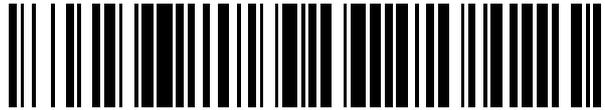


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 425**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48	(2006.01)
C12N 9/64	(2006.01)
C12N 9/52	(2006.01)
C12N 9/96	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2013 PCT/EP2013/070744**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053651**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2013 E 13771540 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2903635**

54 Título: **Uso de derivados de toxina de clostridium para el tratamiento del dolor**

30 Prioridad:

04.10.2012 EP 12187163
04.10.2012 US 201213644386

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.12.2018

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 2 694 425 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

Uso de derivados de toxina de clostridium para el tratamiento del dolor

- 5 La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones que implican derivados de neurotoxina clostridial que tienen una capacidad mejorada para interrumpir la exocitosis del dolor y / o mediadores inflamatorios de los nociceptores o inductores de la inflamación, previniendo así el dolor.

La capacidad de las toxinas clostridiales como, por ejemplo, las neurotoxinas botulínicas (BoNT) (incluidos los serotipos BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F y BoNT/G), para inhibir la transmisión neuronal está siendo explotada en una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas y cosméticas, véase, por ejemplo, Ward AB y Barnes MP, 2007, *Clinical Users of Botulinum Toxins* (Cambridge University Press, Cambridge). Como ejemplo, el agente derivado de BoNT/A BOTOX® está aprobado actualmente en uno o más países para las siguientes indicaciones: acalasia, espasticidad en adultos, fisura anal, dolor de espalda, blefarospasmo, bruxismo, distonía cervical, temblor esencial, líneas glabellares o líneas faciales hiperkinéticas, cefalea, espasmo hemifacial, hiperactividad de la vejiga, hiperhidrosis, parálisis cerebral juvenil, esclerosis múltiple, trastornos mioclónicos, líneas labiales nasales, disfonía espasmódica, estrabismo y trastorno nervioso VII.

Existen toxinas clostridiales distintas de las toxinas derivadas de *C. botulinum* y *C. tetanus*; estas incluyen, entre otras, 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 clostridiales" o una referencia similar, se refiere a las neurotoxinas de los subtipos *C. botulinum* y los subtipos *C. tetani*, a menos que se indique lo contrario de forma específica o contextual.

Además, las terapias de toxina clostridial se utilizan o se proponen para tratar:

a) trastornos neuromusculares, véase, por ejemplo, Kei Roger Aoki y col., *Method for Treating Neuromuscular Disorders and Conditions with Botulinum Toxin Types A and B*, patente de Estados Unidos N.º 6.872.397 (29 de marzo, 2005); Rhett M. Schiffman, *Methods for Treating Uterine Disorders*, publicación de patente de Estados Unidos N.º 2004/0175399 (9 de septiembre, 2004); Richard L. Barron, *Methods for Treating Ulcers and Gastroesophageal Reflux Disease*, publicación de patente de Estados Unidos N.º 2004/0086531 (7 de mayo, 2004); y Kei Roger Aoki, y col., *Method for Treating Dystonia with Botulinum Toxin C to G*, patente de Estados Unidos N.º 6.319.505 (20 de noviembre, 2001);

b) trastornos oculares, véase, por ejemplo, Eric R. First, *Methods and Compositions for Treating Eye Disorders*, publicación de patente de Estados Unidos N.º 2004/0234532 (25 de noviembre, 2004); Kei Roger Aoki y col., *Botulinum Toxin Treatment for Blepharospasm*, publicación de patente de Estados Unidos N.º 2004/0151740 (5 de agosto, 2004); y Kei Roger Aoki y col., *Botulinum Toxin Treatment for Strabismus*, publicación de patente de Estados Unidos N.º 2004/0126396 (1 de julio, 2004);

c) dolor, véase, por ejemplo, Kei Roger Aoki y col., *Pain Treatment by Peripheral Administration of a Neurotoxin*, patente de Estados Unidos N.º 6.869.610 (22 de marzo, 2005); Stephen Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods to Treat Pain*, patente de Estados Unidos N.º 6.641.820 (4 de noviembre, 2003); Kei Roger Aoki, y col., *Method for Treating Pain by Peripheral Administration of a Neurotoxin*, patente de Estados Unidos N.º 6.464.986 (15 de octubre, 2002); Kei Roger Aoki y Minglei Cui, *Methods for Treating Pain*, patente de Estados Unidos N.º 6.113.915 (5 de septiembre, 2000); Martin A. Voet, *Methods for Treating Fibromyalgia*, patente de Estados Unidos 6.623.742 (23 de septiembre, 2003); Martin A. Voet, *Botulinum Toxin Therapy for Fibromyalgia*, publicación de patente de Estados Unidos N.º 2004/0062776 (1 de abril, 2004); y Kei Roger Aoki y col., *Botulinum Toxin Therapy for Lower Back Pain*, publicación de patente de Estados Unidos N.º 2004/0037852 (26 de febrero, 2004);

d) lesiones musculares, véase, por ejemplo, Gregory F. Brooks, *Methods for Treating Muscle Injuries*, patente de Estados Unidos N.º 6.423.319 (23 de julio, 2002);

e) cefalea, véase, por ejemplo, Martin Voet, *Methods for Treating Sinus Headache*, patente de Estados Unidos N.º 6.838.434 (4 de enero, 2005); Kei Roger Aoki y col., *Methods for Treating Tension Headache*, patente de Estados Unidos N.º 6.776.992 (17 de agosto, 2004); y Kei Roger Aoki y col., *Method for Treating Headache*, patente de Estados Unidos N.º 6.458.365 (1 de octubre, 2002); William J. Binder, *Method for Reduction of Migraine Headache Pain*, patente de Estados Unidos 5.714.469 (3 de febrero, 1998);

f) enfermedades cardiovasculares, véase, por ejemplo, Gregory F. Brooks y Stephen Donovan, *Methods for*

Treating Cardiovascular Diseases with Botulinum Toxin, patente de Estados Unidos N.º 6.767.544 (27 de julio, 2004);

e) trastornos neurológicos, véase, por ejemplo, Stephen Donovan, *Parkinson's Disease Treatment*, patente de Estados Unidos N.º 6.620.415 (16 de septiembre, 2003); y Stephen Donovan, *Method for Treating Parkinson's Disease with a Botulinum Toxin*, patente de Estados Unidos N.º 6.306.403 (23 de octubre, 2001);

g) trastornos neuropsiquiátricos, véase, por ejemplo, Stephen Donovan, *Botulinum Toxin Therapy for Neuropsychiatric Disorders*, publicación de patente de Estados Unidos N.º 2004/0180061 (16 de septiembre, 2004); y Steven Donovan, *Therapeutic Treatments for Neuropsychiatric Disorders*, publicación de patente de Estados Unidos N.º 2003/0211121 (13 de noviembre, 2003);

f) trastornos endocrinos, véase, por ejemplo, Stephen Donovan, *Method for Treating Endocrine Disorders*, patente de Estados Unidos N.º 6.827.931 (7 de diciembre, 2004); Stephen Donovan, *Method for Treating Thyroid Disorders with a Botulinum Toxin*, patente de Estados Unidos N.º 6740321 (25 de mayo, 2004); Kei Roger Aoki y col., *Method for Treating a Cholinergic Influenced Sweat Gland*, patente de Estados Unidos N.º 6.683.049 (27 de enero, 2004); Stephen Donovan, *Neurotoxin Therapy for Diabetes*, patente de Estados Unidos N.º 6.416.765 (9 de julio, 2002); Stephen Donovan, *Methods for Treating Diabetes*, patente de Estados Unidos N.º 6.337.075 (8 de enero, 2002); Stephen Donovan, *Method for Treating a Pancreatic Disorder with a Neurotoxin*, patente de Estados Unidos N.º 6.261.572 (17 de julio, 2001); Stephen Donovan, *Methods for Treating Pancreatic Disorders*, patente de Estados Unidos N.º 6.143.306 (7 de noviembre, 2000);

g) cánceres, véase, por ejemplo, Stephen Donovan, *Methods for Treating Bone Tumors*, patente de Estados Unidos N.º 6.565.870 (20 de mayo, 2003); Stephen Donovan, *Method for Treating Cancer with a Neurotoxin to Improve Patient Function*, patente de Estados Unidos N.º 6.368.605 (9 de abril, 2002); Stephen Donovan, *Method for Treating Cancer with a Neurotoxin*, patente de Estados Unidos N.º 6.139.845 (31 de octubre, 2000); y Mitchell F. Brin and Stephen Donovan, *Methods for Treating Diverse Cancers*, publicación de patente de Estados Unidos N.º 2005/0031648 (10 de febrero, 2005);

h) trastornos óticos, véase, por ejemplo, Stephen Donovan, *Neurotoxin Therapy for Inner Ear Disorders*, patente de Estados Unidos N.º 6358926 (19 de marzo, 2002); y Stephen Donovan, *Method for Treating Otic Disorders*, patente de Estados Unidos N.º 6265379 (24 de julio, 2001);

i) trastornos autónomos, véase, por ejemplo, Pankaj J. Pasricha y Anthony N. Kalloo, *Method for Treating Gastrointestinal Muscle Disorders and Other Smooth Muscle Dysfunction*, patente de Estados Unidos N.º 5.437.291 (1 de agosto, 1995);

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

La Tabla 2, a continuación, proporciona las secuencias de aminoácidos de los isotipos de varias toxinas clostridiales relacionadas con la toxina botulínica (BoNT y TeTX) conocidas actualmente. Estas toxinas poseen un mínimo de aproximadamente el 35 % de identidad de aminoácidos entre sí y comparten la misma organización del dominio funcional general y la arquitectura estructural general. Estas toxinas clostridiales se traducen cada una de forma natural como un polipéptido monocatenario de aproximadamente 150 kDa que posteriormente se escinde por escisión proteolítica dentro de un bucle de disulfuro mediante una proteasa de origen natural, tal como, por ejemplo, una proteasa endógena de toxina clostridial o una proteasa natural producida en el medio ambiente. Este procesamiento postraduccional produce una molécula di-catenaria 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 intercatenario e interacciones no covalentes.

