

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 277**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2010** **E 16159320 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018** **EP 3067696**

54 Título: **Células modificadas genéticamente para el ensayo de transferencia de energía por resonancia con el resto del sustrato de sinaptobrevina**

30 Prioridad:

16.10.2009 US 252315 P

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

18.07.2018

73 Titular/es:

**BIOMADISON, INC. (100.0%)
1568 Luneta Drive,
Del Mar, CA 92014, US**

72 Inventor/es:

**TUCKER, WARD y
ZEY TIN, FÚSÚ N.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 676 277 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

Células modificadas genéticamente para el ensayo de transferencia de energía por resonancia con el resto del sustrato de sinaptobrevina

5 Campo de la invención

El campo de la invención es la transferencia de energía por resonancia de Forster (FRET) para determinar la actividad proteasa, especialmente para ensayos de proteasas para las neurotoxinas de *Botulinum* BoNTs que escinden la sinaptobrevina.

Antecedentes de la invención

15 Las neurotoxinas de *Botulinum* (BoNTs) son proteínas extremadamente tóxicas y pueden clasificarse en subgrupos distintos en base a, entre otros, la secuencia del péptido y/o la especificidad del sustrato. Todas las BoNTs naturales (BoNT/A-G) se componen de una cadena pesada que media la entrada de las toxinas en una célula objetivo y una cadena ligera con actividad proteasa dependiente de zinc que hidroliza proteínas SNARE seleccionadas que median la fusión de las vesículas de neurotransmisores a la membrana que forma parte de la hendidura sináptica.

20 Por ejemplo, la cadena ligera de BoNT/A hidroliza con alta especificidad a SNAP-25, que se requiere para la exocitosis mediada por vesículas de la acetilcolina en la hendidura sináptica. Los ensayos conocidos para tal actividad hidrolítica incluyen los descritos en nuestra solicitud internacional copendiente (WO 2009/035476). Aquí, un fluoróforo y un inactivador se unen covalentemente a los extremos respectivos de una secuencia peptídica que incluye, por ejemplo, la secuencia SNAP-25. La escisión por BoNT/A (u otras BoNTs con especificidad de sustrato hacia SNAP-25) dará como resultado la separación física de los productos de escisión y por lo tanto reducirá la inactivación de la fluorescencia, que después puede cuantificarse. Entre otras opciones, a menudo se prefiere que tal ensayo se realice como un ensayo in vitro basado en fase sólida.

30 Si bien tal ensayo es conceptualmente simple y puede usarse para determinar fácilmente la actividad de BoNT/A, BoNT/C o BoNT/E, tal ensayo no puede modificarse simplemente a un ensayo basado en células para la determinación de la actividad de BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F o BoNT/G mediante el reemplazo del motivo SNAP-25 con un dominio SNARE ya que el dominio SNARE incluye un subdominio que se expande en la membrana que colocaría el fluoróforo N-terminal en el lumen de una vesícula. En tal caso, solo se observaría la difusión de la señal de fluorescencia como se informa en cualquier lugar (Dong y otros, PNAS (2004), vol. 101, núm. 41, 14701-14706; o solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2006/0134722).

35 Por lo tanto, todavía existe la necesidad de ensayos para BoNT mejorados, y especialmente ensayos basados en células para BoNT que escinden sinaptobrevina.

40 Breve descripción de la invención

45 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan células genéticamente modificadas de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 8 y un estuche de acuerdo con la reivindicación 15 para analizar la actividad proteasa de las BoNT, y especialmente la actividad proteasa de BoNT/B, BoNT/G, BoNT/D, y/o BoNT/F en un sistema basado en células que usa transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. De acuerdo con la presente invención, las células expresan una o más proteínas híbridas recombinantes junto con al menos una secuencia de escisión y reconocimiento por la proteasa BoNT, en donde la proteína híbrida comprende, además, un dominio transmembrana que no es escindible por la proteasa BoNT y que dirige la proteína híbrida a una vesícula sináptica intracelular.

50 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una célula transfectada con el ácido nucleico presentado en la presente descripción, y generalmente se prefiere que la célula se transfecte establemente con el ácido nucleico. Las células especialmente adecuadas incluyen células neuronales, células tumorales neuroendocrinas, células híbridas y células madre.

55 Con la máxima preferencia, la célula transfectada es una célula neuronal, una célula tumoral neuroendocrina, una célula híbrida o una célula madre. Generalmente se prefiere, además, que A incluya un dominio transmembrana de sinaptobrevina, sinaptofisina, sinapsina I, sinapsina II y/o sinapsina III, y/o que C incluya al menos dos de una secuencia de reconocimiento y escisión de proteasa BoNT/B, una de BoNT/G, una de BoNT/D, y una de BoNT/F. Aunque no se limita a la materia inventiva, se prefiere, además, que un enlazador peptídico se disponga entre uno o más de A y C, A y B, C y B, y C y D, y que el enlazador tenga una longitud igual o menor a 12 aminoácidos. Adicionalmente, se contempla que la célula transfectada pueda ponerse en contacto con un inhibidor de BoNT supuesto o conocido antes de poner en contacto la célula transfectada con la proteasa BoNT. En aspectos especialmente preferidos, la célula transfectada produce dos proteínas híbridas.

65 En modalidades ilustrativas, la proteína híbrida que tiene la estructura de A-B-C-D tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 2, la proteína híbrida que tiene la estructura de A-C-B tiene una secuencia de

acuerdo con sec. con núm. de ident.: 4, y la proteína híbrida que tiene la estructura de A-C-B tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 6.

5 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la célula genéticamente modificada comprende un ácido nucleico recombinante que incluye una secuencia que codifica (I) una proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D. De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, la célula genéticamente modificada comprende un ácido nucleico recombinante que incluye una secuencia que codifica (II) dos proteínas híbridas que tienen una estructura de A-C-B y A-C-D, respectivamente. De acuerdo con la presente invención, A es un dominio transmembrana que no es escindible por la proteasa BoNT, B es una primera proteína fluorescente, C es una
10 secuencia de escisión y reconocimiento por la proteasa BoNT, y D es una segunda proteína fluorescente. Con la máxima preferencia, A comprende un dominio transmembrana de sinaptobrevina, sinaptofisina, sinapsina I, sinapsina II y/o sinapsina III, y/o C comprende al menos dos de una secuencia de reconocimiento y escisión de proteasa BoNT/B, una de BoNT/G, una de BoNT/D, y una de BoNT/F. Cuando se desee, puede proporcionarse al menos una secuencia adicional que codifica un enlazador peptídico que se dispone entre al menos uno de A y C, A
15 y B, C y B, y C y D, en donde el enlazador tiene una longitud igual o menor a 12 aminoácidos.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el ácido nucleico recombinante codifica las dos proteínas híbridas.

20 En ácidos nucleicos ilustrativos, la proteína híbrida que tiene la estructura de A-B-C-D se codifica por una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1, la proteína híbrida que tiene la estructura de A-C-B se codifica por una secuencia de acuerdo con sec. con núm. de ident.: 3, y la proteína híbrida que tiene la estructura de A-C-B se codifica por una secuencia de acuerdo con sec. con núm. de ident.: 5.

25 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la célula comprende un ácido nucleico que codifica las dos proteínas híbridas que tienen la estructura de A-C-B y A-C-D.

Varios objetos, características, aspectos y ventajas de la presente invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las modalidades preferidas de la invención.

30 Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A-1B de la técnica anterior son ensayos FRET conocidos para la determinar la actividad de proteasas BoNT en los que dos proteínas fluorescentes se separan mediante una secuencia de reconocimiento y escisión SNAP25.

35 Las Figuras 2B-2B son ilustraciones esquemáticas para ensayos FRET intramolecular (2A) e intermolecular (2B) para determinar la actividad de proteasas BoNT mediante el uso de la célula genéticamente modificada de acuerdo con la materia objeto de la invención.

