu | Ile | Ser | Leu | Glu | His | Leu | Val | Ile | Tyr | Arg |  |  |  |  |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |  |  |  |  |
| Ile | Ala | Met | Cys | Lys | Pro | Val | Met | Tyr | Lys | Asn | Thr | Gly | Lys | Ser | Glu |  |  |  |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |  |  |  |
| Gln | Cys | Ile | Ile | Val | Asn | Asn | Glu | Asp | Leu | Phe | Phe | Ile | Ala | Asn | Lys |  |  |  |  |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Asp | Ser | Phe | Ser | Lys | Asp | Leu | Ala | Lys | Ala | Glu | Thr | Ile | Ala | Tyr | Asn |  |  |  |  |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |  |  |  |  |
| Thr | Gln | Asn | Asn | Thr | Ile | Glu | Asn | Asn | Phe | Ser | Ile | Asp | Gln | Leu | Ile |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |  |  |  |  |
| Leu | Asp | Asn | Asp | Leu | Ser | Ser | Gly | Ile | Asp | Leu | Pro | Asn | Glu | Asn | Thr |  |  |  |  |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |  |  |  |  |

# ES 2 671 493 T3

Glu Pro Phe Thr Asn Phe Asp Asp Ile Asp Ile Pro Val Tyr Ile Lys  
 515 520 525  
 Gln Ser Ala Leu Lys Lys Ile Phe Val Asp Gly Asp Ser Leu Phe Glu  
 530 535 540  
 Tyr Leu His Ala Gln Thr Phe Pro Ser Asn Ile Glu Asn Leu Gln Leu  
 545 550 555 560  
 Thr Asn Ser Leu Asn Asp Ala Leu Arg Asn Asn Asn Lys Val Tyr Thr  
 565 570 575  
 Phe Phe Ser Thr Asn Leu Val Glu Lys Ala Asn Thr Val Val Gly Ala  
 580 585 590  
 Ser Leu Phe Val Asn Trp Val Lys Gly Val Ile Asp Asp Phe Thr Ser  
 595 600 605  
 Glu Ser Thr Gln Lys Ser Thr Ile Asp Lys Val Ser Asp Val Ser Ile  
 610 615 620  
 Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Val Gly Asn Glu Thr Ala  
 625 630 635 640  
 Lys Glu Asn Phe Lys Asn Ala Phe Glu Ile Gly Gly Ala Ala Ile Leu  
 645 650 655  
 Met Glu Phe Ile Pro Glu Leu Ile Val Pro Ile Val Gly Phe Phe Thr  
 660 665 670  
 Leu Glu Ser Tyr Val Gly Asn Lys Gly His Ile Ile Met Thr Ile Ser  
 675 680 685  
 Asn Ala Leu Lys Lys Arg Asp Gln Lys Trp Thr Asp Met Tyr Gly Leu  
 690 695 700  
 Ile Val Ser Gln Trp Leu Ser Thr Val Asn Thr Gln Phe Tyr Thr Ile  
 705 710 715 720  
 Lys Glu Arg Met Tyr Asn Ala Leu Asn Asn Gln Ser Gln Ala Ile Glu  
 725 730 735  
 Lys Ile Ile Glu Asp Gln Tyr Asn Arg Tyr Ser Glu Glu Asp Lys Met  
 740 745 750  
 Asn Ile Asn Ile Asp Phe Asn Asp Ile Asp Phe Lys Leu Asn Gln Ser  
 755 760 765

# ES 2 671 493 T3

Ile Asn Leu Ala Ile Asn Asn Ile Asp Asp Phe Ile Asn Gln Cys Ser  
 770 775 780  
 Ile Ser Tyr Leu Met Asn Arg Met Ile Pro Leu Ala Val Lys Lys Leu  
 785 790 795 800  
 Lys Asp Phe Asp Asp Asn Leu Lys Arg Asp Leu Leu Glu Tyr Ile Asp  
 805 810 815  
 Thr Asn Glu Leu Tyr Leu Leu Asp Glu Val Asn Ile Leu Lys Ser Lys  
 820 825 830  
 Val Asn Arg His Leu Lys Asp Ser Ile Pro Phe Asp Leu Ser Leu Tyr  
 835 840 845  
 Thr Lys Asp Thr Ile Leu Ile Gln Val Phe Asn Asn Tyr Ile Ser Asn  
 850 855 860  
 Ile Ser Ser Asn Ala Ile Leu Ser Leu Ser Tyr Arg Gly Gly Arg Leu  
 865 870 875 880  
 Ile Asp Ser Ser Gly Tyr Gly Ala Thr Met Asn Val Gly Ser Asp Val  
 885 890 895  
 Ile Phe Asn Asp Ile Gly Asn Gly Gln Phe Lys Leu Asn Asn Ser Glu  
 900 905 910  
 Asn Ser Asn Ile Thr Ala His Gln Ser Lys Phe Val Val Tyr Asp Ser  
 915 920 925  
 Met Phe Asp Asn Phe Ser Ile Asn Phe Trp Val Arg Thr Pro Lys Tyr  
 930 935 940  
 Asn Asn Asn Asp Ile Gln Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Tyr Thr Ile Ile  
 945 950 955 960  
 Ser Cys Ile Lys Asn Asp Ser Gly Trp Lys Val Ser Ile Lys Gly Asn  
 965 970 975  
 Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile Asp Val Asn Ala Lys Ser Lys Ser Ile  
 980 985 990  
 Phe Phe Glu Tyr Ser Ile Lys Asp Asn Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys  
 995 1000 1005  
 Trp Phe Ser Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asn Ala Asn  
 1010 1015 1020

# ES 2 671 493 T3

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

# ES 2 671 493 T3

1250

1255

1260

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

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

Gly Trp Thr Glu  
1295

<210> 14

<211> 1315

<212> PRT

5 <213> Clostridium tetani

<400> 14

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

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

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

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

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

Asp Ser Asp Lys Asp Arg Phe Leu Gln Thr Met Val Lys Leu Phe Asn  
85 90 95

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

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

Asp Thr Asn Ser Asn Ser Val Ser Phe Asn Leu Leu Glu Gln Asp Pro  
130 135 140

Ser Gly Ala Thr Thr Lys Ser Ala Met Leu Thr Asn Leu Ile Ile Phe  
145 150 155 160

Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Lys Asn Glu Val Arg Gly Ile Val Leu  
165 170 175