- Cada molécula de toxina clostridial di-catenaria madura comprende tres dominios funcionalmente distintos: 1) un dominio enzimático ubicado en la LC que incluye una región de metaloproteasa que contiene una actividad endopeptidasa dependiente de zinc que se dirige específicamente a los componentes centrales del aparato de liberación de neurotransmisores (las llamadas proteínas SNARE ("receptores de proteínas de fijación soluble de NSF") que median 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 (denominada "H_N") que facilita la liberación de al menos la cadena LC de la toxina desde un endosoma al citoplasma de la célula diana; y 3) un dominio de unión encontrado dentro de la mitad carboxilo terminal de la cadena H (H_C) que determina la actividad de unión y la especificidad de unión de la toxina. H_C comprende subdominios H_{CN} y H_{CC} (las porciones terminales N y C de H_C, respectivamente). Ahora hay pruebas sustanciales de que la mayoría o todas las toxinas BoNT/X se unen a una célula diana mediante un "receptor dual", donde la porción H_C de la toxina que comprende ambos subdominios H_{CN} y H_{CC} se une a ciertos gangliósidos de la superficie celular y un receptor de proteínas (quizás glicosilado); la unión del receptor de proteínas facilita la internalización de la proteína dentro de la célula. Por "X" se entiende cualquier serotipo de toxina botulínica. Aunque el término "BoNT/X" se utiliza generalmente para indicar subtipos de toxina botulínica, el término también puede incluir las regiones TeTX de la misma. H_{CC} vincula el complejo receptor ubicado en la superficie de la célula diana.
- 20 Se entenderá que existen cepas de cada una de estas toxinas que pueden variar algo en sus secuencias de aminoácidos en regiones no críticas (denominadas variables) sin un cambio sustancial en la identidad o actividad característica de la toxina o dominio de toxina indicados.

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

25

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 clostridiales (identificadas desde la dirección amino a carboxi; número de aminoácidos a número de aminoácidos)				
Toxina	SEQ ID NO:	LC	H _N	H _C
BoNT/A	1	M1-K448	A449-K871	N872-L1296
BoNT/B	2	M1-K441	A442-S858	E859-E1291
BoNT/C1	3	M1-K449	T450-N866	N867-E1291
BoNT/D	4	M1-R445	D446-N862	S863-E1276

BoNT/E	5	M1-R422	K423-K845	R846-K1252
BoNT/F	6	M1-K439	A440-K864	K865-E1274
BoNT/G	7	M1-K446	S447-S863	N864-E1297
TeNT	8	M1-A457	S458-V879	I880-D1315

Los expertos en la materia reconocen que pueden producirse en la naturaleza variantes del dominio clostridial que tienen variaciones naturales en el aminoácido mostrado anteriormente (o en las secuencias de nucleótidos que codifican estas secuencias de aminoácidos). Como se emplea en el presente documento, el término “variante del dominio clostridial” se refiere a cualquier dominio clostridial (endopeptidasa, translocación y / o dominios de unión) producido por un proceso de origen natural, que incluye, entre otros, las isoformas del dominio clostridial producidas a partir de transcripciones empalmadas alternativamente, isoformas de dominio clostridial producidas por mutaciones espontáneas y subtipos de dominio clostridial. Como se emplea en el presente documento, una variante del dominio clostridial de origen natural funciona sustancialmente de la misma manera que el dominio clostridial de referencia en el que se basa la variante del dominio clostridial de origen natural y puede ser sustituida por el dominio clostridial de referencia en cualquier aspecto de la presente invención. Una variante del dominio clostridial de origen 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 clostridial de referencia en el que se basa la variante del dominio clostridial de origen natural. Una variante del dominio clostridial de origen 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 clostridial de referencia en el cual se basa la variante del dominio clostridial de origen natural que posee al menos un 50 % de identidad de aminoácidos, un 65 % de identidad de aminoácidos, un 75 % de identidad de aminoácidos, un 85 % de identidad de aminoácidos o un 95 % de identidad de aminoácidos con el dominio clostridial de referencia en el que se basa la variante del dominio clostridial de origen natural. También se entenderá que las inserciones y supresiones moderadas de aminoácidos también pueden realizarse siempre que la función característica y la identidad del dominio no se alteren sustancialmente.

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 secuencias de nucleótidos diferentes, pero definidas. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos degeneradas que codifican un péptido o proteína determinados pueden tener diferentes codones adaptados o seleccionados para favorecer la expresión en una célula huésped particular. Mediante 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 el dominio de los aminoácidos, ya sea solo o con secuencias de ácido nucleico adicionales, insertadas en un vector de expresión y expresión subsiguiente adecuados dentro de una célula huésped elegida. Por ejemplo, la publicación de patente internacional WO01/14570 describe procedimientos para fabricar derivados de neurotoxinas clostridiales recombinantes modificables o no modificables escindibles monocatenarios y formas quiméricas e híbridas de los mismos mediante dichos procedimientos. Las publicaciones adicionales que describen procedimientos para fabricar neurotoxinas recombinantes expresables y derivados de las mismas incluyen las patentes de Estados Unidos 5.989.545; 6.203.794; 6.395.513; la publicación de Estados Unidos N.º 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.

El uso de técnicas de ADN recombinante permite la construcción de neurotoxinas clostridiales modificadas que tienen propiedades funcionales diferentes o modificadas de los subtipos de toxinas naturales y las cepas de las mismas. Por ejemplo, la alteración de la secuencia de aminoácidos de origen natural de la cadena ligera de neurotoxina nativa y / o la adición de una fracción terapéutica 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. La alteración del dominio selectivo (unión celular) permite que la toxina sea transportada dentro de las células pancreáticas, como las células acinares, evitando así la secreción de enzimas digestivas activadas por dichas células, véase la patente de Estados Unidos N.º 6.843.998 o neuronas aferentes sensoriales, evitando así la liberación del neurotransmisor y por lo tanto, aliviando el dolor; véase la patente de Estados Unidos N.º 6.395.513.

Además, la patente de Estados Unidos N.º 7.422.877 describe la creación de derivados de neurotoxinas quiméricas 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 básicos de neurotoxinas clostridiales puede realizarse en una sola cadena de aminoácidos (o en moléculas dicatenarias 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

5 combinarse además de forma independiente con un dominio de endopeptidasa de cualquiera de los subtipos de neurotoxina A, B, C1, D, E, F, G o TeTX. Esto se puede hacer, por ejemplo, mediante la construcción recombinante de una cadena quimérica simple que posteriormente se escinde para producir la toxina dicatenaria o mediante la expresión separada de las cadenas simples H y L, que luego se combinan mediante, por ejemplo, la creación de un enlace disulfuro intercatenario y posteriormente se purifican. Además, al utilizar dichas técnicas, la actividad de

10 varios dominios puede alterarse (por ejemplo, pueden introducirse mutaciones en un dominio de LC para destruir la actividad de proteasa de la LC) o los dominios de origen natural pueden reemplazarse por otras fracciones, como se describe en otra parte del presente documento, donde, por ejemplo, el dominio HC de BoNT/A (o una porción del mismo) se muta o se elimina y se vincula a un ligando selectivo (TL).

15 Con la descripción de los tres dominios de neurotoxinas generales de cada subtipo de neurotoxina clostridial (unión, translocación y endopeptidasa), se entenderá que la investigación de las neurotoxinas clostridiales es un campo avanzado y la correlación de las secuencias de aminoácidos que comprenden cada uno de estos dominios con sus funciones es muy conocida. Además, también se conoce la subdivisión de estos dominios generales en subdominios. Por ejemplo, es también muy conocida la subdivisión del dominio de unión H_C en subdominios H_{CN} (la

20 porción amino-terminal del dominio que corresponde aproximadamente a los aminoácidos 871-1091 de BoNT/A) y H_{CC} (la porción carboxi-terminal del dominio H_C que corresponde aproximadamente a los aminoácidos 1092-1296 de BoNT/A). Véase, por ejemplo, Lacy DB y Stevens RC, Sequence Homology and Structural Analysis of the Clostridial Neurotoxins, 1999, J. Mol. Biol. 291:1091-1104. El subdominio H_{CN} está altamente conservado entre los subtipos de toxina botulínica, sin embargo, se sabe poco sobre su función. El subdominio H_{CC} está menos conservado.

25 Además, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de cada uno de estos dominios y subdominios son conocidas y se han descrito en la presente memoria descriptiva y, por lo tanto, mediante esta descripción en combinación con el conocimiento del código genético, se pueden hacer secuencias de nucleótidos que codifican una proteína que debe expresarse. Por supuesto, sería una cuestión de rutina para una persona experta en la técnica imaginar

30 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 se pueden sintetizar ácidos nucleicos que comprenden variantes moderadamente modificadas de estas secuencias de nucleótidos (o porciones únicas de las mismas) en la región de homología que contiene no más del 10 %, 8 % o 5 % de diferencias de pares de bases de una secuencia de referencia.

35 Además, se entenderá que las secuencias de aminoácidos explicadas en la Tabla 2 y en otras partes de la presente memoria descriptiva (SEQ ID NO: 1-8, 10, 12, 14, 16 y 18) proporcionan una descripción completa de cualquiera y todas las secuencias de nucleótidos que codifican estas secuencias de aminoácidos y las regiones indicadas de las mismas. Una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de endopeptidasa, dominio de translocación o

40 dominio de unión (incluido 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 o 80 % o más o 85 % o más o 90 % o más o 95 % o más o 100 % de identidad con cualquiera de las regiones de secuencia de aminoácidos de referencia enumeradas en la Tabla 2 y / o SEQ ID NO: 1-8, 10, 12, 14, 16 y 18.

45 **ESTADOS DE LA INVENCION**

De acuerdo con un aspecto general de la invención, se proporciona una composición que comprende un derivado de neurotoxina clostridial, comprendiendo dicha composición:

- 50 a) un primer dominio activo de endopeptidasa derivado de toxina clostridial eficaz para escindir una proteína SNARE en condiciones fisiológicas;
- b) un dominio de translocación derivado de la toxina clostridial eficaz para facilitar el movimiento de dicho primer, y opcionalmente, un segundo dominio de endopeptidasa a través de una membrana celular en el citosol en condiciones fisiológicas; y
- 55 c) un dominio de unión derivado de toxina no clostridial que comprende un primer ligando selectivo (TL) que se une selectivamente, en condiciones fisiológicas, a un primer receptor de superficie celular indicado por una célula diana seleccionada del grupo que consiste en una neurona sensorial y una célula que secreta al menos una citoquina inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en un macrófago, un sinoviocito y un mastocito, y sustancialmente no indicado por una neurona motora o autónoma;
- 60 d) un dominio H_{CN} funcional derivado de toxina clostridial; y

donde al menos una proteasa de cadena ligera de dicho derivado de neurotoxina clostridial es asimilada por dicha célula diana tras la unión de dicho TL a la célula diana, y donde el derivado de neurotoxina posee un dominio H_{CN} derivado de neurotoxina clostridial funcional y carece de una actividad del dominio selectivo H_{CC} derivado de neurotoxina clostridial funcional.