40 Las Figuras 3A-3B son mapas de vectores ilustrativos para construcciones FRET recombinantes intramoleculares (3A) e intermoleculares (3B) de la célula genéticamente modificada de acuerdo con la materia objeto de la invención.

45 La Figura 4A representa resultados de FRET ilustrativos para el análisis FRET intramolecular (panel izquierdo) e intermolecular (panel derecho) de la célula genéticamente modificada de acuerdo con la materia objeto de la invención.

La Figura 4B es una representación gráfica de los resultados de los experimentos de la Figura 4A.

50 Descripción detallada

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una célula genéticamente modificada de acuerdo con las reivindicaciones 1 u 8 y un estuche de acuerdo con la reivindicación 15.

55 Debe apreciarse que las proteínas híbridas que se forman en las células así transfectadas incluyen un dominio transmembrana. Por lo tanto, se espera que estas proteínas se localicen en vesículas intracelulares y presenten un sustrato unido a la vesícula. Tras la exposición de las células a BoNT, la endocitosis mediada por la cadena pesada de la BoNT en la célula transfectada es seguida por la presentación de la cadena ligera en la superficie externa de la vesícula, lo que permite que la actividad proteasa de la cadena ligera escinda la secuencia de escisión de la(s) proteína(s) híbrida(s), lo que reduce de esta manera la FRET y proporciona una señal cuantificable. Por lo tanto,
60 debe apreciarse que las células y el estuche presentados en la presente descripción permiten un ensayo basado en células en el que la captación, procesamiento y actividad proteolítica pueden controlarse en condiciones que se parecen mucho a las condiciones naturales.

65 Por el contrario, como se representa esquemáticamente en la Figura 1A de la técnica anterior, un sistema de prueba BoNT/A con una proteína híbrida se muestra en A. La proteína híbrida tiene una primera y segunda proteínas de fluorescencia (CFP y YFP, respectivamente) que se acoplan covalentemente a los extremos respectivos de una

secuencia peptídica intermedia que incluye, además, una secuencia SNAP-25 (que es el sustrato para la proteasa de cadena ligera BoNT/A). La excitación de la CFP da como resultado la emisión de fluorescencia mediada por FRET de YFP, que crea así una firma de fluorescencia espectral específica ilustrada esquemáticamente en B. Tras la incubación con BoNT/A, la secuencia SNAP-25 se hidroliza y se libera YFP de la molécula híbrida (cuyo resto está todavía unido a una membrana u otra fase sólida) como se describe en C. Alternativamente, o adicionalmente, la excitación y emisión pueden seguirse solamente mediante el uso de YFP, que cuando se separa de la proteína híbrida, finalmente se procesará en el proteosoma complejo. De manera similar, como se muestra en la Figura 1B de la técnica anterior, una proteína híbrida tiene una primera y una segunda proteínas de fluorescencia (CFP y YFP, respectivamente) que se acoplan covalentemente a los extremos respectivos de una secuencia peptídica intermedia que incluye, además, una secuencia SNAP-25. La proteína híbrida se asocia al exterior de la vesícula a través del dominio rico en cisteína de la secuencia SNAP-25. Una vez más, tras la escisión del enlazador SNAP-25 entre la CFP y la YFP, FRET ya no está disponible y la fluorescencia puede medirse tanto como pérdida en FRET o, en última instancia, como pérdida de la YFP como se describió anteriormente.

Si bien tales sistemas proporcionan varias ventajas, debería ser fácilmente evidente que cuando la secuencia SNAP-25 se reemplaza por una sinaptobrevina (VAMP), la presencia del subdominio transmembrana en la sinaptobrevina conducirá a la separación física de la CFP y la YFP mediante la vesícula (u otra) membrana, lo que abole así cualquier FRET entre la CFP y la YFP como se muestra en la Figura 9B de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2006/0134722.

Para superar estas dificultades, los inventores ahora prepararon moléculas híbridas adecuadas para la FRET intramolecular en las que una proteína fluorescente (u otro reportero) se coloca entre el subdominio transmembrana y la secuencia de escisión y reconocimiento de la proteasa BoNT, y en donde otra proteína fluorescente (u otro reportero) se coloca después de la secuencia de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT. Además, los inventores prepararon también pares de moléculas híbridas adecuadas para la FRET intermolecular en las que ambas moléculas híbridas tienen una proteína fluorescente respectiva acoplada a las secuencias respectivas que incluyen un dominio transmembrana y una secuencia de reconocimiento y escisión de proteasa BoNT.

Como se usa en la presente descripción, el término "dominio transmembrana" se refiere a cualquier resto molecular que es capaz de insertarse en una membrana plasmática de manera que al menos una porción del resto se extiende dentro de (y más típicamente a través de) la bicapa lipídica. Así, un resto que sólo contacta externamente (por ejemplo, mediante interacción iónica o electrostática) con la superficie de la membrana plasmática no se considera un dominio transmembrana de acuerdo con la definición proporcionada en la presente descripción. Así, los dominios transmembrana especialmente preferidos incluyen dominios polipeptídicos hidrófobos que se extienden dentro de (y más típicamente a través de) la membrana plasmática. Más típicamente, los dominios transmembrana preferidos comprenden un polipéptido (típicamente recombinante). Sin embargo, debe reconocerse que diversos elementos alternativos (por ejemplo, palmitoilación N-terminal) también caerán dentro del alcance de la definición proporcionada en la presente descripción.

Como también se usa en la presente descripción, la expresión "secuencia de reconocimiento y escisión de BoNT" se refiere a cualquier resto molecular que puede unirse y escindirse mediante una proteasa BoNT. Generalmente se prefiere que la secuencia de reconocimiento y escisión de BoNT comprenda un polipéptido de sinaptobrevina o una porción de este, que típicamente es un polipéptido recombinante.

De acuerdo con un primer aspecto de la materia objeto de la invención, los ácidos nucleicos recombinantes contemplados incluyen una secuencia que codifica (I) una proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D. De acuerdo con un segundo aspecto de la materia de la invención (II) al menos una de las dos proteínas híbridas que tienen una estructura de A-C-B y que tienen una estructura de A-C-D, respectivamente, donde A es un dominio transmembrana, B es una primera proteína fluorescente, C es una secuencia de reconocimiento y escisión de BoNT, y D es una segunda proteína fluorescente. Con la máxima preferencia, cuando la secuencia codifica dos proteínas híbridas, la expresión de las dos proteínas híbridas está bajo el control de los promotores respectivos (típicamente, pero no necesariamente, que tienen la misma fuerza y el mismo mecanismo de control regulador).

Más típicamente, el dominio transmembrana se selecciona para permitir la inserción de la(s) proteína(s) recombinante(s) en la membrana de las vesículas sinápticas. Por lo tanto, generalmente se prefiere que el dominio transmembrana sea el dominio transmembrana de la sinaptobrevina, sinaptofisina, sinapsina I, sinapsina II y/o sinapsina III, o cualquier porción de esta que aún confiera el anclaje de la proteína recombinante a la membrana. Sin embargo, en aspectos alternativos de la materia objeto de la invención, se contempla que otros dominios transmembrana también se consideran adecuados siempre que dichos dominios anclen la proteína recombinante a una o más membranas intracelulares. Existen numerosos dominios transmembrana conocidos en la técnica, y todos ellos se consideran adecuados para su uso en la presente invención. El experto habitual en la técnica podrá identificar fácilmente un dominio como un dominio transmembrana (por ejemplo, a través de la publicación y descripción del dominio, o mediante análisis computacional del dominio). Por supuesto, los dominios adecuados que se producen en la naturaleza así como las formas mutadas de estos (por ejemplo, se forman con una o más transiciones, transversiones, inserciones, eliminaciones, inversiones, etc.). Más aún, el dominio transmembrana contemplado adicionalmente también puede ser completamente sintético y basado en el análisis computacional.