# ES 2 671 493 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Val | Asp | Asn | Lys | Asn | Tyr | Phe | Pro | Cys | Arg | Asp | Gly | Phe | Gly | Ser | 180 | 185 | 190 |
| Ile | Met | Gln | Met | Ala | Phe | Cys | Pro | Glu | Tyr | Val | Pro | Thr | Phe | Asp | Asn | 195 | 200 | 205 |
| Val | Ile | Glu | Asn | Ile | Thr | Ser | Leu | Thr | Ile | Gly | Lys | Ser | Lys | Tyr | Phe | 210 | 215 | 220 |
| Gln | Asp | Pro | Ala | Leu | Leu | Leu | Met | His | Glu | Leu | Ile | His | Val | Leu | His | 225 | 230 | 235 |
| Gly | Leu | Tyr | Gly | Met | Gln | Val | Ser | Ser | His | Glu | Ile | Ile | Pro | Ser | Lys | 245 | 250 | 255 |
| Gln | Glu | Ile | Tyr | Met | Gln | His | Thr | Tyr | Pro | Ile | Ser | Ala | Glu | Glu | Leu | 260 | 265 | 270 |
| Phe | Thr | Phe | Gly | Gly | Gln | Asp | Ala | Asn | Leu | Ile | Ser | Ile | Asp | Ile | Lys | 275 | 280 | 285 |
| Asn | Asp | Leu | Tyr | Glu | Lys | Thr | Leu | Asn | Asp | Tyr | Lys | Ala | Ile | Ala | Asn | 290 | 295 | 300 |
| Lys | Leu | Ser | Gln | Val | Thr | Ser | Cys | Asn | Asp | Pro | Asn | Ile | Asp | Ile | Asp | 305 | 310 | 315 |
| Ser | Tyr | Lys | Gln | Ile | Tyr | Gln | Gln | Lys | Tyr | Gln | Phe | Asp | Lys | Asp | Ser | 325 | 330 | 335 |
| Asn | Gly | Gln | Tyr | Ile | Val | Asn | Glu | Asp | Lys | Phe | Gln | Ile | Leu | Tyr | Asn | 340 | 345 | 350 |
| Ser | Ile | Met | Tyr | Gly | Phe | Thr | Glu | Ile | Glu | Leu | Gly | Lys | Lys | Phe | Asn | 355 | 360 | 365 |
| Ile | Lys | Thr | Arg | Leu | Ser | Tyr | Phe | Ser | Met | Asn | His | Asp | Pro | Val | Lys | 370 | 375 | 380 |
| Ile | Pro | Asn | Leu | Leu | Asp | Asp | Thr | Ile | Tyr | Asn | Asp | Thr | Glu | Gly | Phe | 385 | 390 | 395 |
| Asn | Ile | Glu | Ser | Lys | Asp | Leu | Lys | Ser | Glu | Tyr | Lys | Gly | Gln | Asn | Met | 405 | 410 | 415 |
| Arg | Val | Asn | Thr | Asn | Ala | Phe | Arg | Asn | Val | Asp | Gly | Ser | Gly | Leu | Val |     |     |     |

# ES 2 671 493 T3

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Ser Lys Leu Ile Gly Leu Cys Lys Lys Ile Ile Pro Pro Thr Asn Ile |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Arg Glu Asn Leu Tyr Asn Arg Thr Ala Ser Leu Thr Asp Leu Gly Gly |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
| Glu Leu Cys Ile Lys Ile Lys Asn Glu Asp Leu Thr Phe Ile Ala Glu |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 |
| Lys Asn Ser Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gln Asp Glu Ile Val Ser Tyr |     |     |
| 485                                                             | 490 | 495 |
| Asn Thr Lys Asn Lys Pro Leu Asn Phe Asn Tyr Ser Leu Asp Lys Ile |     |     |
| 500                                                             | 505 | 510 |
| Ile Val Asp Tyr Asn Leu Gln Ser Lys Ile Thr Leu Pro Asn Asp Arg |     |     |
| 515                                                             | 520 | 525 |
| Thr Thr Pro Val Thr Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Pro Glu Tyr Lys Ser |     |     |
| 530                                                             | 535 | 540 |
| Asn Ala Ala Ser Thr Ile Glu Ile His Asn Ile Asp Asp Asn Thr Ile |     |     |
| 545                                                             | 550 | 555 |
| Tyr Gln Tyr Leu Tyr Ala Gln Lys Ser Pro Thr Thr Leu Gln Arg Ile |     |     |
| 565                                                             | 570 | 575 |
| Thr Met Thr Asn Ser Val Asp Asp Ala Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile |     |     |
| 580                                                             | 585 | 590 |
| Tyr Ser Tyr Phe Pro Ser Val Ile Ser Lys Val Asn Gln Gly Ala Gln |     |     |
| 595                                                             | 600 | 605 |
| Gly Ile Leu Phe Leu Gln Trp Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr |     |     |
| 610                                                             | 615 | 620 |
| Asn Glu Ser Ser Gln Lys Thr Thr Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser |     |     |
| 625                                                             | 630 | 635 |
| Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Val Lys Gln Gly |     |     |
| 645                                                             | 650 | 655 |
| Tyr Glu Gly Asn Phe Ile Gly Ala Leu Glu Thr Thr Gly Val Val Leu |     |     |
| 660                                                             | 665 | 670 |

# ES 2 671 493 T3

Leu Leu Glu Tyr Ile Pro Glu Ile Thr Leu Pro Val Ile Ala Ala Leu  
 675 680 685  
 Ser Ile Ala Glu Ser Ser Thr Gln Lys Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile  
 690 695 700  
 Asp Asn Phe Leu Glu Lys Arg Tyr Glu Lys Trp Ile Glu Val Tyr Lys  
 705 710 715 720  
 Leu Val Lys Ala Lys Trp Leu Gly Thr Val Asn Thr Gln Phe Gln Lys  
 725 730 735  
 Arg Ser Tyr Gln Met Tyr Arg Ser Leu Glu Tyr Gln Val Asp Ala Ile  
 740 745 750  
 Lys Lys Ile Ile Asp Tyr Glu Tyr Lys Ile Tyr Ser Gly Pro Asp Lys  
 755 760 765  
 Glu Gln Ile Ala Asp Glu Ile Asn Asn Leu Lys Asn Lys Leu Glu Glu  
 770 775 780  
 Lys Ala Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Ile Phe Met Arg Glu Ser  
 785 790 795 800  
 Ser Arg Ser Phe Leu Val Asn Gln Met Ile Asn Glu Ala Lys Lys Gln  
 805 810 815  
 Leu Leu Glu Phe Asp Thr Gln Ser Lys Asn Ile Leu Met Gln Tyr Ile  
 820 825 830  
 Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu  
 835 840 845  
 Ser Lys Ile Asn Lys Val Phe Ser Thr Pro Ile Pro Phe Ser Tyr Ser  
 850 855 860  
 Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile  
 865 870 875 880  
 Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile  
 885 890 895  
 Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala  
 900 905 910  
 Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn  
 915 920 925