5

De acuerdo con otro aspecto general de la invención, se proporciona un derivado de neurotoxina clostridial analgésico que comprende:

- a) un primer dominio activo de endopeptidasa derivado de toxina clostridial eficaz para escindir una proteína SNARE en condiciones fisiológicas y que tiene una vida media enzimática de 10 días o más cuando se inyecta en un músculo gastrocnemio de ratón en condiciones sustancialmente fisiológicas;
- 10 b) un dominio de translocación derivado de toxina clostridial eficaz para facilitar el movimiento de dicho primer dominio de endopeptidasa a través de una membrana celular en el citosol en condiciones fisiológicas;
- c) un dominio H_{CN} funcional derivado de toxina clostridial; y
- 15 d) un dominio de unión que comprende un primer ligando selectivo (TL) que se une selectivamente, en condiciones fisiológicas, a un primer receptor de superficie celular indicado por un tipo de célula diana seleccionada del grupo que consiste en neuronas sensoriales y células secretoras de citoquina seleccionadas del grupo que consiste en un macrófago, un sinoviocito y un mastocito, con preferencia por un tipo de célula no diana seleccionada del grupo que consiste en neuronas motoras y neuronas autónomas; donde dicho derivado de neurotoxina carece de un dominio
- 20 H_{CC} de toxina clostridial funcional y donde una célula diana asimila al menos el dominio de endopeptidasa de dicho derivado de neurotoxina clostridial tras la unión de dicho TL a la célula diana.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención como se define en la reivindicación 1, se proporciona una composición que comprende un derivado de neurotoxina clostridial, comprendiendo dicha composición:

25

- a) un primer dominio activo de endopeptidasa derivado de toxina clostridial que escinde una proteína SNARE en condiciones fisiológicas;
- b) un dominio de translocación derivado de toxina clostridial que facilita el movimiento de dicho primer dominio de endopeptidasa a través de una membrana celular en el citosol en condiciones fisiológicas;
- 30 c) un dominio H_{CN} funcional derivado de toxina clostridial; y
- d) un dominio de unión derivado de toxina no clostridial que comprende un primer ligando selectivo (TL) que se une selectivamente, en condiciones fisiológicas, a un primer receptor de superficie celular indicado por una célula diana, siendo seleccionada dicha célula diana del grupo que consiste en
- 35 i) una neurona sensorial, y
- ii) una célula que secreta al menos una citoquina inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en un macrófago, un sinoviocito y un mastocito;

estando dicho receptor de superficie celular sustancialmente ausente de las neuronas motoras o autónomas;

- 40 donde dicha proteasa de cadena ligera de dicho derivado de neurotoxina clostridial es asimilada por dicha célula diana tras la unión de dicho TL a la célula diana, y donde un dominio selectivo H_{CC} está ausente o está mutado para impedir la unión del dominio H_{CC} a su receptor de proteína natural.

Opcionalmente, el derivado de neurotoxina carece de un dominio selectivo H_{CC} derivado de neurotoxina clostridial.

- 45 Alternativamente, el derivado de neurotoxina contiene un dominio H_{CC} derivado de neurotoxina clostridial mutado para impedir la unión del dominio H_{CC} a su receptor de proteína natural.

De acuerdo con una realización, el dominio H_{CC} mutado comprende un residuo de ácido glutámico en una posición correspondiente al aminoácido 1192 de BoNT/B. De acuerdo con otra realización, el dominio H_{CC} mutado

50 comprende un residuo de lisina en una posición correspondiente al aminoácido 1196 de BoNT/B. De acuerdo con otra realización, el dominio H_{CC} mutado comprende también un residuo de ácido glutámico en una posición correspondiente al aminoácido 1192 de BoNT/B.

- De acuerdo con una realización, el dominio H_{CC} mutado se deriva de BoNT/B De acuerdo con otra realización, el
- 55 dominio H_{CC} mutado se deriva de BoNT/B De acuerdo con otra realización, el dominio H_{CC} mutado se deriva de BoNT/B De acuerdo con otra realización, el dominio H_{CC} mutado se deriva de BoNT/B

- De acuerdo con otra realización, el derivado de neurotoxina comprende un segundo dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial diferente. De acuerdo con una realización, el derivado de neurotoxina comprende un
- 60 segundo dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial activo. De acuerdo con una realización, el derivado

- de neurotoxina comprende un segundo dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial que contiene una mutación que lo hace sustancialmente proteolíticamente inactivo. De acuerdo con otra realización, el derivado de neurotoxina comprende un segundo dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial derivado de BoNT/A. De acuerdo con otra realización, el primer dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial comprende una
- 5 endopeptidasa derivada de BoNT/E. De acuerdo con otra realización, el dominio de translocación derivado de toxina clostridial se deriva de un subtipo BoNT/X seleccionado del grupo que consiste en BoNT/A, BoNT/C1, BoNT/D y BoNT/E. De acuerdo con otra realización, el dominio de translocación derivado de toxina clostridial se deriva de un subtipo BoNT/X seleccionado del grupo que consiste en BoNT/A, BoNT/C1, BoNT/D y BoNT/E.
- 10 De acuerdo con otra realización, el TL comprende un componente selectivo seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de CGRP, un anticuerpo selectivo de CGRP o específico de CGRP o un fragmento selectivo del mismo o un agonista de interleuquina 1 o un antagonista de receptor de interleuquina 1, un anticuerpo selectivo de receptor IL-1 o específico de receptor IL-1 o un fragmento del mismo.
- 15 De acuerdo con otra realización, la composición de la invención comprende un polipéptido que comprende un dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial activo que comprende una endopeptidasa derivada de BoNT/E, un dominio de translocación derivado de toxina clostridial que se deriva de BoNT/A y un dominio de TL.
- De acuerdo con otra realización, el TL comprende un componente selectivo que comprende un antagonista de
- 20 CGRP.
- De acuerdo con otra realización, dicho dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial comprende una endopeptidasa que tiene una vida media enzimática de 10 días o más cuando se inyecta en el músculo gastrocnemio de ratón en condiciones sustancialmente fisiológicas.
- 25 De acuerdo con otra realización, el primer y segundo dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial comprende una endopeptidasa que tiene una vida media enzimática de 10 días o más cuando se inyecta en el músculo gastrocnemio de ratón en condiciones sustancialmente fisiológicas.
- 30 De acuerdo con otra realización, el derivado de neurotoxina de la invención comprende una cadena ligera de BoNT/D, un dominio de translocación de BoNT/D y un ligando selectivo que comprende CGRP₈₋₃₇ y que carece de un dominio H_{CC} funcional.
- De acuerdo con otra realización, el derivado de neurotoxina de la invención contiene un dominio H_{CC} derivado de
- 35 neurotoxina clostridial mutado para impedir la unión del dominio H_{CC} a su receptor de proteína natural.
- De acuerdo con otra realización, el derivado de neurotoxina de la invención comprende BoNT/D(-H_{CC})-CGRP₈₋₃₇.
- De acuerdo con otra realización, el derivado de neurotoxina de la invención comprende una cadena ligera de
- 40 BoNT/D, un dominio de translocación de BoNT/D y un ligando selectivo que comprende IL-1RA humano y que carece de un dominio H_{CC} funcional.
- De acuerdo con otra realización, el derivado de neurotoxina de la invención contiene un dominio H_{CC} derivado de neurotoxina clostridial mutado para impedir la unión del dominio H_{CC} a su receptor de proteína natural.
- 45 De acuerdo con otra realización, el derivado de neurotoxina de la invención comprende BoNT/D(-H_{CC})- IL-1RA humano.
- De acuerdo con otra realización, el derivado de neurotoxina de la invención comprende una cadena ligera de
- 50 BoNT/A, un dominio de translocación de BoNT/A y un ligando selectivo que comprende un ligando de receptor purinérgico y que carece de un dominio H_{CC} funcional.
- De acuerdo con otra realización, el derivado de neurotoxina de la invención comprende LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1.
- 55 De acuerdo con otra realización, el TL se une específicamente, en condiciones fisiológicas, a un primer receptor de superficie celular indicado por una neurona sensorial, con preferencia por las neuronas motoras o autónomas.
- De acuerdo con otra realización, el derivado de neurotoxina de la invención comprende al menos dos dominios de
- 60 TL.

De acuerdo con otra realización, el derivado de neurotoxina de la invención comprende un dominio de translocación de neurotoxina clostridial que se selecciona del grupo que consiste en

- a) un dominio de translocación BoNT-A;
- 5 b) un dominio de translocación BoNT-B;
- c) un dominio de translocación BoNT-C1;
- d) un dominio de translocación BoNT-D;
- e) un dominio de translocación BoNT-E;
- f) un dominio de translocación BoNT-F;
- 10 g) un dominio de translocación BoNT-G, y
- h) variantes moderadamente modificadas e isoformas de cualquiera de los anteriores.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un derivado de neurotoxina clostridial analgésico que comprende:

- 15 a) un primer dominio activo de endopeptidasa derivado de toxina clostridial que escinde una proteína SNARE en condiciones fisiológicas y que tiene una vida media enzimática de 10 días o más cuando se inyecta en un músculo gastrocnemio de ratón en condiciones sustancialmente fisiológicas;
- b) un dominio de translocación derivado de toxina clostridial que facilita el movimiento de dicho primer dominio de
- 20 endopeptidasa a través de una membrana celular en el citosol en condiciones fisiológicas;
- c) un dominio H_{CN} funcional derivado de toxina clostridial; y
- d) un dominio de unión que comprende un primer ligando selectivo (TL) que se une selectivamente, en condiciones fisiológicas, a un primer receptor de superficie celular indicado por un tipo de célula diana seleccionada del grupo que consiste en:
- 25 i) neuronas sensoriales, y
- ii) células secretoras de citoquinas

con preferencia por un tipo de célula no diana seleccionada del grupo que consiste en neuronas motoras y neuronas

30 autónomas;

donde dicho derivado de neurotoxina carece de un dominio H_{CC} funcional de toxina clostridial y

donde una célula diana asimila dicho primer dominio de endopeptidasa de dicho derivado de neurotoxina clostridial tras la unión de dicho TL a la célula diana.

35 Opcionalmente, el derivado de neurotoxina contiene un dominio H_{CC} derivado de neurotoxina clostridial mutado para impedir la unión del dominio H_{CC} a su receptor de proteína natural. De acuerdo con una realización, el derivado de neurotoxina de la invención comprende un dominio H_{CN} activo.

40 Opcionalmente, dicho primer dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial activo se deriva de un serotipo de toxina seleccionado del grupo que consiste en BoNT/A, BoNT/E, BoNT/C1 y BoNT/D.

De acuerdo con otra realización de la invención, el dominio de translocación de neurotoxina clostridial se selecciona del grupo que consiste en

- 45 a) un dominio de translocación BoNT-A;
- b) un dominio de translocación BoNT-B;
- c) un dominio de translocación BoNT-C1;
- d) un dominio de translocación BoNT-D;
- 50 e) un dominio de translocación BoNT-E;
- f) un dominio de translocación BoNT-F;
- g) un dominio de translocación BoNT-G, y
- h) variantes moderadamente modificadas e isoformas de cualquiera de los anteriores.

55 De acuerdo con una realización, el dominio de endopeptidasa y el primer dominio de endopeptidasa activo se derivan del mismo serotipo BoNT.