Similarmente, debe apreciarse que el dominio transmembrana puede reemplazarse, además, por otro resto polipeptídico que permita al menos un anclaje temporal de la proteína híbrida a una membrana de manera que el resto de la proteína híbrida se exponga al citosol. El anclaje puede mediarse por varias interacciones (típicamente no covalentes), que incluyen interacciones iónicas, hidrofóbicas y/o electrostáticas. Aún más los dominios transmembrana contemplados incluyen, además, dominios transmembrana no proteicos. Por ejemplo, los dominios transmembrana alternativos especialmente preferidos incluirán aquellos en los que un grupo hidrófobo (por ejemplo, esteroles, hidrocarburos, etc.) se une a la proteína, y particularmente un grupo palmitoilo. Tales grupos pueden adicionarse intracelularmente (por ejemplo, a través de la señal de palmitoilación) o in vitro mediante el uso de varios esquemas sintéticos.

Se debe apreciar, además, que los dominios transmembrana adecuados, preferentemente, no incluirán un sitio de escisión de proteasas BoNT y/o un sitio de reconocimiento de proteasas BoNT y por lo tanto actuarán solamente como un anclaje de transmembrana para la proteína recombinante. Por lo tanto, los dominios transmembrana adecuados pueden incluir la sinaptobrevina de longitud completa (o de longitud sustancialmente completa) que se mutó suficientemente para eliminar el sitio de escisión y/o el sitio de reconocimiento. Alternativamente, la sinaptobrevina (u otro dominio transmembrana) puede truncarse de manera que al menos se elimina el sitio de escisión y/o el sitio de reconocimiento. Por otra parte, aunque lo anterior se refiere a dominios transmembrana únicos, debe apreciarse que también se consideran apropiados más de un dominio transmembrana (que, preferentemente, se acoplan entre sí mediante un espaciador).

Con respecto a la primera y segunda proteínas fluorescentes generalmente se contempla que todas las proteínas fluorescentes conocidas son adecuadas para su uso en la presente descripción siempre que tales proteínas puedan usarse como restos de generación de señal específicos y distintos. Sin embargo, se prefiere particularmente que los restos de generación de señal sean proteínas fluorescentes que sean adecuadas para FRET. Por ejemplo, la primera y la segunda proteínas fluorescentes pueden ser proteína fluorescente cian (CFP) y proteína fluorescente amarilla (YFP) y sus respectivas modificaciones, respectivamente. Por supuesto, y como ya se indicó anteriormente, las proteínas fluorescentes pueden modificarse para incluir una o más características específicas (por ejemplo, espectrales) o truncarse a un tamaño específico. Entre otras opciones, las proteínas fluorescentes contempladas incluyen diversas proteínas fluorescentes azules (por ejemplo, EBFP, EBFP2, Azurita, mKalama1), diversas proteínas fluorescentes cian (por ejemplo, ECFP, Cerulean, CyPet), varias proteínas fluorescentes verdes (por ejemplo, AcGFP1, ZsGreen1), y diversos derivados de proteínas fluorescentes amarillas (por ejemplo, YFP, Citrina, Venus, YPet).

De manera similar, debe apreciarse que la secuencia de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT puede variar considerablemente, siempre que tal secuencia todavía se reconozca e hidrolice mediante una cadena ligera de BoNT. Por ejemplo, la secuencia de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT puede ser de origen humano, de rata o murino, puede estar presente en forma oligo-multimérica, y puede modificarse específicamente, además, para facilitar o al menos parcialmente inhibir la escisión. Alternativamente, la secuencia de escisión y reconocimiento de la proteasa BoNT puede modificarse, además, para permitir la identificación de uno o más subtipos de BoNT específicos (por ejemplo, BoNT/B, D, F y/o G, así como la toxina tetánica) por escisión preferencial o exclusiva. Por supuesto, debe reconocerse que todas las isoformas y mutantes de las secuencias de escisión y reconocimiento de la proteasa BoNT también se consideran adecuadas para su uso junto con las enseñanzas presentadas en la presente descripción siempre que tales formas y mutantes también puedan escindirse por una o más proteasas BoNT. Por ejemplo, las secuencias de escisión y reconocimiento de proteasas adecuadas incluyen las de VAMP (Sinaptobrevina) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, y las secuencias ilustrativas se enumeran a continuación donde el dominio de reconocimiento y escisión es de tipo regular, el dominio transmembrana está en tipo de letra cursiva, y donde las posiciones de escisión reales para las proteasas BoNT respectivas se subrayan (QK: BoNT/F; KL: BoNT/D; QF: BoNT/B y TeTN; AA: BoNT/G):

Secuencia de proteína Vamp2 de rata (sec. con núm. de ident.:7):

MSATAATVPPAAPAGEGGPPAPPPNLTSNRRLQQTQAQVDEVVDIMRVNVD
 KVLERDQKLSELDDRADALQAGASQFETSAAKLKRKY *WWKNLKMMLGVICAIHLIII*
 VYFST SEQ ID NO:7

Secuencia de proteína Vamp2 de ratón (sec. con núm. de ident.:8):

MSATAATVPPAAPAGEGGPPAPPPNLTSNRRLQQTQAQVDEVVDIMRVNVD
 KVLERDQKLSELDDRADALQAGASQFETSAAKLKRKY *WWKNLKMMLGVICAIHLIII*
 VYFST (SEQ ID NO:8)

Secuencia de proteína Vamp2 humana (sec. con núm. de ident.:9):

MSATAATAPPAAPAGEGGPPAPPPNLTSNRRLQQTQAQVDEVVDIMRVNVD
 5 KVLERDQKLSELDDRADALQAGASQFETSAAKLRKYWKNLKMMILGVICAILLIII
 VYFST (SEQ ID NO:9)

10 Por supuesto, debe observarse que las secuencias anteriores simplemente sirven como ejemplos para las secuencias a partir de las cuales puede obtenerse el dominio transmembrana y las secuencias de escisión y reconocimiento de la proteasa BoNT. Por lo tanto, se observa también que numerosas secuencias alternativas diferentes a la de la de la sinaptobrevina se contemplan además particularmente si pueden escindirse mediante una BoNT de origen natural o sintética o de diseño, incluyendo SNAP-25 y formas mutantes de estas.

15 Además, se debe apreciar que uno o más del dominio transmembrana, la primera y segunda proteínas fluorescentes, y el dominio de escisión y reconocimiento de la proteasa BoNT pueden truncarse mientras se conserva la función respectiva (es decir, anclaje de transmembrana, fluorescencia, reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT). Además, debe apreciarse que uno o más aminoácidos en los elementos anteriores pueden eliminarse o reemplazarse por uno o más aminoácidos diferentes, típicamente de una manera conservada.

20 Además, se contempla especialmente que los aminoácidos adicionales pueden adicionarse como espaciadores entre uno o más del dominio transmembrana, la primera y la segunda proteínas fluorescentes, y el dominio de escisión y reconocimiento de la proteasa BoNT. Tales espaciadores pueden incluirse para proporcionar mayor flexibilidad estérica, aumentar la distancia entre los elementos, etc. Típicamente, los espaciadores adecuados tendrán una longitud de entre 1-100 aminoácidos, más típicamente entre 2-50 aminoácidos, y lo más típicamente
 25 entre 3-12 aminoácidos. Cuando la proteína recombinante se usa para ensayos FRET, generalmente se prefieren espaciadores más cortos. Además, se observa que pueden proporcionarse dominios adicionales para impartir otras funciones deseadas. Por ejemplo, los dominios adicionales adecuados incluirán marcadores de afinidad para facilitar el aislamiento o marcaje basado en anticuerpos, tráfico de células para dirigir la proteína recombinante a un compartimiento deseado, etc.