# ES 2 671 493 T3

|      |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |      |     |      |     |     |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|-----|
| Glu  | Ser | Ser | Glu | Val | Ile | Val  | His  | Lys | Ala | Met | Asp  | Ile | Glu  | Tyr | Asn |
| 930  |     |     |     |     |     | 935  |      |     |     |     | 940  |     |      |     |     |
| Asp  | Met | Phe | Asn | Asn | Phe | Thr  | Val  | Ser | Phe | Trp | Leu  | Arg | Val  | Pro | Lys |
| 945  |     |     |     |     | 950 |      |      |     |     | 955 |      |     |      |     | 960 |
| Val  | Ser | Ala | Ser | His | Leu | Glu  | Gln  | Tyr | Gly | Thr | Asn  | Glu | Tyr  | Ser | Ile |
|      |     |     |     | 965 |     |      |      |     | 970 |     |      |     |      | 975 |     |
| Ile  | Ser | Ser | Met | Lys | Lys | His  | Ser  | Leu | Ser | Ile | Gly  | Ser | Gly  | Trp | Ser |
|      |     |     | 980 |     |     |      |      | 985 |     |     |      |     |      | 990 |     |
| Val  | Ser | Leu | Lys | Gly | Asn | Asn  | Leu  | Ile | Trp | Thr | Leu  | Lys | Asp  | Ser | Ala |
|      |     | 995 |     |     |     |      | 1000 |     |     |     |      |     | 1005 |     |     |
| Gly  | Glu | Val | Arg | Gln | Ile | Thr  | Phe  | Arg | Asp | Leu | Pro  | Asp | Lys  | Phe |     |
| 1010 |     |     |     |     |     | 1015 |      |     |     |     | 1020 |     |      |     |     |
| Asn  | Ala | Tyr | Leu | Ala | Asn | Lys  | Trp  | Val | Phe | Ile | Thr  | Ile | Thr  | Asn |     |
| 1025 |     |     |     |     |     | 1030 |      |     |     |     | 1035 |     |      |     |     |
| Asp  | Arg | Leu | Ser | Ser | Ala | Asn  | Leu  | Tyr | Ile | Asn | Gly  | Val | Leu  | Met |     |
| 1040 |     |     |     |     |     | 1045 |      |     |     |     | 1050 |     |      |     |     |
| Gly  | Ser | Ala | Glu | Ile | Thr | Gly  | Leu  | Gly | Ala | Ile | Arg  | Glu | Asp  | Asn |     |
| 1055 |     |     |     |     |     | 1060 |      |     |     |     | 1065 |     |      |     |     |
| Asn  | Ile | Thr | Leu | Lys | Leu | Asp  | Arg  | Cys | Asn | Asn | Asn  | Asn | Gln  | Tyr |     |
| 1070 |     |     |     |     |     | 1075 |      |     |     |     | 1080 |     |      |     |     |
| Val  | Ser | Ile | Asp | Lys | Phe | Arg  | Ile  | Phe | Cys | Lys | Ala  | Leu | Asn  | Pro |     |
| 1085 |     |     |     |     |     | 1090 |      |     |     |     | 1095 |     |      |     |     |
| Lys  | Glu | Ile | Glu | Lys | Leu | Tyr  | Thr  | Ser | Tyr | Leu | Ser  | Ile | Thr  | Phe |     |
| 1100 |     |     |     |     |     | 1105 |      |     |     |     | 1110 |     |      |     |     |
| Leu  | Arg | Asp | Phe | Trp | Gly | Asn  | Pro  | Leu | Arg | Tyr | Asp  | Thr | Glu  | Tyr |     |
| 1115 |     |     |     |     |     | 1120 |      |     |     |     | 1125 |     |      |     |     |
| Tyr  | Leu | Ile | Pro | Val | Ala | Ser  | Ser  | Ser | Lys | Asp | Val  | Gln | Leu  | Lys |     |
| 1130 |     |     |     |     |     | 1135 |      |     |     |     | 1140 |     |      |     |     |
| Asn  | Ile | Thr | Asp | Tyr | Met | Tyr  | Leu  | Thr | Asn | Ala | Pro  | Ser | Tyr  | Thr |     |
| 1145 |     |     |     |     |     | 1150 |      |     |     |     | 1155 |     |      |     |     |
| Asn  | Gly | Lys | Leu | Asn | Ile | Tyr  | Tyr  | Arg | Arg | Leu | Tyr  | Asn | Gly  | Leu |     |
| 1160 |     |     |     |     |     | 1165 |      |     |     |     | 1170 |     |      |     |     |

|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Lys  | Phe | Ile | Ile | Lys | Arg | Tyr  | Thr | Pro | Asn | Asn | Glu  | Ile | Asp | Ser |
| 1175 |     |     |     |     |     | 1180 |     |     |     |     | 1185 |     |     |     |
| Phe  | Val | Lys | Ser | Gly | Asp | Phe  | Ile | Lys | Leu | Tyr | Val  | Ser | Tyr | Asn |
| 1190 |     |     |     |     |     | 1195 |     |     |     |     | 1200 |     |     |     |
| Asn  | Asn | Glu | His | Ile | Val | Gly  | Tyr | Pro | Lys | Asp | Gly  | Asn | Ala | Phe |
| 1205 |     |     |     |     |     | 1210 |     |     |     |     | 1215 |     |     |     |
| Asn  | Asn | Leu | Asp | Arg | Ile | Leu  | Arg | Val | Gly | Tyr | Asn  | Ala | Pro | Gly |
| 1220 |     |     |     |     |     | 1225 |     |     |     |     | 1230 |     |     |     |
| Ile  | Pro | Leu | Tyr | Lys | Lys | Met  | Glu | Ala | Val | Lys | Leu  | Arg | Asp | Leu |
| 1235 |     |     |     |     |     | 1240 |     |     |     |     | 1245 |     |     |     |
| Lys  | Thr | Tyr | Ser | Val | Gln | Leu  | Lys | Leu | Tyr | Asp | Asp  | Lys | Asn | Ala |
| 1250 |     |     |     |     |     | 1255 |     |     |     |     | 1260 |     |     |     |
| Ser  | Leu | Gly | Leu | Val | Gly | Thr  | His | Asn | Gly | Gln | Ile  | Gly | Asn | Asp |
| 1265 |     |     |     |     |     | 1270 |     |     |     |     | 1275 |     |     |     |
| Pro  | Asn | Arg | Asp | Ile | Leu | Ile  | Ala | Ser | Asn | Trp | Tyr  | Phe | Asn | His |
| 1280 |     |     |     |     |     | 1285 |     |     |     |     | 1290 |     |     |     |
| Leu  | Lys | Asp | Lys | Ile | Leu | Gly  | Cys | Asp | Trp | Tyr | Phe  | Val | Pro | Thr |
| 1295 |     |     |     |     |     | 1300 |     |     |     |     | 1305 |     |     |     |
| Asp  | Glu | Gly | Trp | Thr | Asn | Asp  |     |     |     |     |      |     |     |     |
| 1310 |     |     |     |     |     | 1315 |     |     |     |     |      |     |     |     |