De acuerdo con una realización, el derivado de neurotoxina de la invención comprende un segundo dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial. Opcionalmente, el segundo dominio de endopeptidasa derivado de

60 toxina clostridial retiene la actividad de la proteasa endopeptidasa activa. Opcionalmente, el segundo dominio de

endopeptidasa derivado de toxina clostridial carece de actividad de proteasa endopeptidasa eficaz para escindir sustancialmente una población de proteínas SNARE en condiciones fisiológicas.

De acuerdo con otra realización, el TL comprende un componente selectivo seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de CGRP, un anticuerpo selectivo de CGRP o específico de CGRP o un fragmento selectivo del mismo o un agonista de interleuquina 1 o un antagonista de receptor de interleuquina 1, un anticuerpo selectivo de receptor IL-1 o específico de receptor IL-1 o un fragmento del mismo y variantes e isoformas moderadamente modificadas de los anteriores.

10 Opcionalmente, el derivado de neurotoxina comprende al menos dos dominios de TL.

De acuerdo con una realización, dicho primer dominio de endopeptidasa y dicho dominio de translocación se derivan ambos de BoNT/D. De acuerdo con otra realización, el derivado de neurotoxina de la invención, dicho primer dominio de endopeptidasa y dicho dominio de translocación se derivan ambos de BoNT/A. De acuerdo con una realización, dicho primer dominio de endopeptidasa y dicho dominio de translocación se derivan ambos de BoNT/C1. Opcionalmente, el TL comprende un componente selectivo seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de CGRP, un anticuerpo selectivo de CGRP o específico de CGRP o un fragmento selectivo del mismo o un agonista de interleuquina 1 o un antagonista de receptor de interleuquina 1, un anticuerpo selectivo de receptor IL-1 o específico de receptor IL-1 o un fragmento del mismo y variantes e isoformas moderadamente modificadas de cualquiera de los anteriores.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende el derivado de neurotoxina clostridial de la invención.

25 De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una célula huésped seleccionada del grupo que consiste en una célula huésped bacteriana, levadura, una célula de mamífero y una célula de insecto, donde la célula huésped contiene un vector de ácido nucleico que comprende el ácido nucleico de la invención.

De acuerdo con todos los aspectos de la invención, idealmente la célula diana es una célula que secreta al menos una citoquina inflamatoria, donde dicha célula se selecciona del grupo que consiste en un macrófago, un sinoviocito y un mastocito.

De acuerdo con todos los aspectos de la invención, idealmente el TL comprende un componente selectivo seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de CGRP, un anticuerpo selectivo de receptor de CGRP o específico de receptor de CGRP o un fragmento selectivo del mismo o un agonista de interleuquina 1 o un antagonista de receptor de interleuquina 1, un anticuerpo selectivo de receptor IL-1 o específico de receptor IL-1 o un fragmento del mismo y variantes e isoformas moderadamente modificadas de cualquiera de los anteriores.

De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona un lisado celular despejado que comprende el derivado de neurotoxina clostridial de la invención.

De acuerdo con un sexto aspecto de la invención, se proporciona un compuesto que comprende el derivado de neurotoxina clostridial de la invención para su uso en el tratamiento del dolor crónico.

45 De acuerdo con un séptimo aspecto de la invención, se proporciona un derivado de neurotoxina clostridial que comprende: a) un primer dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial activo que escinde una proteína SNARE en condiciones fisiológicas y tiene una vida media enzimática de 10 días o más cuando se inyecta en el músculo gastrocnemio de ratón en condiciones sustancialmente fisiológicas; b) un segundo dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial activo o inactivo; c) un dominio de translocación derivado de toxina clostridial que facilita el movimiento de dicho primer dominio de endopeptidasa a través de una membrana celular en el citosol en condiciones fisiológicas; y d) un dominio H_{CN} funcional derivado de toxina clostridial.

Breve descripción de los dibujos

55 La Fig. 1 es un diagrama que muestra varias realizaciones generales de la presente invención, comenzando por una toxina dicatenaria BoNT/X (que se puede crear por escisión proteolítica de una toxina monocatenaria (SC) recombinante), y que muestra las vías A o B, respectivamente. Estas implican la escisión de BoNT/X del subdominio H_{CC} (vía A) o la mutación del subdominio H_{CC} (vía B) y la adición de un ligando selectivo (TL) dirigido para unirse a las neuronas sensoriales y / o a las células no neuronales para bloquear la liberación de afectores en el dolor crónico y / o vías inflamatorias para formar nuevos géneros de agentes biológicos terapéuticos BoNT/X(H_{CC})-TL y

BoNT/X(PrR)-TL. Un miembro de cualquiera de los dos géneros puede modificarse aún más como se muestra en la vía C mediante la adición de un dominio de proteasa de cadena ligera de tipo E activo (LC/E) para extender el periodo de tiempo de la proteólisis de la proteína SNARE; véase LC/E-BoNT/X(⁻H_{CC})-TL y LC/E-BoNT/X(PrR)-TL. Por ejemplo, en la primera instancia, los residuos clave (Lys¹¹⁹² y / o Ala¹¹⁹⁶ en H_{CC} de BoNT/B) identificados como
 5 esenciales para la unión de su receptor de proteína (sinaptotagmina) podrían mutarse a Glu¹¹⁹² y Lys¹¹⁹⁶ para interrumpir su interacción, aunque hay datos que han demostrado una caída superior a 300 veces su actividad parálitica neuromuscular tras la mutación de cualquiera de los residuos clave (Rummel y col., Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos, 2007, 104:359-364 y Jin y col., Nature, 2006, 444:1092-1095). Los expertos en la técnica sabrán que puede utilizarse de manera alternativa una segunda proteasa de cadena ligera activa opcional derivada de
 10 serotipos clostridiales distintos del tipo E.

La Fig. 2A muestra estructuras esquemáticas representativas de BoNT/A (rA) recombinante y una variante (rA(H_{CN})) que carece del subdominio H_{CN}. Ambas estructuras ilustran un tag de histidina de 6 residuos de C-terminal (H₆) (SEQ ID NO: 19), anexado durante la construcción del ácido nucleico recombinante para ayudar en la purificación de
 15 la proteína mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), así como dos sitios de escisión de trombina, también insertados durante la construcción del ácido nucleico recombinante. El primer sitio de escisión de trombina (más a la izquierda) permite la conversión proteolítica posterior a la expresión de una forma monocatenaria a la dicatenaria activa; el segundo sitio de trombina permite la eliminación del "tag" H₆ (SEQ ID NO: 19) después de la purificación del polipéptido.
 20

La Fig. 2B muestra la purificación de un lisado celular de rA(H_{CN}) por IMAC en un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie.

La Fig. 2C muestra un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de proteínas SC y DC purificadas por IMAC
 25 en condiciones reductoras y no reductoras.

La Fig. 3A muestra hibridaciones Western de geles de SDS-PAGE. Los carriles de las dos hibridaciones a la derecha son muestras de eluatos en ensayos de unión entre un fragmento inmovilizado expresado de forma recombinante del receptor de proteína BoNT/A (SV2C) y proteínas recombinantes BoNT/A (rA), rA(H_{CN}), y rE (recombinante
 30 BoNT/E). Las dos hibridaciones a la izquierda son muestras de rA, rA(H_{CN}) y rE (40 ng / carril) para confirmar la especificidad de los anticuerpos utilizados. Las hibridaciones se desarrollaron mediante anticuerpos contra la cadena ligera de BoNT/A (anti-LC/A) o BoNT/E (anti-LC/E).

La Fig. 3B muestra hibridaciones Western de geles de SDS-PAGE en los que se trataron previamente neuronas de gránulos cerebelosos de rata (CGN) con concentraciones variables (expresadas en la leyenda del eje superior en
 35 unidades de picomolaridad (pM)) del derivado de toxina rA o rA(H_{CN}). Los geles muestran bandas de proteínas que comprenden las proteínas SNARE syntaxina 1, SNAP-25 o SNAP-25_A (un producto de escisión de la digestión con BoNT/A). Los resultados muestran que, como se esperaba, la syntaxina 1 SNARE no diana no es escindida por ninguna proteína de toxina; SNAP-25 solo es digerida por rA (y no por rA(H_{CN}), excepto en concentraciones muy altas (1 nM) de la toxina). Los resultados sugieren la incapacidad de rA(H_{CN}) para asimilarse efectivamente en las
 40 células CGN.

La Fig. 3C es una tabla que muestra la toxicidad de rA y rA(H_{CN}) tras la inyección intraperitoneal de cada toxina en ratones, expresada como mL_{D50}, la dosis más baja de toxina suficiente para matar al 50 % de los ratones
 45 inyectados en 4 días. La tabla indica que rA tiene un mL_{D50} 6,7 x 10⁴ veces mayor que rA(H_{CN}) en este experimento.

La Fig. 4 muestra una vista esquemática de varios ligandos selectivos ejemplares (TL) que pueden combinarse con miembros individuales de los géneros terapéuticos derivados de toxinas mostrados en la Fig. 1 para hacer
 realizaciones terapéuticas de la invención dirigidas a los nervios sensibles al dolor o células no neuronales que secretan mediadores inflamatorios y contribuyen al dolor.
 50

La Fig. 5A muestra estructuras esquemáticas representativas de proteínas recombinantes LC.H_N/A-PT-1 y LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1; ambas proteínas contienen una porción C-terminal que comprende un tag His₆ (SEQ ID NO: 19) para su uso en la purificación por afinidad y un fragmento de purtoxina-1 (PT-1) para su uso como ligando selectivo (TL) de la toxina al receptor P2X purinoceptor 3 de las neuronas purinérgicas. La proteína LC.H_N/A-PT-1
 55 comprende BoNT/A recombinante que carece de la totalidad de la región H_C; la proteína LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1 comprende la LC.H_N/A-PT-1 más la región BoNT/A H_{CN} (pero no la región H_{CC}) enlazada al C terminal de la misma y por ende, a la porción TL-His₆ ("His₆" descrita como SEQ ID NO: 19). Un solo sitio de escisión de la trombina separa la LC/A del resto de la cadena, aunque permanece unida por el enlace disulfuro.

60 La Fig. 5B muestra los geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie reductores y no reductores de lisado (1),

circulación (2), lavado (3) y las fracciones de eluato (4-8) de cromatografía IMAC de células de *E. coli*. que expresan LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1.

La Fig. 5C muestra los geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie reductores y no reductores de lisado (1), 5 circulación (2), lavado (3) y las fracciones de eluatos (4-7) de células de *E. coli*. que expresan LC.H_N/A-PT-1.

La Fig. 6A muestra los resultados de un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (izquierda) de LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1 purificada en condiciones reductoras y no reductoras e hibridaciones Western de la misma muestra en condiciones reductoras y no reductoras desarrolladas mediante el anticuerpo anti-His₆ (medio) ("His₆" descrito como SEQ ID NO: 19) o anticuerpo anti-LC/A (derecha). Los geles muestran que, en condiciones no reductoras, la proteína existe como una dicatenaria unida por disulfuro; cuando se reduce, la LC/A disociada se puede visualizar con el anticuerpo anti-LC/A y el resto de la toxina recombinante se puede ver con el anticuerpo anti-His₆ ("His₆" descrito como SEQ ID NO: 19).