30 Con respecto a las células transfectadas que expresan la proteína híbrida generalmente se prefiere que la célula se transfecte establemente. Sin embargo, se contempla también la transfección transitoria. Existen numerosas estructuras promotoras conocidas en la técnica, y todas se consideran generalmente adecuadas para su uso en la presente descripción. Sin embargo, se prefiere especialmente que la expresión sea inducible por el promotor. En
 35 otros aspectos contemplados, la expresión puede ser, además, constitutiva. La Figura 3A representa un mapa de un vector ilustrativo para una construcción de expresión de una proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D, y la Figura 3B representa un mapa de un vector ilustrativo para la expresión de dos proteínas híbridas que tienen una estructura de A-C-B y A-C-D, respectivamente.

40 Las células particularmente preferidas para la transfección incluyen células neuronales (por ejemplo, astrocitos, dendrocitos, células gliales, etc.) y células madre (por ejemplo, pluripotentes adultas, o capa de línea germinal adulta, o progenitor adulto). Sin embargo, numerosas otras células no neuronales, que incluyen células humanas, de roedores, de insectos, e incluso levaduras y células bacterianas también se contemplan en la presente descripción.

45 Consecuentemente, los inventores contemplan células genéticamente modificadas para un método basado en células para medir la actividad proteasa de una proteasa BoNT en el cual en una etapa se proporciona una célula transfectada que produce (I) una proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D o (II) dos proteínas híbridas que tienen una estructura de A-C-B y A-C-D, respectivamente, en donde A es un dominio transmembrana, B es una
 50 primera proteína fluorescente, C es una secuencia de escisión y reconocimiento de BoNT, y D es una segunda proteína fluorescente. En aspectos ilustrativos del objeto de la invención, la proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 2, que se codifica preferentemente por un ácido nucleico que tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1. Cuando las proteínas híbridas tienen una estructura de A-C-B y A-C-D, las secuencias de proteína serán preferentemente como se muestra en la sec. con núm. de ident.: 4 y la sec. con núm. de ident.: 6, que son codificadas preferentemente por un
 55 ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 3 y la sec. con núm. de ident.: 5, respectivamente. Por supuesto, y como ya se indicó anteriormente, todas las formas mutantes de las secuencias anteriores se contemplan también expresamente en la presente descripción, siempre que tales formas mutantes retengan las funciones respectivas como se indicó anteriormente. En otra etapa, la célula transfectada se pone en contacto con una proteasa BoNT en condiciones que permitan que la célula tome la proteasa BoNT, y en otra etapa
 60 más, se mide la fluorescencia de al menos una de la primera y segunda proteínas fluorescentes en la célula transfectada.

65 En dependencia de los requisitos y condiciones particulares, los ensayos basados en células que usan las células genéticamente modificadas de la presente invención pueden realizarse como se representa en la Figura 2A en la que la proteína híbrida es una sola cadena polipeptídica que tiene un dominio transmembrana N-terminal, seguido de una CFP, que a su vez es seguido por una secuencia de reconocimiento y escisión de proteasa BoNT, que a su

vez es seguido por una YFP (preferentemente, terminal). La expresión de la proteína híbrida y la translocación posterior de la proteína híbrida a la membrana de una vesícula intracelular dará como resultado la presentación de la proteína híbrida en el exterior de la vesícula. La actividad proteasa BoNT/B escindirán entonces intracelularmente la secuencia de escisión, lo que libera así la YFP de la proteína híbrida. Consecuentemente, se reduce el enfriamiento rápido y la fluorescencia de la YFP es detectable en forma difusa desde la célula.

Alternativamente, como se muestra en la Figura 2B, se forman dos proteínas híbridas separadas en la célula, cada una con un dominio transmembrana N-terminal, seguido de una secuencia de reconocimiento y escisión de proteasa BoNT, que a su vez es seguido por una (preferentemente, terminal) YFP y CFP, respectivamente. La expresión de las proteínas híbridas y la translocación posterior de las proteínas híbridas a la membrana de una vesícula intracelular dará como resultado la presentación de las proteínas híbridas en el exterior de la vesícula. La actividad de la proteasa BoNT/B escindirán entonces intracelularmente las secuencias de escisión, lo que libera así la YFP y CFP de la proteína híbrida. Consecuentemente, se reduce el enfriamiento rápido y la fluorescencia de la YFP y CFP es detectable en forma difusa desde la célula. Notablemente, las proteínas híbridas respectivas se localizan conjuntamente en la membrana vesicular de tal manera que permiten la FRET. Los resultados ilustrativos para tales ensayos se representan en las microfotografías de fluorescencia calculadas de la Figura 4A y las representaciones de gráfico de barras correspondientes de la Figura 4B. Como puede deducirse fácilmente de estas figuras, el ensayo de FRET tuvo un buen rendimiento en el ensayo de FRET intermolecular y menos satisfactoriamente en el ensayo de FRET intramolecular. Sin embargo, se espera que la experimentación de rutina proporcione, además, resultados satisfactorios del ensayo de FRET intramolecular.

Ejemplos

Clonaje de la construcción intramolecular

La construcción para la FRET intramolecular, pMD0031 (Figura 3A), se construyó en pEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA). Tres fragmentos de ADN- un fragmento N-terminal de Vamp2 de rata desde el inicio hasta el aminoácido 92, una YFP de longitud completa sin un codón de terminación y un fragmento C-terminal de Vamp2 de rata desde el aminoácido 93 hasta el codón de parada- se amplificaron por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se diseñó un sitio de restricción EcoRI en el extremo 5' del fragmento Vamp2 N-terminal y un enlazador SerGlyGly (TCGGGAGGC) y se diseñaron los primeros 12 nucleótidos de la YFP en el extremo 3'. El fragmento YFP tenía los últimos 13 nucleótidos del fragmento de Vamp2 N-terminal y el mismo enlazador SerGlyGly que el fragmento de Vamp2 N-terminal diseñado en el extremo 5' y un segundo enlazador SerGlyGly (AGCGGCGGT) y los primeros 9 nucleótidos del fragmento de Vamp2 C-terminal diseñado en el extremo 3'. El fragmento de Vamp2 C-terminal tenía los últimos 12 nucleótidos de YFP sin un codón de parada y el mismo enlazador SerGlyGly que el fragmento YFP diseñado en el extremo 5' y un sitio de restricción BamHI diseñado en el extremo 3'.

Estos tres fragmentos se combinaron después mediante el uso de PCR de extensión de solapamiento por empalme (SOE) para crear un único fragmento que consiste en un sitio de restricción EcoRI, el fragmento N-terminal de Vamp2 de rata (aminoácidos 1-92), un enlazador SerGlyGly, YFP sin un codón de parada, un segundo enlazador SerGlyGly, el fragmento C-terminal de Vamp2 de rata (aminoácidos 93-codón de parada) y un sitio de restricción BamHI. Este fragmento y pEGFP-C1 se hidrolizaron después con EcoRI y BamHI, se ligaron juntos y se transformaron en *E. coli* DH5 α . El inserto de la construcción final se secuenció después completamente.

Clonaje de la construcción intermolecular

La construcción para la FRET intermolecular, pMD0034 (Figura 3B), se construyó en pBudCE4.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La fusión de Vamp2 de rata de YFP se generó mediante la amplificación de dos fragmentos por PCR. El primer fragmento fue YFP sin un codón de parada con un sitio de restricción HindIII diseñado en el extremo 5' y un enlazador SerGlyGly (AGTGGAGGC) y los primeros 9 nucleótidos de Vamp2 de rata modificados en el extremo 3'. El segundo fragmento fue una Vamp2 de rata de longitud completa con los últimos 9 nucleótidos de la YFP y el mismo enlazador SerGlyGly diseñado en el extremo 5' y un sitio de restricción XbaI diseñado en el extremo 3'. Estos dos fragmentos se combinaron después mediante el uso de SOE PCR para crear una YFP, enlazador SerGlyGly, fragmento de Vamp2 de longitud completa. El fragmento y pBudCE4.1 se hidrolizaron después con HindIII y XbaI, se ligaron juntos, y se transformaron en *E. coli* DH5 α . La fusión de Vamp2 de rata de CFP se creó de manera similar pero contenía una CFP sin codón de parada, un sitio de restricción NotI en el extremo 5' y un sitio KpnI en el extremo 3'. La construcción final se secuenció después completamente.