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Etiqueta sintética 6xHis

<400> 15

His His His His His His

1

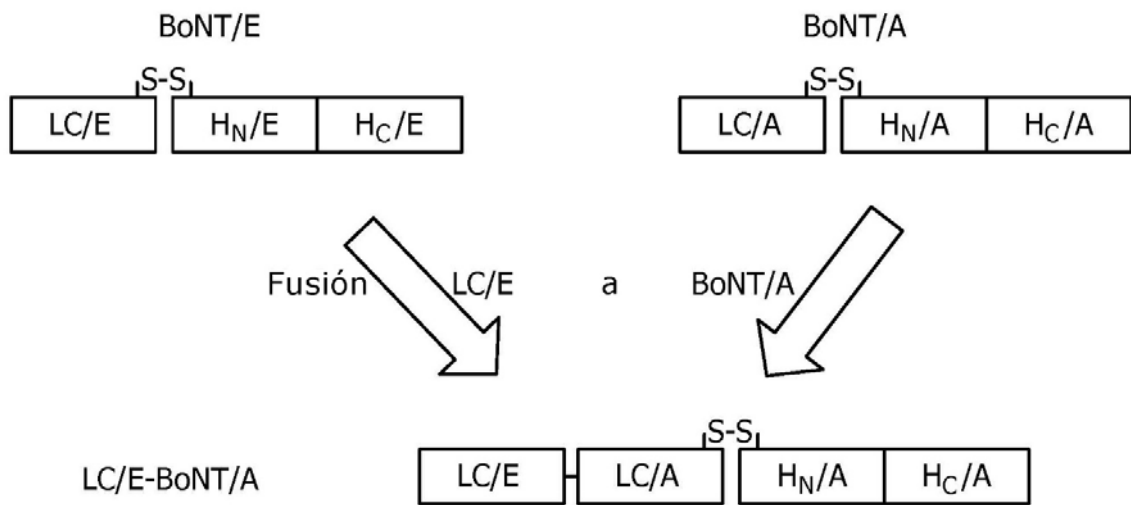
5

# REIVINDICACIONES

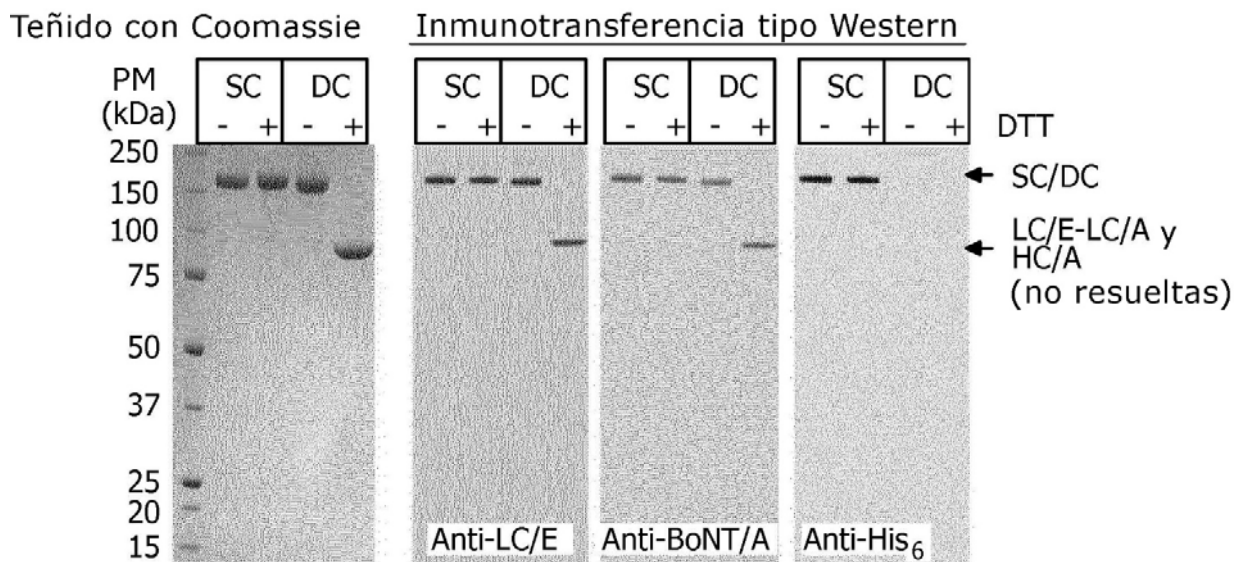
1. Una composición que comprende un derivado de neurotoxina clostrídica, comprendiendo dicho derivado de neurotoxina clostrídica un polipéptido que incluye:  
5  
a) un dominio de unión,  
b) un dominio de translocación, y  
c) un primer dominio endopeptidasa derivado de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/A, y  
d) un segundo dominio endopeptidasa derivado de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/E;  
10 en el que cada uno de dicho primer dominio endopeptidasa y de dicho segundo dominio endopeptidasa es proteolíticamente activo.
2. La composición de la reivindicación 1, donde dichos dominio de unión, dominio de translocación, primer dominio endopeptidasa y segundo dominio endopeptidasa están comprendidos en una sola cadena  
15 polipeptídica.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2, donde dicho polipéptido comprende además un sitio de escisión de endopeptidasa selectiva localizado entre una primera región que comprende dicho dominio de unión y dicho dominio de translocación, y una segunda región que comprende dichos primer dominio endopeptidasa y  
20 segundo dominio endopeptidasa.
4. La composición de la reivindicación 1, donde dichos dominio de unión, dominio de translocación, primer dominio endopeptidasa y segundo dominio endopeptidasa están comprendidos en más de una cadena polipeptídica, preferentemente donde al menos dos de dichas cadenas polipeptídicas están unidas mediante un  
25 enlace disulfuro.
5. La composición de la reivindicación 1 comprende una primera cadena polipeptídica que comprende dicho dominio de unión y dicho dominio de translocación, y una segunda cadena polipeptídica que comprende dichos primer dominio endopeptidasa y segundo dominio endopeptidasa.  
30
6. La composición de la reivindicación 4 comprende una primera cadena polipeptídica que comprende dicho dominio de unión y dicho dominio de translocación, y una segunda cadena polipeptídica que comprende dichos primer dominio endopeptidasa y segundo dominio endopeptidasa.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el dominio de unión y el dominio de translocación se derivan de la neurotoxina clostrídica BoNT/A.  
35
8. La composición de la reivindicación 7 comprende una primera secuencia de aminoácidos que comprende un primer sitio de escisión de proteasa localizado entre el dominio de translocación y el primer dominio endopeptidasa.  
40
9. La composición de la reivindicación 7 comprende además:  
a) una secuencia de aminoácidos de polihistadina situada en el lado carboxilo terminal del dominio de unión, o en el extremo amino terminal de dicho segundo dominio endopeptidasa;  
45 b) una primera secuencia de aminoácidos que comprende una primera secuencia de aminoácidos que comprende un primer sitio de escisión de proteasa localizado entre el dominio de translocación y el primer dominio endopeptidasa; y  
c) una segunda secuencia de aminoácidos que comprende un segundo sitio de escisión de proteasa localizado entre  
50 dicho segundo dominio endopeptidasa y la secuencia de aminoácidos de la polihistadina, o entre dicho dominio de unión y la secuencia de aminoácidos de la polihistadina.
10. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende un derivado de neurotoxina clostrídica, comprendiendo dicho ácido nucleico una codificación de un único marco de lectura abierto, en la secuencia de carboxi terminal a amino terminal: un dominio de unión, un dominio de translocación, un primer dominio endopeptidasa derivado de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/A y un segundo dominio endopeptidasa derivado de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/E, en el que cada uno de dicho primer dominio endopeptidasa y dicho segundo dominio endopeptidasa es proteolíticamente activo, opcionalmente en donde los codones que codifican cada uno del dominio de unión, el dominio de translocación, primer dominio endopeptidasa, y el segundo  
60 dominio endopeptidasa, se optimizan para la expresión en un tipo de célula seleccionada de entre un grupo que