15 La Fig. 6B muestra los resultados de un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (izquierda) de LC.H_N/A-PT-1 purificada en condiciones reductoras y no reductoras e hibridaciones Western de la misma muestra desarrolladas mediante el anticuerpo anti-His₆ (medio) ("His₆" descrito como SEQ ID NO: 19) o anticuerpo anti-LC/A (derecha). Los geles muestran que, en condiciones no reductoras, la proteína existe como una dicatenaria unida por disulfuro; cuando se reduce, la LC/A disociada se puede visualizar con el anticuerpo anti-LC/A y el resto de la toxina recombinante se puede ver con el anticuerpo anti-His₆ ("His₆" descrito como SEQ ID NO: 19).

La Fig. 6C muestra hibridaciones Western de geles de SDS-PAGE en las cuales las neuronas ganglionares del trigémino de rata (TGN) se trataron previamente con 1,6 nM de cualquiera de los derivados de toxina LC.H_N/A-PT-1 (izquierda) o LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1, luego fueron lisadas y sometidas a electroforesis. Los geles muestran bandas de proteínas que comprenden las proteínas SNARE SNAP-25 (banda superior) o el producto de escisión LC/A SNAP-25_A (banda inferior en la hibridación Western adecuada). Los resultados muestran que SNAP-25 solo se digiere por LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1, (y no por LC.H_N/A-PT-1). Los resultados son consistentes con la capacidad de LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1 para unirse efectivamente a las células TGN.

30 La Fig. 6D es un gráfico que muestra los resultados del ensayo que se muestran gráficamente en la Fig. 6C. El porcentaje de SNAP-25 escindido por 1,6 nM de LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1 es de aproximadamente el 25 % y el porcentaje de SNAP-25 escindido por LC.H_N/A-PT-1 es de aproximadamente el 0 %.

La **Fig. 7** muestra hibridaciones Western de geles de SDS-PAGE a partir de lisados de: línea celular sinovial humana (hSC) (que contiene SNAP-23, VAMP3, sintaxina 2, 3 y 4 como se observa en la línea de células macrofásicas de ratón RAW264.9 (mMC) y células neurales, como las neuronas de los ganglios cerebelosos de la rata (rCGN), que contienen las proteínas SNARE SNAP-25, sintaxina 1 y VAMP 2. Las hibridaciones Western se desarrollaron utilizando anticuerpos dirigidos contra las proteínas SNARE indicadas.

40 La Fig. 8A es una hibridación Western que muestra los resultados de un experimento en el que las células hSC se incubaron durante 7-10 días con lentivirus de shRNA (ARN de horquilla corta) que transportan secuencias de nucleótidos dirigidas específicamente a la SNAP-23. Luego, las células se incubaron durante la noche con IL-1 β (100 ng/ml) en medio de cultivo completo para inducir secreción de TNF- α e IL-6. Después de recoger el sobrenadante, los lisados de estas células se sometieron a SDS-PAGE y las proteínas se detectaron utilizando anticuerpos dirigidos a SNAP-23 o la proteína de control no dirigido β -tubulina. KD se refiere a "knock down" inducido por shRNA o inhibición de expresión.

La Fig. 8B es una representación gráfica de la inhibición de expresión (expresada como porcentaje "knock down" o KD) de SNAP-23 en el experimento que se muestra en la Fig. 8A. También se muestra el porcentaje de inhibición de secreción de TNF- α e IL-6 de estas células antes de la lisis, en relación con el sobrenadante de un cultivo celular de control no tratado con el vector lentivirus. Se debe tener en cuenta que la cuantificación de TNF- α e IL-6 secretados se realizó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de acuerdo con un protocolo proporcionado por Mabtech AB (Suecia).

55 La Fig. 8C es una hibridación Western que muestra los resultados de un experimento en el que las células hSC se incubaron durante 7-10 días con lentivirus de shRNA (ARN de horquilla corta) que transportan secuencias de nucleótidos dirigidas específicamente a VAMP 3. Luego, las células se incubaron durante la noche con IL-1 β (100 ng/ml) en medio de cultivo completo para inducir secreción de TNF- α e IL-6. Después de recoger el sobrenadante, los lisados de estas células se sometieron a SDS-PAGE y las proteínas se detectaron utilizando anticuerpos dirigidos a VAMP 3 o la proteína de control no dirigido β -tubulina. KD se refiere a "knock down" inducido por shRNA

o inhibición de expresión.

La Fig. 8D es una representación gráfica de la inhibición de expresión (expresada como porcentaje “knock down” o KD) de VAMP 3 en el experimento que se muestra en la Fig. 8C. También se muestra el porcentaje de inhibición de secreción de TNF- α e IL-6 (cuatificado por ELISA como se describe en la Fig. 8B) de estas células antes de la lisis, en relación con el sobrenadante de un cultivo celular de control no tratado con el vector lentivirus.

DESCRIPCIÓN DEL CAMPO

10 El dolor crónico es un desafío importante tanto para los pacientes como para los profesionales de la salud. Los pacientes que sufren dolor crónico representan aproximadamente el 20 % de la población adulta.

Hay dos tipos generales de dolor crónico: dolor inflamatorio nociceptivo y dolor neuropático. El dolor nociceptivo inflamatorio generalmente surge de una agresión al tejido y la activación resultante de cascadas inflamatorias y quimiorreceptores. Por otro lado, el dolor neuropático (por ejemplo, entre otros, el dolor crónico, como el dolor por cáncer, dolor postoperatorio, dolor neuropático, dolor por artritis, alodinia, neuralgia posherpética, síndrome del intestino irritable y otros dolores viscerales, dolor óseo, neuropatía periférica, el dolor asociado al sistema circulatorio y algunos tipos de dolor de cabeza) resultan del daño neuronal en el sistema nervioso central o periférico e implica la sensibilización (como la alodinia), es decir, la estimulación incrementada de los nociceptores periféricos que amplifica las señales de dolor transmitidas al cerebro.

Sigue habiendo una necesidad no satisfecha de un tratamiento eficaz del dolor crónico porque los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, tradicionalmente utilizados para el dolor nociceptivo inflamatorio, son de acción corta y pueden tener efectos secundarios graves. De manera similar, mientras que el dolor que implica un mecanismo nociceptivo inflamatorio generalmente tiene una duración limitada al periodo de reparación del tejido y generalmente se alivia con los agentes analgésicos u opioides disponibles (Myers, REGIONAL ANESTHESIA 20:173-184 (1995)), se conocen los efectos secundarios y perjudiciales del tratamiento a largo plazo con opioides.

Del mismo modo, a pesar del hecho de que aproximadamente el 3 % de la población sufre dolor neuropático en un momento dado, no existe un tratamiento satisfactorio; las terapias disponibles funcionan mal, no son efectivas para un segmento significativo de pacientes o causan efectos adversos inaceptables.

De manera alentadora, al menos algunos de los pacientes con dolor crónico responden a la neurotoxina botulínica de acción prolongada (BoNT) tipo A (uno de los 7 serotipos de toxina (A-G) producida por *Clostridium botulinum*) debido a la inhibición específica y persistente de la liberación de transmisores desde los nervios periféricos. Este bloqueo resulta de la escisión proteolítica de las proteínas SNARE; proteínas esenciales para la exocitosis estimulada por Ca²⁺ de neurotransmisores y otros agentes mediante la fusión membrana-vesícula.

El único perfil de las actividades proporcionadas por las neurotoxinas clostridiales (que se detalla a continuación) se ha explotado con éxito para tratar numerosos trastornos humanos (~100 condiciones) que surgen de la actividad excesiva de los nervios que inervan los músculos o glándulas esqueléticas / lisas; revisado en Ward, A.B. & Barnes, M.P., CLINICAL USES OF BOTULINUM TOXINS, Cambridge University Press (2007).

In vivo, las bacterias clostridiales producen un complejo de toxinas (el “complejo hemaglutinina”) que comprende la toxina clostridial dicatenaria de aproximadamente 150 kDa junto con otras proteínas. Estas otras proteínas que no son toxinas se denominan colectivamente proteínas asociadas no tóxicas (NAP). Las NAP identificadas incluyen proteínas que poseen actividad de hemaglutinación, tales como, por ejemplo, una hemaglutinina de aproximadamente 17 kDa (HA-17), una hemaglutinina de aproximadamente 33 kDa (HA-33) y una hemaglutinina de aproximadamente 70 kDa (HA-70); así como una no hemaglutinina no tóxica (NTNH), una proteína de aproximadamente 130 kDa, véase, por ejemplo, Eric A. Johnson y Marite Bradshaw, Clostridial botulinum and its Neurotoxins: A Metabolic and Cellular Perspective, 39 TOXICON 1703-1722 (2001); Stephanie Raffestin y col., Organization and Regulation of the Neurotoxin Genes in Clostridium botulinum and Clostridium tetani, 10 Anaerobe 93-100 (2004) y Gu y col., Botulinum Neurotoxin is Shielded by NTNHA in an Interlocked Complex, 335 Science 977-81 (2012).

En la naturaleza, se cree que el complejo de toxinas es importante para el proceso de intoxicación, al menos en parte porque parece proporcionar protección a la molécula de toxina contra condiciones ambientales adversas y resistencia a la digestión con proteasas. Resulta importante que ciertos dominios de las proteínas HA y NTNH parecen coordinarse con el enlace de toxina y se unen a ubicaciones en la superficie celular (y pueden unirse al receptor de superficie celular de neurotoxina clostridial natural en sitios distintos u otros sitios de enlace de toxina),

facilitando así el enlace, la asimilación y la activación de la toxina.

Los complejos de hemaglutinina de BoNT/A (y, en menor grado, de BoNT/B) se encuentran actualmente en uso clínico para una variedad de afecciones médicas. Los 7 serotipos BoNT contienen un dominio de proteasa de cadena ligera (LC), que está enlazado a un dominio de transporte y unión celular de cadena pesada (HC) a través de un enlace disulfuro simple y enlaces no covalentes. Una fracción C-terminal de HC (H_C) se une a los aceptadores específicos expresados en varios tipos de nervios (incluidas las neuronas motoras, autónomas y sensoriales), mientras que la mitad N-terminal de HC (H_N) forma un canal que permite la translocación de la LC adjunta desde vesículas de membrana 'tipo endosomal' a través del poro H_N al citosol (Dolly y col., CURR. OPIN. PHARMACOL. 9:326-35, 2009). Posteriormente, con una selectividad que depende del serotipo de la toxina, la LC escinde un sustrato específico de SNARE y niega su papel en la liberación de neurotransmisores. Por ejemplo, la LC de BoNT/A (LC/A) elimina 9 aminoácidos del C-terminal de la proteína SNARE SNAP-25, mientras que la LC/E elimina otros 17 residuos C-terminales de la misma SNARE y, de esta forma, permite un bloqueo más disruptivo de la neuroexocitosis; Meng y col., J. NEUROSCI. 29:4981-4192 (2009) (en lo sucesivo, "Meng y col. 2009"). Otras toxinas clostridiales escinden otras proteínas SNARE: por ejemplo, entre otras, BoNT/C escinde las proteínas SNARE SNAP-25 y syntaxina 1 y TeTx, BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F y BoNT/G escinden la proteína SNARE sinaptobrevina (también conocida como VAMP). Un ejemplo de esta perturbación selectiva es que la inhibición de la liberación del transmisor por LC/A por lo general se puede revertir, al menos de forma transitoria, elevando el flujo de Ca^{2+} , pero no en dicho grado en el caso de LC/E (Dolly y col., FEBS J. 278:4454-66, 2011). Sin embargo, la corta parálisis transitoria inducida por LC/E limita su utilidad en aplicaciones clínicas.