Cultivo celular y ensayo FRET

El análisis de la eficiencia de FRET, las relaciones de fluorescencia YFP/CFP y las sensibilidades a BoNT/B de los reporteros BoNT/B se realizó en células *in vitro*. Más específicamente, se cultivaron células Neuro2A en una placa de 96 pocillos con una confluencia del 70 % (~2000 células/pocillo) y se transfectaron transitoriamente mediante el uso de Lipofectamina 2000 (Invitrogen), con los reporteros BoNT/B intramoleculares o intermoleculares. Después de 24 h, las células se incubaron en presencia o en ausencia de BoNT/B 25 nM a 37 °C durante 72 h en 100 μ l de medio MEM libre de rojo de fenol.

Se realizaron mediciones de fluorescencia semiautomáticas de FRET o YFP total y CFP mediante el uso de un microscopio de fluorescencia Nikon TE2000-U con aumento de 200x y software Nikon NIS Elements 3.4. Para las mediciones de FRET, los coeficientes -A y -B (aceptor y donante) se calcularon a 0.03 y 0.73 respectivamente, mediante el uso de un método de purga específica. La Figura 4A representa los campos seleccionados al azar pseudocoloreados para determinar la eficiencia de FRET o la relación de fluorescencia YFP/CFP. Las relaciones YFP/CFP se calcularon a partir de las emisiones recogidas tras la excitación directa de cada fluoróforo. Como puede observarse a partir de la representación gráfica en la Figura 4B, el enfoque del reportero BoNT/B intermolecular fue significativamente más sensible para la detección de BoNT/B en células vivas. Se analizaron 30 células seleccionadas aleatoriamente por condición para determinar la eficiencia de FRET (Figura 4A, paneles izquierdos) o las relaciones de fluorescencia YFP/CFP (Figura 4A, paneles derechos) en presencia o ausencia de BoNT/B 25 nM. De hecho, tales resultados fueron completamente inesperados ya que la FRET intermolecular eficaz no solamente requería una expresión equilibrada de las dos proteínas fluorescentes, sino, además, de la ubicación conjunta de las proteínas recombinantes en cantidades correspondientes. Se muestra la señal promedio de las 30 células de 5 campos microscópicos en 3 pocillos diferentes. Se excluyeron las células que exhibían fluorescencia sobresaturada.

Listado de secuencias

<110> BioMadison, Inc.

<120> Ensayo de transferencia de energía por resonancia con un resto de sustrato de Sinaptobrevina.

<130> 102320.0006EP2

<150> US 61/252315

<151> 2009-10-16

<160> 9

<170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 1839

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia codificante recombinante para pMD0031

<220>

<221> características_misc

<222> (1)..(717)

<223> Proteína fluorescente cian mejorada

<220>

<221> características_misc

<222> (718)..(753)

<223> Enlazador

<220>

<221> características_misc

<222> (754)..(1017)

<223> Porción N-terminal de VAMP2 que incluye todos los sitios de escisión y ningún dominio transmembrana

<220>

<221> características_misc

<222> (1018)..(1026)

<223> SGG Enlazador

<220>

<221> características_misc

<222> (1027)..(1743)

<223> Proteína fluorescente amarilla

<220>

<221> características_misc

<222> (1744)..(1752)

ES 2 676 277 T3

<223> SGG Enlazador

<220>

<221> características_misc

5 <222> (1753)..(1839

<223> Porción C-terminal de VAMP2 que incluye el dominio transmembrana y ningún sitio de escisión

<400> 1

10 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 15 ctcgtgacca ccctgacctg gggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
 cagcaccgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggtacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 20 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactacat cagccacaac gtctatatca ccgccgacaa gcagaagaac 480
 ggcacatcaag ccaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 25 gaccactacc agcagaacac ccccatoggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca ccagtcctgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtcc 720
 30 ggactcagat ctcgagctca agcttcgaat tctatgtcgg ctaccgctgc caccgtcccg 780
 cctgccgccc cgcccgggca ggggtgcccc cctgcacctc ctocaaatct taccagtaac 840
 aggagactgc agcagaccca gggccaggtg gatgaggtgg tggacatcat gagggtgaat 900
 35 gtggacaagg tcctggagcg ggaccagaag ctatcggaac tggatgatcg cgcagatgcc 960
 ctccaggcag gggcctccca gtttgaaca agtgcagcca agctcaagcg caaatactcg 1020
 40 ggaggcatgg tgagcaaggc cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat cctggtcgag 1080
 ctggacgcgc acgtaaacg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc 1140
 acctacggca agctgacct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg 1200
 45 cccaccctcg tgaccacct cggctacggc ctgcagtgtc tcgcccgcta ccccgaccac 1260
 atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc 1320
 atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac 1380
 50 accctggtga accgcacgca gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg 1440
 gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag 1500
 aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag 1560
 55 ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct gctgcccgac 1620
 aaccactacc tgagctacca gtccgccctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcatcac 1680
 atggtcctgc tggagtctgt gaccgccgcc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac 1740
 60 aagagcggcg gttggtggaa aaacctcaag atgatgatca tcttgggagt gatttgccc 1800
 atcactcctca tcactcatcat cgtttacttc agcacttaa 1839

65 <210> 2

<211> 612

ES 2 676 277 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> Proteína recombinante codificada por pMD0031

<220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (1)..(239)
 10 <223> Proteína fluorescente cian mejorada
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (240)..(251)
 <223> Enlazador

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (252)..(339)
 20 <223> Porción N-terminal de VAMP2 que incluye todos los sitios de escisión y ningún dominio transmembrana

<220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (340)..(342)
 <223> SGG Enlazador

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (343)..(581)
 <223> Yellow Fluorescent Protein

30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (582)..(584)
 <223> SGG Enlazador

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (585)..(612)
 <223> Porción C-terminal de VAMP2 que incluye el dominio transmembrana y ningún sitio de escisión

40 <400> 2

45 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

50 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45

55 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

60 Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

65

ES 2 676 277 T3

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 5
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 10
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 15
 Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 20
 Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 25
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 30
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 35
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 40
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser
 225 230 235 240
 45
 Gly Leu Arg Ser Arg Ala Gln Ala Ser Asn Ser Met Ser Ala Thr Ala
 245 250 255
 50
 Ala Thr Val Pro Pro Ala Ala Pro Ala Gly Glu Gly Gly Pro Pro Ala
 260 265 270
 55
 Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu Gln Gln Thr Gln Ala
 275 280 285
 60
 Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val Asn Val Asp Lys Val
 290 295 300
 65
 Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp Asp Arg Ala Asp Ala
 305 310 315 320
 70
 Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser Ala Ala Lys Leu Lys
 325 330 335
 75
 Arg Lys Tyr Ser Gly Gly Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr
 340 345 350
 80
 Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His
 355 360 365

ES 2 676 277 T3

Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys
 370 375 380
 5 Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp
 385 390 395 400
 10 Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg
 405 410 415
 15 Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro
 420 425 430
 20 Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn
 435 440 445
 25 Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn
 450 455 460
 30 Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu
 465 470 475 480
 35 Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met
 485 490 495
 40 Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His
 500 505 510
 45 Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn
 515 520 525
 50 Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu
 530 535 540
 55 Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His
 545 550 555 560
 60 Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met
 565 570 575
 65 Asp Glu Leu Tyr Lys Ser Gly Gly Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met Met
 580 585 590
 Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val
 595 600 605
 60 Tyr Phe Ser Thr
 610
 60 <210> 3
 <211> 1077
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> Secuencia de codificación recombinante para la construcción intermolecular con YFP