consiste en: una célula bacteriana, una célula de mamífero, una célula de levadura y una célula de insecto, preferentemente en donde los codones se eligen para la expresión mejorada en una célula bacteriana de *E. coli*.

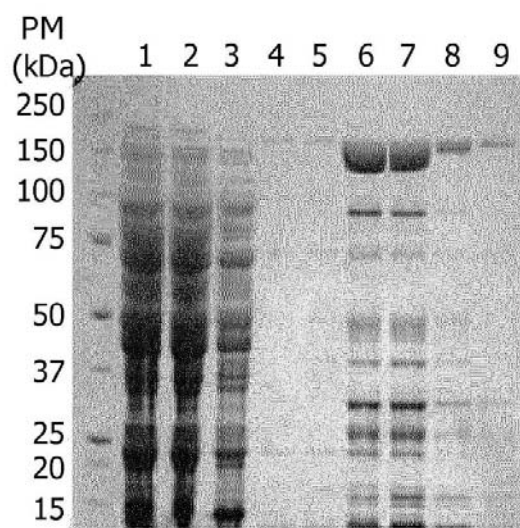
11. El ácido nucleico de la reivindicación 10, donde el dominio de unión, el dominio de translocación están  
5 codificados por secuencias de ácido nucleico derivadas a partir de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/A, preferentemente en donde dicho marco de lectura abierto codifica al menos seis residuos de histadina entre la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de unión y el codón de terminación.
12. Una composición terapéutica que comprende un derivado de neurotoxina clostrídica, comprendiendo  
10 dicho derivado de neurotoxina clostrídica un polipéptido que incluye: un dominio de unión, un dominio de translocación, un primer dominio endopeptidasa derivado de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/A y un segundo dominio endopeptidasa derivado de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/E, donde cada uno de dicho primer dominio endopeptidasa y dicho segundo dominio endopeptidasa es proteolíticamente activo, para uso en el  
15 tratamiento del dolor crónico, preferentemente donde dicho dolor crónico se selecciona de entre el grupo que consiste en dolor nociceptivo inflamatorio y dolor neuropático más preferentemente donde dicho dolor crónico es dolor neuropático, más preferentemente donde el dolor neuropático se selecciona entre el grupo formado por dolor por cáncer, dolor postoperatorio, dolor neuropático, alodinia, neuralgia posherpética, síndrome del colon irritable y otro dolor visceral, dolor óseo, neuropatía periférica, dolor relacionado con el sistema circulatorio, y dolor de cabeza.
- 20 13. Una composición terapéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicho dolor crónico es dolor nociceptivo inflamatorio o dolor artrítico.
14. Una composición terapéutica para su uso para el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 12, donde el dominio de unión y el dominio de translocación de dicha composición terapéutica se derivan de una  
25 neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/A.
15. Una composición que comprende un derivado de neurotoxina clostrídica, comprendiendo dicho derivado de neurotoxina clostrídica un polipéptido que incluye:  
30 un dominio de unión, un dominio de translocación, un primer dominio endopeptidasa derivado de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/A y un segundo dominio endopeptidasa derivado de una neurotoxina clostrídica subtipo BoNT/E, en el que cada uno de dichos primer dominio endopeptidasa y dicho segundo dominio endopeptidasa es proteolíticamente activo, para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor crónico.