Se ha descubierto que el complejo de hemaglutinina de BoNT/A ("complejo BoNT/A") es efectivo en algunos pacientes con migraña, pero no en todos; véase, por ejemplo, Naumann y col., NEUROLOGY 70:1707-1714 (2008), Jackson y col., JAMA 307:1736-1745 (2012) y Dodick y col., Headache 50:921-936 (2010). Además, BoNT/A no puede bloquear la liberación de péptidos mediadores del dolor (como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la sustancia P) de las neuronas sensoriales cuando se produce mediante la activación de TRPV1 (receptor transitorio potencial vanilloide tipo 1), canales de cationes selectivos que son sensibles a la capsaicina (Meng y col., 2009; Meng y col., J. Cell Sci. 120:2864-2874 (2007)(en lo sucesivo Meng y col., 2007).

Un derivado de neurotoxina clostridial quimérico que comprende proteasa LC BoNT/E (LC/E) y dominio de translocación (H_N/E) redirigido sintéticamente a través de la H_C de tipo A (Wang y col., J. BIOL. CHEM. 283:16993-17002 (2008)(en lo sucesivo, Wang y col., 2008)), bloquea de forma potente la liberación de CGRP de las neuronas nociceptivas y atenúa su activación provocada por la activación de CGRP o TRPV1 (Meng y col. 2009). Además, una variante sintética de la proteasa LC/E diseñada para ser de acción prolongada agregando la proteasa LC/E más robusta a una forma inactiva mutada de la proteasa de larga duración en BoNT/A ha demostrado ser muy eficaz y terapéutica tanto en neuronas sensoriales cultivadas, como en un modelo animal de dolor inflamatorio (Wang y col., J. BIOL. CHEM. 286:6375-85, 2011) (en lo sucesivo, "Wang y col., 2011").

Además, otro serotipo de toxina de acción prolongada, BoNT/C1, bloquea la liberación de CGRP de las neuronas ganglionares del trigémino sensorial (TGN) y establece su potencial anti-nociceptivo (Meng y col. 2007). Aunque el BoNT/D (que tiene una actividad de proteasa de larga duración) también es eficaz en el bloqueo de la liberación de CGRP, no puede utilizarse como terapia para pacientes humanos en su forma natural porque la BoNT/D no se une al músculo humano ni bloquea la neurotransmisión; Coffield y col., J. PHARMACOL. EXP. THER. 280:1489-1498 (1997) (en lo sucesivo, "Coffield y col., 1997"). Este notable hallazgo resalta alguna diferencia entre la respuesta a la BoNT/D en humanos y roedores, ya que un grupo ha afirmado recientemente que la proteína de la vesícula sináptica del receptor BoNT/A natural 2 (SV2) puede actuar como un receptor de proteína para BoNT/D en ratas y ratones (Peng y col., PLoS PATHOGENS 7:e1002008, (2011)).

Sin embargo, todas estas variantes de BoNT sufren la desventaja de la no selectividad; bloquean la liberación de transmisores y mediadores de los nervios motores y autónomos, así como de las neuronas sensoriales. Esta falta de especificidad podría llevar a efectos secundarios graves en el uso clínico para el tratamiento del dolor.

DESCRIPCIÓN Y EJEMPLOS

La presente invención está dirigida a procedimientos y composiciones que tienen varios aspectos y realizaciones que se incluyen en las reivindicaciones. Por lo tanto, y sin limitación, en una realización, la presente invención está dirigida a nuevos agentes bioterapéuticos para el tratamiento del dolor crónico y / o inflamatorio; dichos agentes pueden diseñarse mediante la ablación del tropismo normal de las neurotoxinas clostridiales y sus derivados. Específicamente, los productos biológicos pueden reorientarse eliminando o modificando la H_{CC} que posee sitios de enlace para los receptores de proteínas y gangliósidos y añadiendo uno de los varios ligandos selectivos posibles

(en lo sucesivo, "TL") al C terminal de la HC. Los TL se eligen preferentemente para restringir la acción de los derivados de toxina clostridial de forma selectiva en las neuronas sensibles al dolor, por lo que no afectan a otros tipos de neuronas. La retención del segundo subdominio de H_{CN} es un avance novedoso debido a nuestro descubrimiento de su importancia para la asimilación de la LC de la toxina en las neuronas (o células no neurales), con la posterior escisión de SNAP-25 e inhibición de la exocitosis; véase, por ejemplo, la Fig. 2, la Fig. 3 y el Ejemplo 1.

Como se muestra en la Fig. 1 y se describe en el presente documento, en ciertas realizaciones de la invención se retienen ambos subdominios de H_C (H_{CN} y H_{CC}) (incluidas las regiones de unión a gangliósidos de H_{CC}), pero la capacidad de unirse al receptor de proteínas, por ejemplo, la sinaptotagmina se extirpa mediante residuos mutantes identificados como esenciales para la última interacción. Por ejemplo, la mutación de Lys¹¹⁹² a Glu o Ala¹¹⁹⁶ a Lys en H_{CC} de BoNT/B disminuyó su potencia en > 300 veces en la unión neuromuscular (Rummel y col., PROC. NAT. ACAD. SCI. Estados Unidos 104:359-64, 2007; Jin y col., NATURE 444:1092-95, 2006). Por lo tanto, esta estrategia tiene la ventaja de explotar la capacidad de la neurotoxina para unirse a un "receptor dual" para que el TL se enlace con más efectividad a su objetivo; la unión a los gangliósidos a través de la porción H_{CC} mutada parece aumentar la concentración local del agente terapéutico en la superficie celular cerca de los receptores de proteínas putativos y, por lo tanto, aumenta la interacción de cada TL con su propio ectoreceptor de proteínas requerido en la superficie celular objetivo. Por lo tanto, la eficacia terapéutica se incrementa mediante esta modalidad de doble enlace.

En un tercer conjunto de realizaciones no limitativas que también se muestra en la Fig. 1, se pueden crear nuevas terapias adicionales mediante la creación de proteínas recombinantes en las que una segunda proteasa de cadena ligera activa o inactiva, como la proteasa de cadena ligera activa BoNT/E (un fuerte inhibidor de neuroexocitosis) está unida a BoNT/A o a uno o más constructos descritos anteriormente. Esto puede ejercer una influencia estabilizadora para producir una actividad de proteasa de larga duración en las proteínas SNARE diana. La capacidad de fabricar y utilizar una familia de agentes bioterapéuticos tan selectiva y de larga duración representa un avance importante que debería revolucionar el desarrollo de las futuras generaciones de fármacos eficaces y selectivos para el dolor crónico e inflamatorio.

Como se emplea en el presente documento, el término "específico", cuando se utiliza con respecto a las interacciones ligando:diana, significa que el ligando se une a y / o cataliza preferentemente la diana con una avidez de al menos 10²:1, 10³:1, 10⁴:1 o al menos aproximadamente 10⁵:1 o al menos aproximadamente 10⁶:1 sobre sustancias no diana en condiciones sustancialmente fisiológicas. El término "selectivo", cuando se utiliza con respecto a las interacciones ligando:diana, significa que el ligando une y / o cataliza preferentemente la diana con una avidez de 10:1 o al menos aproximadamente 10²:1 o al menos aproximadamente 10³:1 o más de 10⁴:1 sobre sustancias no diana en condiciones sustancialmente fisiológicas.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere al diseño, preparación y uso de uno o más constructos génicos que codifican polipéptidos que comprenden agentes terapéuticos nucleares analgésicos que inhiben la neurotransmisión (proteasas selectivas SNARE) y poseen una actividad analgésica. Estos pueden incluir, consistir en o consistir esencialmente en, sin limitación, derivados de TeTx o BoNT/X (serotipos A, B, C1, D, E, F o G), pero cualquiera de los dos contiene un H_{CC} mutado (sustancialmente sin capacidad para unirse al receptor de proteína, pero capaz de interactuar con los gangliósidos, véase más arriba) o están sustancialmente desprovistos de la región H_{CC} (véase la Fig. 1).

En otro enfoque complementario, una segunda región de codificación de LC activa, como la región de codificación de LC/E, que codifica una proteasa que actúa como un inhibidor efectivo de la liberación de CGRP de las neuronas sensoriales (véase, por ejemplo, Want y col., 2011; Meng y col., 2009) puede unirse a uno o más de los candidatos oligonucleótidos mencionados anteriormente, preferentemente antes de la siguiente etapa.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido puede comprender una LC/X que está mutada de manera que carezca sustancialmente de actividad de proteasa selectiva de SNARE neuronal en comparación con la proteína no mutada expresada. Por ejemplo, el residuo mutante Lys²²⁴ en la fracción LC/E a Asp aumentó significativamente su escisión a SNAP-23 humana con una actividad reducida hacia la SNAP-25 neuronal (Chen y Barbierio, Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos, 106:9180-9184, 2009). En este caso, se entenderá que se puede hacer referencia a un oligonucleótido de este tipo utilizando la nomenclatura mL.C.BoNT/X (donde "X" es cualquier serotipo de toxina) que generalmente se refiere a un BoNT/X en el que la proteasa de cadena ligera se ha mutado para que no tenga sustancialmente actividad proteolítica hacia las proteínas SNARE neuronales, manteniendo al mismo tiempo sustancialmente la estructura estérica de la toxina BoNT/X original.

En cualquier caso, la unión de un gen que codifica el TL requerido para estas moléculas otorgará al polipéptido

traducido la capacidad de dirigirse selectivamente a las neuronas sensoriales o las células liberadoras de citoquinas (que se muestran esquemáticamente en la Fig. 1). Evidentemente, una de las ventajas de la presente invención es que proporciona una serie de constructos génicos diferentes, que pueden diseñarse o elegirse para que se adapten a uno o más constructos que expresan proteínas terapéuticas que poseen la capacidad de inhibir eficazmente la liberación de mediadores del dolor de los nociceptores o inductores de células liberadoras de inflamación.