ES 2 676 277 T3

<220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(717)
 <223> Proteína fluorescente amarilla
 5
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (718)..(726)
 <223> SGG Enlazador
 10
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (727)..(1077)
 <223> VAMP2 de longitud completa con dominio transmembrana y sitios de escisión
 15
 <400> 3

 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 20
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 ctcgtgacca ccttcggcta cggcctgcag tgettcgccc gctaccccga ccacatgaag 240
 25
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 30
 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 35
 gaccactacc agcagaacac ccccatcgcc gacggccccc tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgcgggatc actctcgga tggacgagct gtacaagagt 720
 40
 ggaggcatgt cggctaccgc tgccaccgtc ccgcctgccg ccccgcccg gcaggggtggc 780
 cccctgcac ctctccaaa tcttaccagt aacaggagac tgcagcagac ccaggcccag 840
 gtggatgagg tggatgacat catgagggtg aatgtggaca aggtcctgga gcgagaccag 900
 45
 aagctatcgg aactggatga tcgcgcagat gccctccagg caggggcctc ccagtttgaa 960
 acaagtgcag ccaagctcaa gcgcaaatc tggtggaaaa acctcaagat gatgatcatc 1020
 50
 ttgggagtga tttgcgccat catcctcatc atcatcatcg tttacttcag cacttaa 1077

 <210> 4
 <211> 358
 <212> PRT
 55
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Proteína recombinante codificada por pMD0034 YFP
 60
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (1)..(239)
 <223> Proteína fluorescente amarilla
 65
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC

ES 2 676 277 T3

<222> (240)..(242)
 <223> SGG Enlazador

<220>

5 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC

<222> (243)..(358)

<223> VAMP2 de longitud completa con dominio transmembrana y sitios de escisión

<400> 4

10

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15

15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

20

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45

25

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

30

Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110

35

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

40

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

45

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175

50

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

55

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220

60

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser
 225 230 235 240

65

Gly Gly Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Val Pro Pro Ala Ala Pro Ala
 245 250 255

ES 2 676 277 T3

Gly Glu Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg
 260 265 270
 5 Arg Leu Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met
 275 280 285
 10 Arg Val Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu
 290 295 300
 15 Leu Asp Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu
 305 310 315 320
 20 Thr Ser Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys
 325 330 335
 25 Met Met Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile
 340 345 350
 Ile Val Tyr Phe Ser Thr
 355
 30 <210> 5
 <211> 1077
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia de codificación recombinante para la construcción intermolecular con ECFP
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(717)
 <223> Proteína fluorescente cian mejorada
 40 <220>
 <221> características_misc
 <222> (718)..(726)
 <223> SGG Enlazador
 45 <220>
 <221> características_misc
 <222> (727)..(1077)
 <223> VAMP2 de longitud completa con dominio de transmembrana y sitios de escisión
 <400> 5
 50 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga cctgaagt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 55 ctogtgacca cctgacctg gggcgtgcag tgcttcagcc gctacccoga ccacatgaag 240
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 60 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactacat cagccacaac gtctatatca ccgccgacaa gcagaagaac 480
 65

ES 2 676 277 T3

5 ggcatcaagg ccaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca ccagtcgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcga tcatatggtc 660
 5 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagagt 720
 ggaggcatgt cggtaccgc tgccaccgtc ccgcctgccg ccccggccgg cgaggggtggc 780
 cccctgcac ctctccaaa tcttaccagt aacaggagac tgcagcagac ccaggcccag 840
 10 gtggatgagg tggggacat catgaggggtg aatgtggaca aggtcctgga gcgagaccag 900
 aagctatcgg aactggatga tcgcgcagat gccctccagg caggggcctc ccagtttgaa 960
 acaagtgcag ccaagctcaa gcgcaaatc tggtggaaaa acctcaagat gatgatcctc 1020
 15 ttgggagtga tttgcgcat catcctcctc atcatcctc tttacttcag cacttaa 1077

20 <210> 6
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Proteína recombinante codificada por pMD0034 ECFP
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (1)..(239)
 30 <223> Proteína fluorescente cian mejorada
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (140)..(242)
 35 <223> SGG Enlazador
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (243)..(358)
 40 <223> VAMP2 de longitud completa con dominio de membrana y sitios de escisión
 <400> 6

45 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 50 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 55 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 60 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

65

ES 2 676 277 T3

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 5 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 10 Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 15 Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 20 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 25 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 30 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser
 225 230 235 240
 35 Gly Gly Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Val Pro Pro Ala Ala Pro Ala
 245 250 255
 Gly Glu Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg
 260 265 270
 40 Arg Leu Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met
 275 280 285
 45 Arg Val Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu
 290 295 300
 50 Leu Asp Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu
 305 310 315 320
 Thr Ser Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys
 325 330 335
 55 Met Met Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile
 340 345 350
 60 Ile Val Tyr Phe Ser Thr
 355

<210> 7
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

ES 2 676 277 T3

<400> 7

5 Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Val Pro Pro Ala Ala Pro Ala Gly Glu
 1 5 10 15

10 Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu
 20 25 30

15 Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val
 35 40 45

20 Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp
 50 55 60

25 Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser
 65 70 75 80

30 Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met Met
 85 90 95

Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val
 100 105 110

Tyr Phe Ser Thr
 115

<210> 8

35 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8

40 Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Val Pro Pro Ala Ala Pro Ala Gly Glu
 1 5 10 15

45 Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu
 20 25 30

50 Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val
 35 40 45

55 Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp
 50 55 60

60 Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser
 65 70 75 80

60

65

ES 2 676 277 T3

Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met Met
85 90 95

5 Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val
100 105 110

Tyr Phe Ser Thr
115

10

<210> 9
<211> 116
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens
<400> 9

20 Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Ala Pro Pro Ala Ala Pro Ala Gly Glu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu
20 25 30