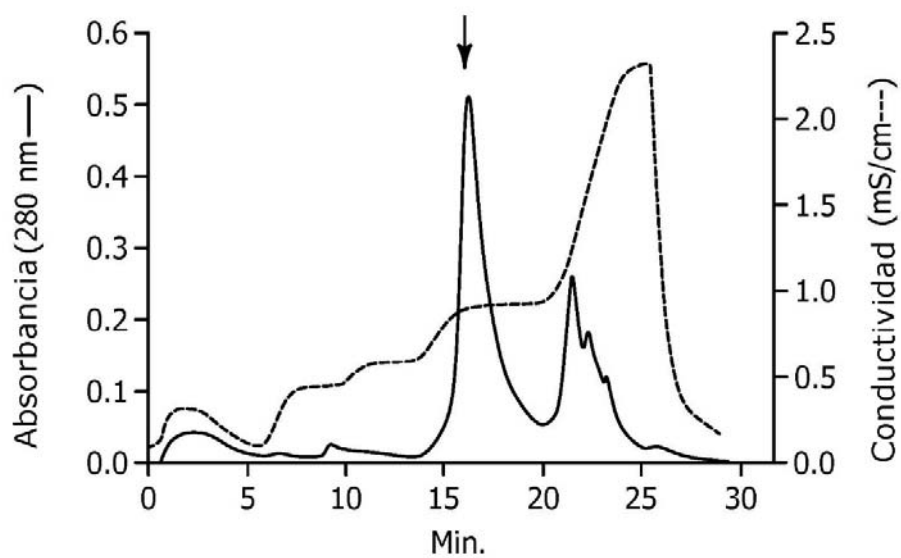
**FIG. 1**



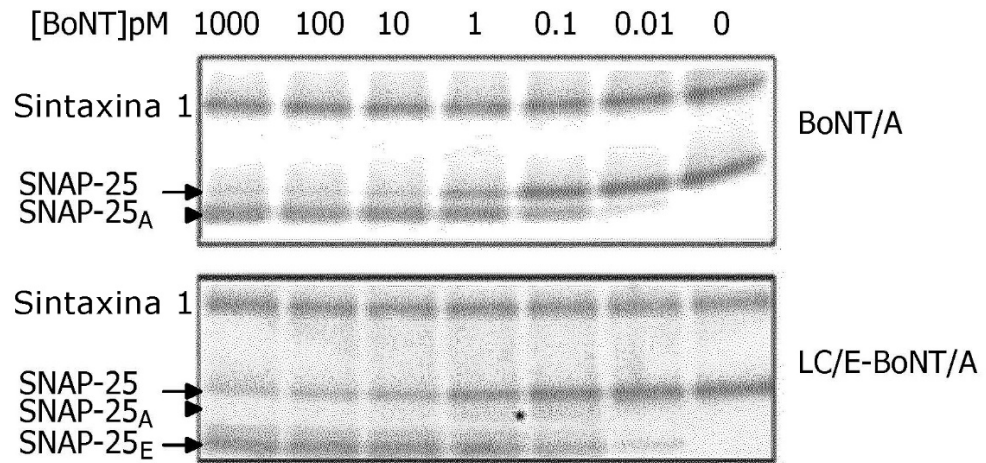
**FIG. 3**



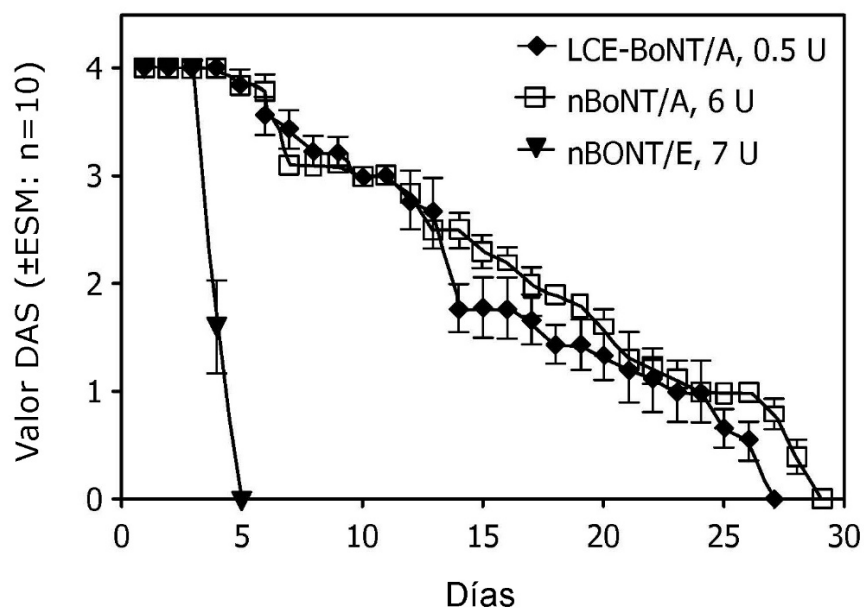
**FIG. 2A**



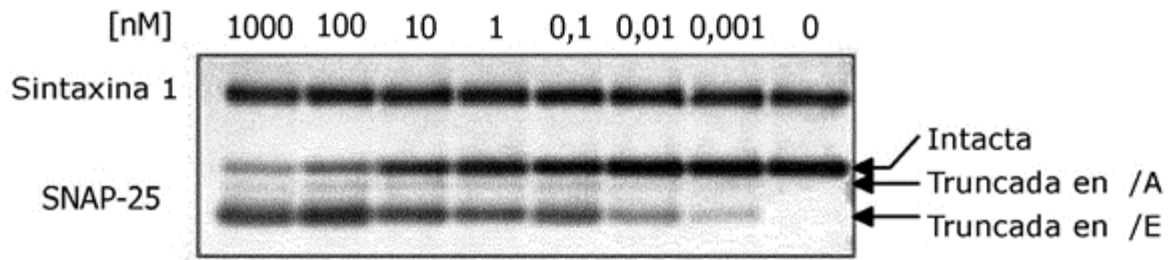
**FIG. 2B**



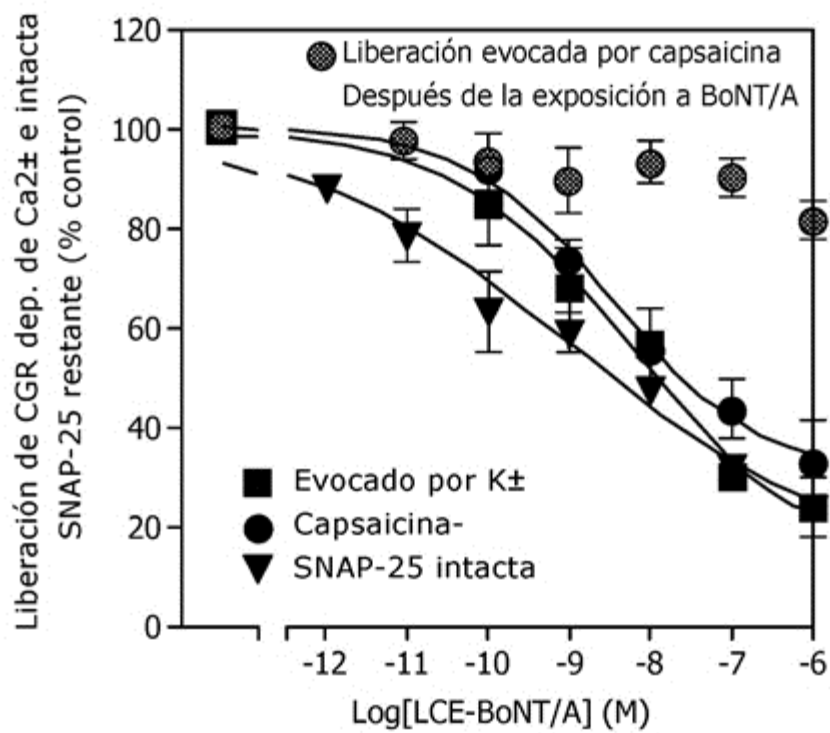