La invención, por lo tanto, también se refiere a las proteínas clostridiales terapéuticas producidas mediante los oligonucleótidos, los procedimientos de preparación de los oligonucleótidos y proteínas, los procedimientos para la expresión *in vivo* y / o *in vitro* de proteínas codificadas por estos constructos, la purificación de dichas proteínas y los ensayos para su actividad y caracterización fisicoquímica, así como los procedimientos para tratar a un paciente que sufre o corre el riesgo de sufrir de dolor crónico o inflamatorio, empleando dichas proteínas.

En una realización preferida, la construcción de constructos génicos de acuerdo con la invención conlleva las etapas de (no necesariamente en este orden) modificar un ácido nucleico que codifica una BoNT/X monocatenaria (por ejemplo, serotipo /A, /B, /C1, /D, /E, /F y /G o toxinas quiméricas que comprenden fragmentos de una pluralidad de subtipos de toxinas), eliminar o mutar la región H_{CC} de cadena pesada (véase más arriba) y enlazar un ligando selectivo (TL) dirigido a neuronas sensoriales o células mediadoras de la inflamación. Dependiendo de la identidad del serotipo de la toxina, la LC activa de un serotipo BoNT más robusto (como la LC/E) se puede agregar a la LC/A para extender su longevidad. Estos enfoques se muestran de manera esquemática en la Fig. 1.

Los ligandos selectivos utilizados en la presente invención actúan para dirigir selectivamente las moléculas biológicas terapéuticas de la presente invención a neuronas sensoriales y / o células capaces de secretar factores mediadores de la inflamación. Así, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un TL está unido al extremo 3' de un ácido nucleico que codifica una toxina clostridial modificada, como uno de los constructos descritos anteriormente, para permitir que las proteínas expresadas se unan selectivamente a los receptores de proteínas de las fibras C nociceptivas, que están implicadas en las vías del dolor crónico.

Como se describe en el Ejemplo 2 de esta solicitud, una realización de este TL se ha preparado por medios recombinantes en forma activa. De esta manera, se puede hacer un analgésico selectivo y de larga duración que carezca de los efectos adversos y las propiedades adictivas de los analgésicos crónicos convencionales. Estos productos terapéuticos también ofrecen la gran ventaja de que no afectan o no afectan sustancialmente la secreción de neurotransmisores colinérgicos en los nervios neuromusculares y autónomos, a diferencia de las BoNT no modificadas.

En otras realizaciones de la invención, se puede utilizar un TL basado en el fragmento de proteína CGRP₈₋₃₇ del CGRP humano (péptido relacionado con el gen de la calcitonina), un antagonista del receptor 1 de CGRP de receptor de superficie celular, como un ligando selectivo para dirigir el tratamiento terapéutico de la presente invención a neuronas sensoriales y / o células no neuronales que secretan mediadores inflamatorios. Tan útiles como un TL para dirigir los agentes bioterapéuticos a las últimas células, los genes que codifican el antagonista del receptor de interleuquina-1 humano (IL-1RA) (o un derivado selectivamente funcional del mismo) también pueden emplearse para construir el ácido nucleico expresable.

De este modo, se dirige la molécula bioterapéutica a las neuronas nociceptivas mediante el aprovechamiento de la presencia de los receptores en estas neuronas (por ejemplo, en las TGN) (Meng y col., 2007) y sus funciones en la señalización del dolor inflamatorio crónico y neuropático (North RA J. PHYSIOL. 554, 301-308, 2004). Una característica atractiva del direccionamiento de TRPV1 es que el tráfico de esta proteína del canal de cationes a la membrana plasmática es parcialmente dependiente de las SNARE, implicando una exocitosis controlada por proteína quinasa C y el receptor se aumenta en respuesta al dolor crónico (Morenilla-Palao y col., J BIOL CHEM 279, 25665-72, 2004; Szallasi y col., TRENDS MOL MED 12, 545-54, 2006). Por lo tanto, dirigir selectivamente los derivados de la toxina a las neuronas positivas para TRPV1 puede no solo bloquear la liberación de los neurotransmisores del dolor de estas neuronas, sino también regular a la baja la expresión de TRPV1, disminuyendo así la sensibilidad a la hiperalgesia.

Un antagonista de α CGRP (residuos 8-37), versión truncada de CGRP (37 residuos), es eficaz para antagonizar la acción de CGRP de liberación basal *in vitro* de neuronas en cortes del tronco encefálico (Meng y col., 2009). Este antagonista también puede aliviar el dolor *in vivo* (Bird y col., MOL PAIN 2, 31, 2006) al unirse al receptor 1 de CGRP presente en los ganglios sensoriales y terminales nerviosos presinápticos nociceptivos (Hay y col., BR J PHARMACOL 140, 477-86, 2003; Sams-Nielsen y col., BR J PHARMACOL 132, 1145-53, 2001; Zhang y col., J NEUROSCI 27, 2693-703, 2007).

60

El uso de TL que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en α CGRP₈₋₃₇ (o sus derivados) para lograr una administración dirigida de terapias nucleares derivadas de BoNT en neuronas sensoriales ofrece múltiples ventajas. Por ejemplo, la inhibición resultante de la liberación de CGRP invalida la vasodilatación y la desgranulación de mastocitos asociadas con la actividad de CGRP. En particular, la prevención de la desgranulación de los mastocitos disminuye la liberación de efectores inflamatorios tales como las citoquinas, que incluyen, entre otros, TNF α e IL-1 β , que pueden actuar sobre neuronas sensoriales. Estos factores que inducen la regulación al alza de la síntesis de CGRP a través de MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) (Durham, P. L.; Russo, A. F. J NEUROSCI 23, 807-15, 2003), están implicados, por tanto, en una cascada de señalización regulada por retroalimentación. El uso de inhibidores de la secreción de CGRP en la presente invención interrumpe así esta expresión y libera la cascada.

Se ha demostrado que el CGRP es absorbido por terminales nerviosos nociceptivos perivasculares y esto se reduce eficientemente por CGRP₈₋₃₇, lo que sugiere que se produce una endocitosis de CGRP mediada por receptores (Sams-Nielsen y col., BR J PHARMACOL 132, 1145-53, 2001). El uso de los agentes bioterapéuticos de la presente invención, que comprende un TL de enlace a CGRP, por lo tanto, debería administrar con éxito los agentes biológicos analgésicos de la invención a células diana (por ejemplo, nervio presináptico y mastocitos). En el Ejemplo 3 de esta memoria descriptiva, una secuencia de ADN sintético que codifica CGRP₈₋₃₇ humano se ha ligado al extremo 3' de una realización de una región de codificación abierta expresable para la síntesis de un agente terapéutico biológico analgésico dirigido al receptor de CGRP.

El antagonista del receptor de interleuquina 1 (IL-1RA), un antagonista del receptor de origen natural, se une al receptor de la IL-1 expresado en diversas células, por ejemplo, macrófagos, monocitos, sinoviocitos, mastocitos y neutrófilos (Pou J y col., BIOCHIM BIOPHYS ACTA. 1811:556-63, 2011; Chin y col., J CLIN INVEST. 82:420-6, 1988; McColl y col., J EXP MED. 176:593-8, 1992). El antagonista IL-1RA inhibe de forma competitiva la unión de IL-1 α y IL-1 β al receptor de IL-1 sin inducir ninguna respuesta intracelular detectable (Arend y col., ANNU. REV. IMMUNOL. 16:27-55, 1998).

De acuerdo con la presente invención, se espera que la distribución selectiva de las terapias derivadas de BoNT/X en las células mediadoras de la inflamación a través del enlace IL-1RA a su receptor reduzca la secreción de citoquinas mediante la escisión de los SNARE que son esenciales para la liberación de estas citoquinas. Como se ha señalado anteriormente, se observó que SNAP-23 y VAMP 3 son esenciales para la liberación de TNF- α y 21-6 de las células sinoviales humanas (Fig. 8).

Aunque no es necesariamente limitante para las realizaciones más amplias, todos los constructos que ejemplifican la invención mostrada en el presente documento contienen secuencias cortas que codifican residuos de aminoácidos, tales como una región de "bucle", situada entre HC y LC de BONT/X (y ubicada dentro de (entre) los residuos de cisteína implicados en el enlace di-sulfuro que une la LC y la HC). La región de bucle se altera para que contenga una secuencia de aminoácidos de reconocimiento de proteasa reconocida selectiva o específicamente por un exógeno, de modo que las proteínas monocatenarias (SC) expresadas se puedan convertir fácilmente *in vitro* en la forma di-catenaria (DC) activada por reacción con dicha proteasa exógena (por ejemplo, trombina), por ejemplo en solución o mediante una columna o reactivo de lote en el que la proteasa exógena se inmoviliza. Los expertos en la materia son conscientes de que puede utilizarse cualquier proteasa exógena adecuada siempre que no escinda la proteína en posiciones no deseadas dentro de las regiones de cadena pesada o ligera.

Los constructos de ácido nucleico de la presente invención se construyen de forma recombinante, para permitir la incorporación de alternancias de las secuencias de BoNT/X de origen natural para proporcionar proteínas terapéuticas para el tratamiento del dolor crónico o la inflamación cuando se expresan en un vector adecuado y en un sistema celular huésped. Los ejemplos de células huésped que se pueden utilizar para la expresión de genes exógenos incluyen, entre otras, células de insectos, células de mamíferos y líneas celulares, células de levadura y células bacterianas, particularmente la bacteria Gram positiva *Escherichia coli* (*E. coli*). Actualmente, los solicitantes prefieren usar *E. coli* como sistema de expresión de la célula huésped.

Las proteínas terapéuticas expresadas y / o elaboradas a partir de los constructos génicos descritos anteriormente ofrecen varias ventajas importantes sobre el uso de agentes descritos previamente para el tratamiento del dolor, incluidas las terapias previas basadas en neurotoxinas clostridiales. Estas ventajas incluyen, (a) direccionamiento dirigido y selectivo a neuronas sensoriales y / o células inflamatorias a través de un TL vinculado; (b) la distribución intracelular y la posterior inhibición de la exocitosis de péptidos o citoquinas estimulantes del dolor, sin afectar sustancialmente a otras células, como las neuronas motoras y autónomas, y (c) el tiempo de vida altamente deseable y muy extendido de los agentes bioterapéuticos (comparable con BoNT/A), que es una gran ventaja al disminuir la frecuencia de tratamiento o la necesidad del tratamiento repetitivo del dolor crónico y las condiciones

inflamatorias.