25 Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val
35 40 45

30 Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp
50 55 60

35 Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser
65 70 75 80

Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met Met
85 90 95

40 Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val
100 105 110

45 Tyr Phe Ser Thr
115

REIVINDICACIONES

1. Una célula genéticamente modificada, que comprende:
 - 5 un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína híbrida que tiene una estructura de A-B-C-D, en donde A comprende un dominio transmembrana que no es escindible por una proteasa BoNT, B comprende una primera proteína fluorescente, C comprende una secuencia de reconocimiento y escisión de proteasa BoNT, y D comprende una segunda proteína fluorescente; en donde el dominio transmembrana se inserta a través de una membrana lipídica de la célula de manera que B, C y D se ubican en el mismo lado de la membrana lipídica,
 - 10 y en donde el ácido nucleico comprende un elemento promotor adecuado para la expresión de la proteína híbrida en la célula genéticamente modificada.
- 15 2. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 1, en donde la célula se transfecta establemente con el ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos.
- 20 3. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 1, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula neuronal, una célula tumoral neuroendocrina, una célula híbrida y una célula madre.
- 25 4. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 1, en donde el dominio transmembrana se selecciona de uno o más del grupo que consiste en sinaptobrevina, sinaptofisina, sinapsina I, sinapsina II y sinapsina III.
- 30 5. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 1, en donde la secuencia de escisión y reconocimiento de la proteasa BoNT se selecciona de al menos una del grupo que consiste en una secuencia de escisión y reconocimiento de la proteasa BoNT/B, una secuencia de escisión y reconocimiento de la proteasa BoNT/G, una secuencia de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT/D, y una secuencia de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT/F.
- 35 6. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 1, en donde la primera proteína fluorescente se selecciona del grupo que consiste en proteína fluorescente azul, proteína fluorescente cian, proteína fluorescente verde y proteína fluorescente amarilla.
- 40 7. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 1, en donde la segunda proteína fluorescente se selecciona del grupo que consiste en proteína fluorescente azul, proteína fluorescente cian, proteína fluorescente verde y proteína fluorescente amarilla.
- 45 8. Una célula genéticamente modificada, que comprende:
 - 50 un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una primera proteína híbrida y una segunda proteína híbrida, en donde la primera proteína híbrida tiene una estructura de A-C-B y la segunda proteína híbrida tiene una estructura de A-C-D, donde A comprende un dominio transmembrana que no es escindible por la proteasa BoNT, B comprende una primera proteína fluorescente, C comprende una secuencia de reconocimiento y de escisión de la proteasa BoNT, y D comprende una segunda proteína fluorescente; en donde el dominio transmembrana se inserta a través de una membrana lipídica de la célula de manera que B, C y D se ubican en el mismo lado de la membrana lipídica,
 - 55 y en donde el ácido nucleico comprende un primer elemento promotor adecuado para la expresión de la primera proteína híbrida y un segundo elemento promotor adecuado para la expresión de la segunda proteína híbrida en la célula genéticamente modificada.
- 60 9. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 8, en donde la célula se transfecta establemente con el ácido nucleico.
- 65 10. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 8, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula neuronal, una célula tumoral neuroendocrina, una célula híbrida y una célula madre.
11. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 8, en donde el dominio transmembrana se selecciona de uno o más del grupo que consiste en sinaptobrevina, sinaptofisina, sinapsina I, sinapsina II y sinapsina III.
12. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 8, en donde la secuencia de escisión y reconocimiento de la proteasa BoNT se selecciona de al menos una del grupo que consiste en una secuencia de escisión y reconocimiento de la proteasa BoNT/B, una secuencia de escisión y reconocimiento de la

proteasa BoNT/G, una secuencia de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT/D, y una secuencia de reconocimiento y escisión de la proteasa BoNT/F.

- 5 13. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 8, en donde la primera proteína fluorescente se selecciona del grupo que consiste en proteína fluorescente azul, proteína fluorescente cian, proteína fluorescente verde y proteína fluorescente amarilla.
- 10 14. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 8, en donde la segunda proteína fluorescente se selecciona del grupo que consiste en proteína fluorescente azul, proteína fluorescente cian, proteína fluorescente verde y proteína fluorescente amarilla.
- 15 15. Un estuche para un ensayo basado en células para la caracterización de la toxina botulínica que comprende:
la célula genéticamente modificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 14; e instrucciones para el uso de la célula transfectada en un ensayo para una neurotoxina botulínica.