**FIG. 4**



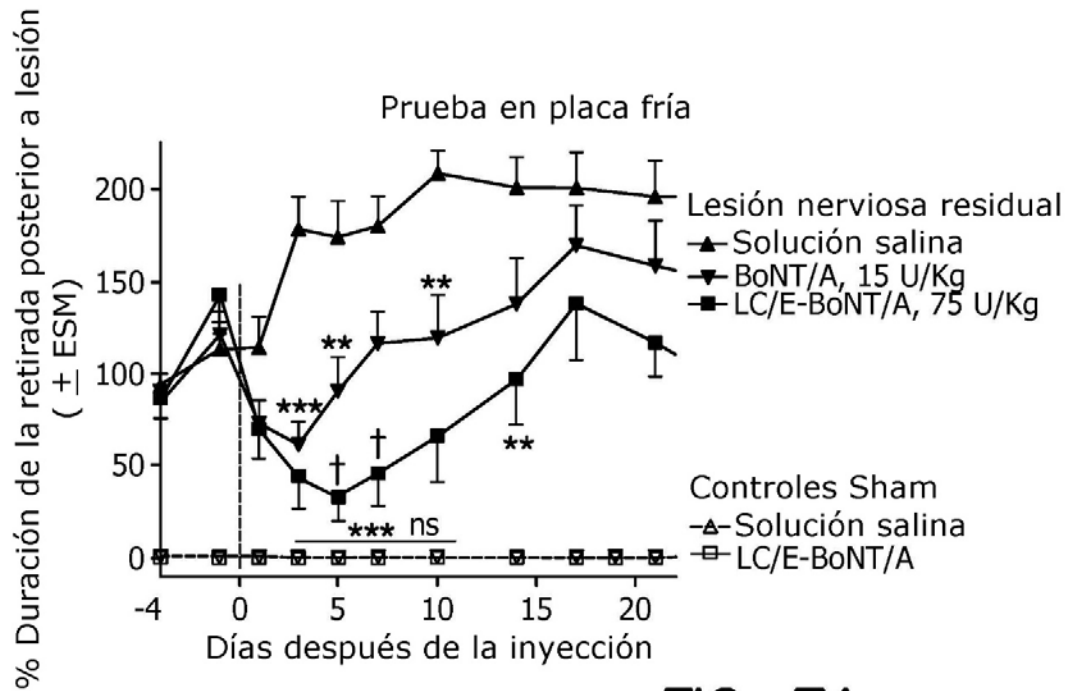
**FIG. 5**



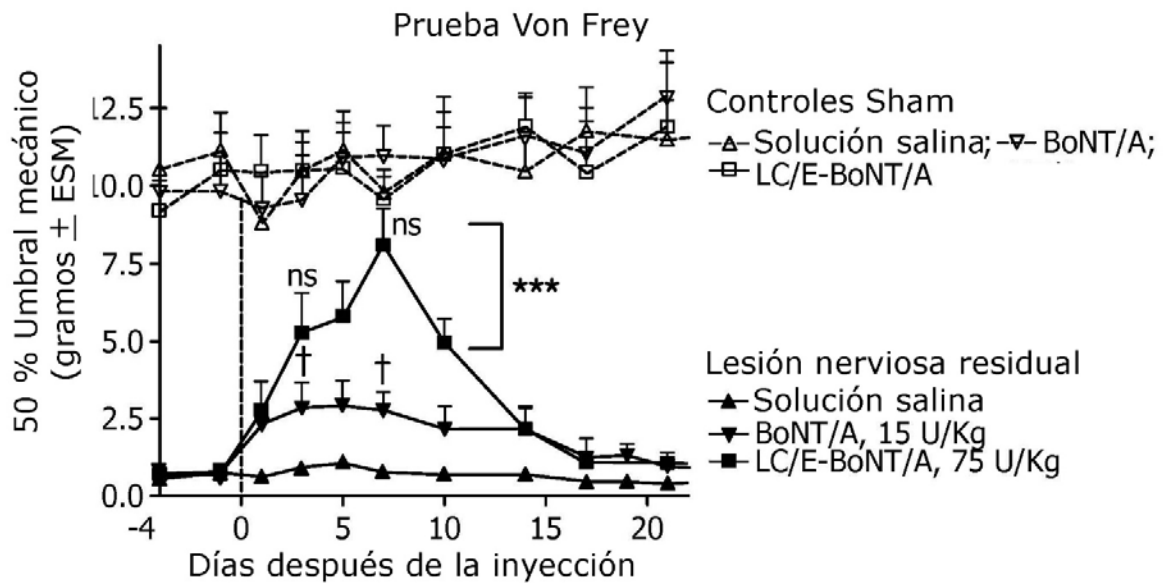
**FIG. 6A**



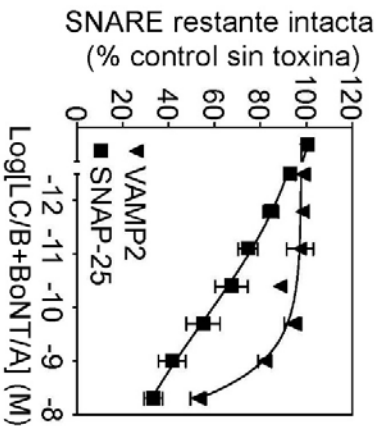
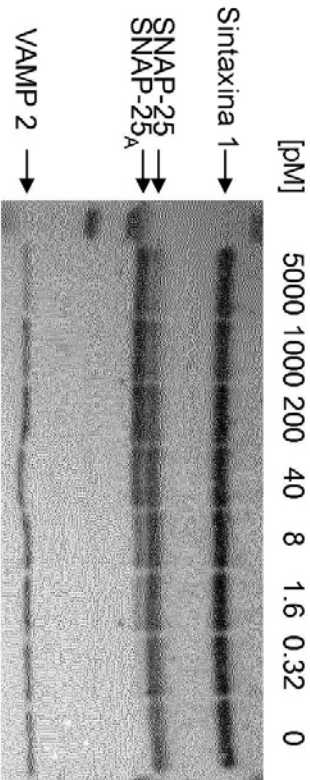
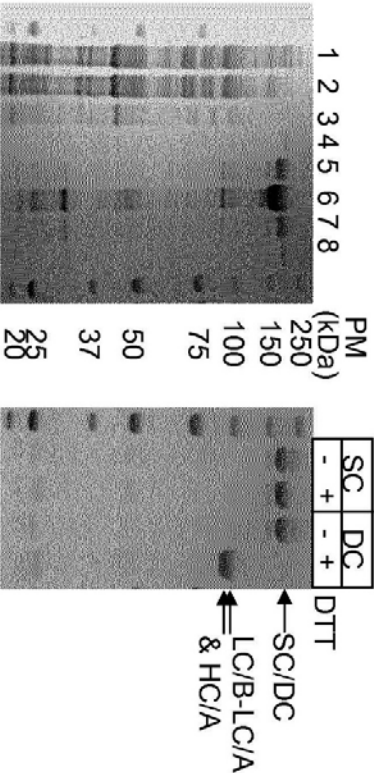
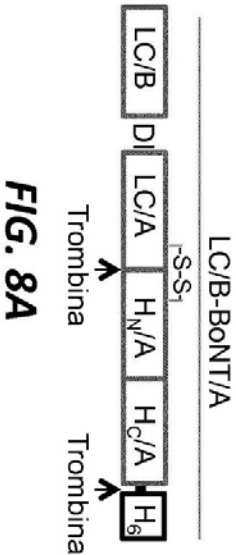
**FIG. 6B**