FIG. 1A
TÉCNICA ANTERIOR

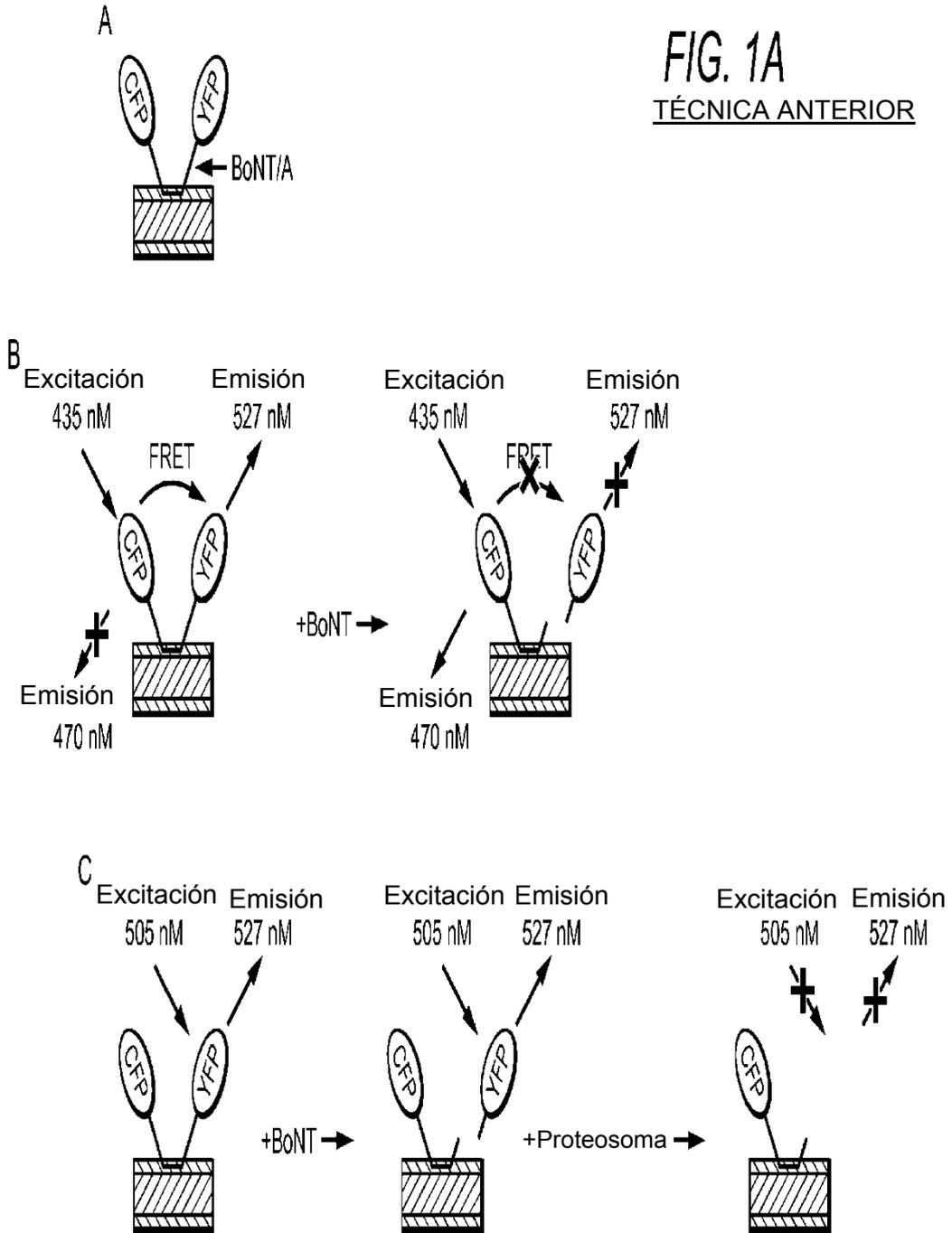


FIG. 1B
TÉCNICA ANTERIOR

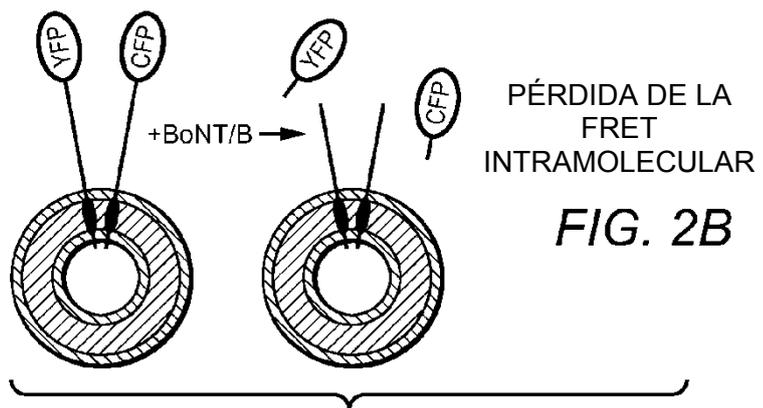
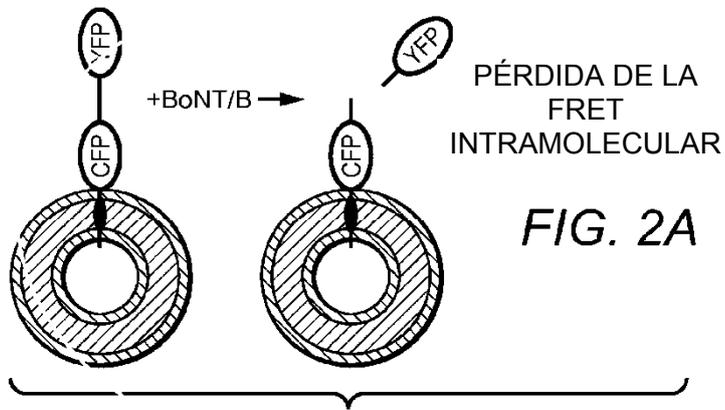
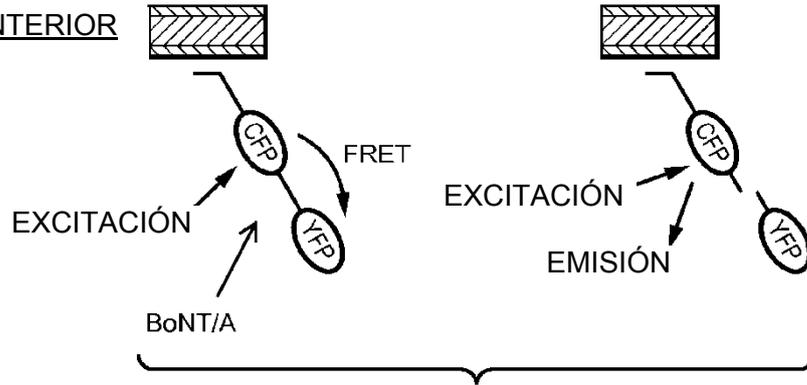


FIG. 3A

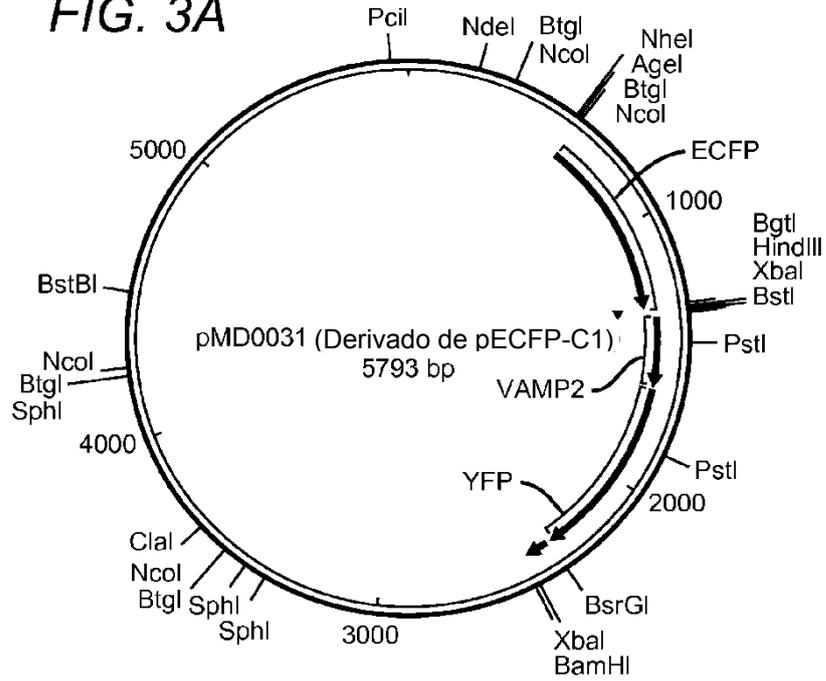


FIG. 3B

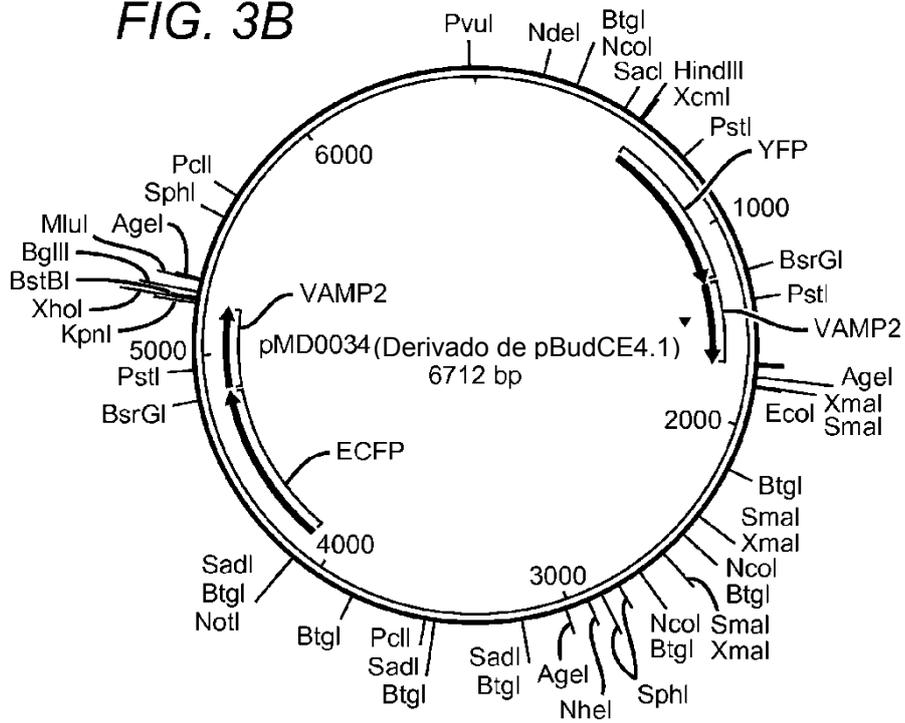


FIG. 4A

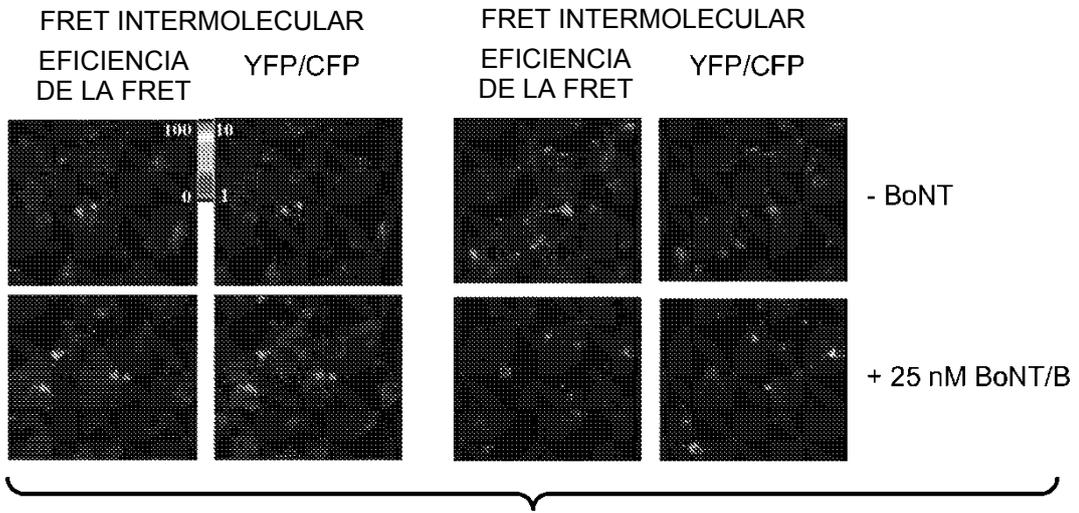


FIG. 4B