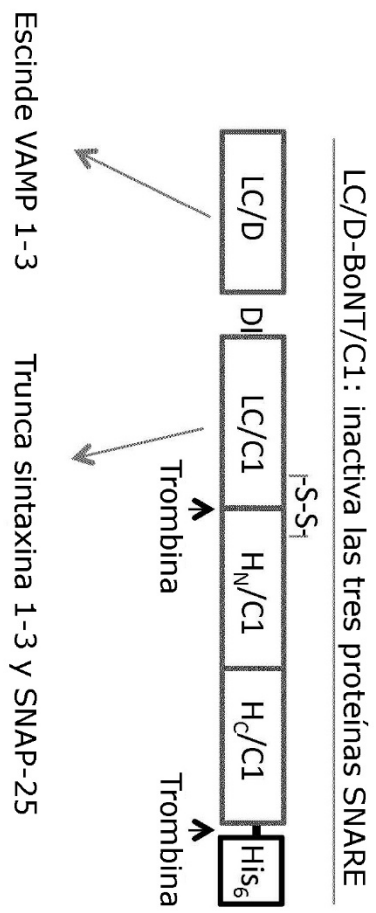


**FIG. 7A**



**FIG. 7B**





**FIG. 9**

Fig. 10A

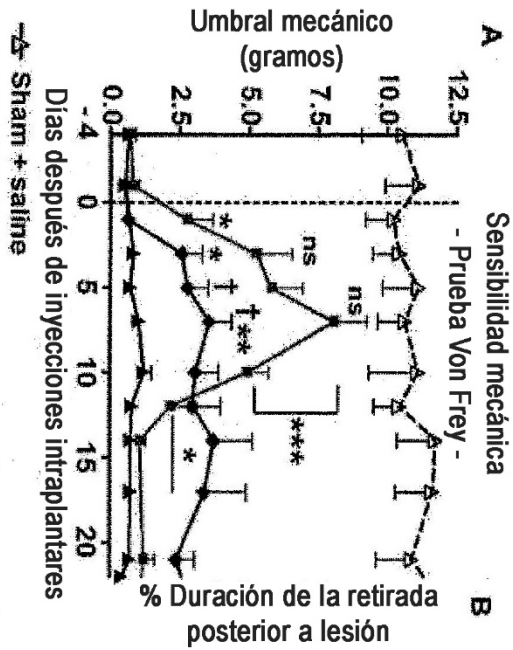
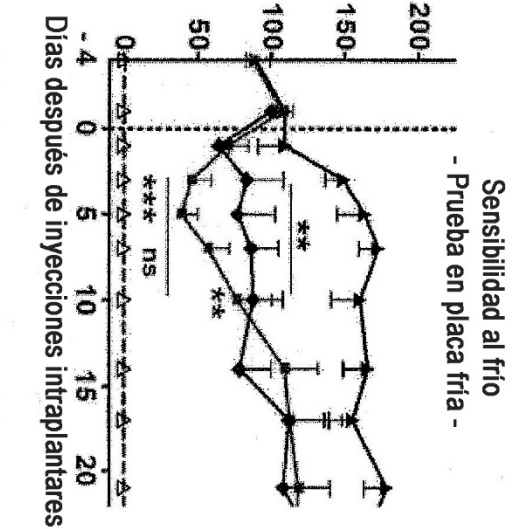
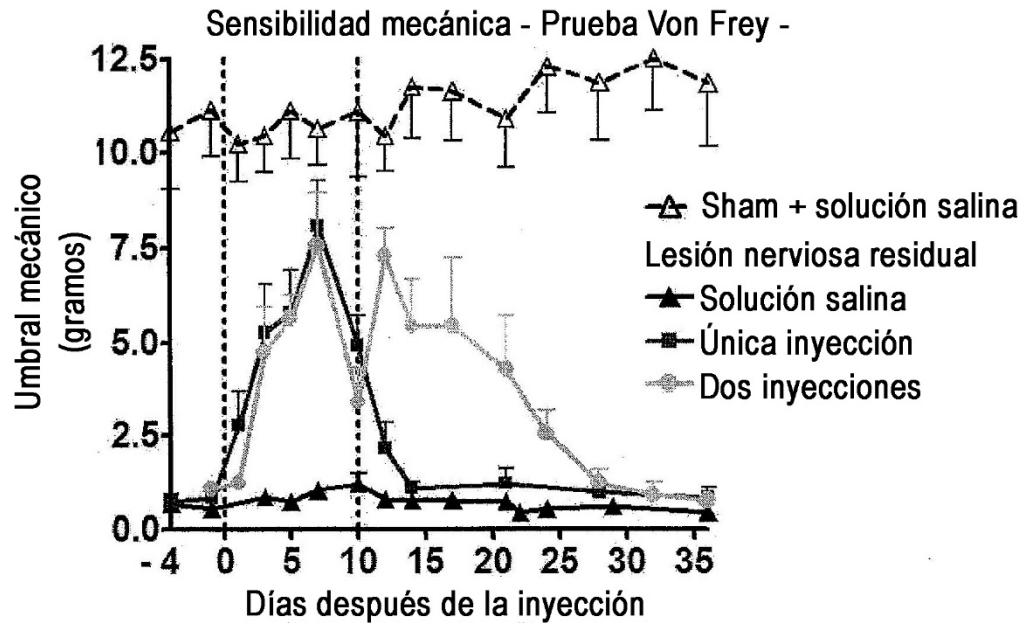


Fig. 10B





Los datos representan media  $\pm$  ESM. Las líneas verticales de puntos indican el tiempo de las inyecciones de tratamiento local. La administración de 75 U/Kg de LC/E-BoNT/A se repitió después de 10 días (grupo de "dos inyecciones").

**FIG 11**