Aunque se han descrito aspectos de la presente invención con referencia a las realizaciones descritas, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los ejemplos específicos descritos son solo ilustrativos de estos aspectos y no limitan de ninguna manera la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1: Construcción de rA^HHC_N y caracterización de la proteína recombinante purificada

10 El ácido nucleico recombinante rA^HHC_N se creó mediante "rA", un constructo monocatenario de la secuencia de nucleótidos de BoNT/A sintética en la que los codones están optimizados para su expresión en *E. coli*. La secuencia rA también está diseñada para poseer un sitio de escisión de trombina en la región de bucle entre las regiones putativas de cadena pesada y cadena ligera de la toxina (bucle LC-HC) y aminoácidos adicionales que comprenden
15 un segundo sitio de escisión de trombina diseñado cerca del carboxi terminal de la toxina monocatenaria entre las secuencias de toxinas y un His₆ C-terminal (SEQ ID NO: 19) para permitir la escisión de la región His₆ (SEQ ID NO: 19) y el corte del bucle inter-disulfuro después de la purificación. La secuencia rA se clona en el vector de expresión de *E. coli* pET29a(+) para la propagación; pET29a(+) es un vector de plásmido derivado de pBR322 disponible comercialmente que contiene un origen de plásmido pBR322, un origen de replicación viral del bacteriófago f1, el
20 promotor del bacteriófago T7, un tag S N-terminal, un tag His₆ C-terminal (SEQ ID NO: 19) para la purificación del producto génico, una secuencia de clonación múltiple (MCS) y el gen represor lac1. El vector se puede obtener de, por ejemplo, EMD4 Biosciences, Inc.

La región de la secuencia de ácido nucleico que codifica la región HC_N (es decir, que codifica los aminoácidos: I₈₇₄-
25 Q₁₀₉₁) es eliminado del vector pET29a-rA (Wang y col. 2011, J. BIOL. CHEM) por PCR inversa, mediante cebadores adecuados complementarios a cada cadena de ácido nucleico seguido de autoligado del vector de expresión. Como parte de esta porción de la ingeniería del ácido nucleico codificante, se introdujeron dos residuos de aminoácidos adicionales (Gly-Gly) en lugar de la región HC_N entre los dominios H_N y H_{CC} de la cadena pesada. El constructo de ADN resultante hereda los dos sitios de escisión de trombina de rA. La Fig. 2A muestra diagramas esquemáticos de
30 las proteínas monocatenarias rA y rA^HHC_N que muestran los sitios de escisión de la trombina y la ubicación del enlace disulfuro intercatenario.

Después de la verificación de las secuencias de ADN del inserto rA^HHC_N resultante, el vector que contiene el gen monocatenario (SC) se transformó en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*, y la expresión fue obtenida por autoinducción
35 (Wang y col., 2008). Seguidamente, las células se sedimentaron por centrifuga, se lavaron y se lisaron mediante lisozima y varios ciclos de congelación / descongelación. El material insoluble se eliminó por centrifugación y el sobrenadante se usó para las etapas posteriores. El SC se separó del resto del sobrenadante por IMAC en resina TALON y se eluyó con 500 mM de imidazol. La Fig. 2B muestra un gel SDS-PAGE en el que el carril izquierdo muestra marcadores de peso molecular y, de izquierda a derecha, el lisado despejado (1), la circulación de la
40 columna (2), el lavado previo a la elución de la columna (3), las fracciones eluidas (4-9). La proteína rA^HHC_N eluida se intercambia luego con el tampón de almacenamiento (20 nM de Hepes, 150 mM de NaCl, pH 7,4) y se incuba con trombina (1 unidad / mg de toxina) a 22 °C durante 1 hora para eliminar la toxina. En algunos casos, los eluatos de IMAC se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico según el protocolo establecido. Por ejemplo, las muestras purificadas por IMAC se intercambian en tampón de 50 mM de Tris-HCl (pH 8,1) y se
45 cargan en una columna Q de recursos, y después del lavado con 30 mM de NaCl se aplica un gradiente progresivo hasta 1 M de NaCl en tampón de 50 mM de Tris-HCl. Las muestras puras se eluyen con 70 mM de NaCl (Wang y col., 2008 y 2011).

La Fig. 2C muestra geles reductores y no reductores de SDS-PAGE de la toxina purificada antes (SC) y después de
50 cortar con trombina (DC). La reducción se realizó utilizando ditioneitol (DTT) para reducir y romper los enlaces disulfuro que unen la LC y la HC. Los carriles de DC demuestran que sin reducción (-), la molécula de DC migra como una molécula de un solo peso molecular (lo que indica que los enlaces disulfuro están intactos); tras la reducción (+), el gel demuestra que el derivado de toxina está atrapado.

55 La forma SC purificada por IMAC de rA^HHC_N se convirtió en la forma de doble cadena (DC) mediante incubación con trombina. El derivado de toxina DC mostró la capacidad de unirse a un fragmento recombinante del bucle intraluminal de SV2C (el receptor de proteína BoNT/A), mediante un ensayo desplegable e hibridación Western (véase la Fig. 3A).

60 Un ejemplo de dicho ensayo se lleva a cabo como sigue: La forma SC purificada por IMAC de rA^HHC_N se convierte

en la forma de doble cadena (DC) mediante incubación con trombina como anteriormente. Además, las proteínas DC rA y rE también se agregan al ensayo como control. Los fragmentos intra-luminales expresados de forma recombinante y etiquetados con GST de un aceptor para BoNT/A (GST-rata SV2C (454-579)) se expresan y se purifican como se describe en Wang, y col., J. BIOL. CHEM. 283:16993-17002 (2008). Aproximadamente 100 µg de esta proteína se inmovilizan utilizando 100 µl de una suspensión de resina de flujo rápido de sefarosa 4B de glutatión (GE Healthcare) y se incuban con 100 nM de rA, rE o el derivado de toxina rA^{H_{CN}} en un volumen total de 100 µl de tampón de unión (50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, Triton X-100 al 0,5 %, pH 7,6). En cada caso, las perlas de resina se recolectan por centrifugación y se lavan cinco veces con > 10 volúmenes de lecho del mismo tampón durante 15 minutos a 4°C.

10 Las proteínas unidas se eluyen de las perlas lavadas añadiendo tampón de muestra no reductor SDS-PAGE. Las toxinas se detectan por hibridación Western como se muestra en la Fig. 3A. Las dos hibridaciones Western a la izquierda son muestras de rA, rA^{H_{CN}} y rE sin realizar el ensayo desplegable para confirmar la especificidad de los anticuerpos utilizados. Este par de hibridaciones Western muestran geles no reductores SDS-PAGE con los carriles, de izquierda a derecha, estándares de peso molecular teñidos previamente, rA, rA^{H_{CN}} y rE. La hibridación Western de extremo izquierdo se desarrolla utilizando un anticuerpo selectivo para la cadena ligera de BoNT/A (LC/A) y la hibridación Western del lado derecho de este par se desarrolla utilizando un anticuerpo para la cadena ligera de BoNT/E (LC/E). Como se esperaba, el anticuerpo anti-LC/A detectó tanto rA como rA^{H_{CN}}, pero no detectó rE. De manera similar, el anticuerpo anti-LC/E solo detectó rE y no rA ni rA^{H_{CN}}.

20 El par de hibridaciones Western de la derecha muestra los resultados de los ensayos de unión contra el componente aceptor SV2C inmovilizado y se ejecutan en el eluido de la columna final. Las hibridaciones Western se desarrollan de la misma manera y la SDS-PAGE se ejecuta de la misma manera con el mismo orden de carril que en el par de la izquierda descrito anteriormente. Los resultados muestran que rE no estaba enlazado por el componente aceptor SV2C inmovilizado (véase la hibridación Western del extremo derecho del último carril). Sin embargo, la hibridación Western de la izquierda del par muestra que tanto rA como rA^{H_{CN}} se enlazaron al componente aceptor y se eluyeron con éxito, siendo los pesos moleculares de estos polipéptidos idénticos a los de las especies detectadas en el control positivo.

30 El derivado de toxina DC mostró la capacidad de unirse a un fragmento recombinante del bucle intra-luminal del componente aceptor SV2C, mediante un ensayo desplegable e hibridación Western. Como control, una forma purificada de rE (toxina recombinante de BoNT/E con forma de doble cadena), que naturalmente se une a las formas glicosiladas de los receptores de proteínas relacionados SV2A y SV2B, se incubó con el fragmento SV2C en condiciones idénticas, y no se unió a este fragmento. Por lo tanto, la interacción de rA^{H_{CN}} con SV2C es selectiva y no ocurre con rE.

40 Cuando se añadió rA^{H_{CN}} en diluciones en serie a cultivos de neuronas de gránulos cerebelosos de rata (CGN), el derivado de toxina no logró sustancialmente escindir la SNAP-25. La Fig. 3B muestra un experimento en el que se incubaron CGN de rata con diluciones en serie de diez veces rA o rA^{H_{CN}} (de 1000 pM a 0,01 pM y con un control negativo que contiene 0 pM) en medio de cultivo a 37 °C durante 24 horas. Las células se recogieron y se lavaron, luego se lisaron en tampón de muestra de SDS-PAGE; las hibridaciones Western se desarrollaron mediante un anticuerpo selectivo para la SNAP-25 intacta y un reactivo con el producto de escisión SNAP-25 de digestión con BoNT/A. Los resultados mostraron que tras el tratamiento de CGN de rata con la toxina rA, la SNAP-25 intracelular se escinde a concentraciones de toxina a y por encima de aproximadamente 0,01 pM de la toxina, mientras que la SNAP-25 permanece en gran parte intacta después del tratamiento de las células CGN con rA^{H_{CN}} de menos de aproximadamente 1000 pM. Dado que ambas proteínas contienen proteasa LC/A con actividad similar hacia sustratos recombinantes, los datos sugieren que la eliminación de H_{CN} del derivado rA^{H_{CN}} priva y / o atenúa el derivado de toxina de la capacidad de someterse a la asimilación y / o translocación de LC dentro de las células CGN. Además, como se muestra en la Fig. 3B, ni rA ni rA^{H_{CN}} escindieron la sintaxina-1 de la proteína SNARE, que se agregó a los geles de SDS-PAGE como control negativo.

55 De acuerdo con esta hipótesis, la inyección intraperitoneal de cada toxina en ratones, en un ensayo de letalidad en ratones, también mostró la toxicidad desproporcionada de las toxinas. Como se muestra en la Fig. 3C, al calcular el mL_{D50}/mg (el mL_{D50} se define como la dosis más baja de toxina efectiva para matar al 50 % de un grupo de 4 ratones en 4 días), la variante rA^{H_{CN}} eliminada muestra aproximadamente una disminución de 6,7 x 10⁴ veces la toxicidad en relación con rA.

60 Estos nuevos hallazgos sugirieron que la presencia de la porción de H_{CN} de la cadena pesada puede ser importante para la intoxicación celular por BoNT/A (incluyendo rA) y sus derivados. Además, este experimento parece diseccionar uno o más elementos del mecanismo de intoxicación multifásico de la neurotoxina clostridial (unión

selectiva de la superficie celular, asimilación y translocación de la LC al citosol y escisión de la SNARE).

Ejemplo 2: Construcción de derivados de toxinas LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1 y LC.H_N/A-PT-1

5 Los datos descritos en el Ejemplo 1 muestran que es posible alterar la especificidad de BoNT/A (y, por lo tanto, de muchas o todas las otras neurotoxinas clostridiales) sin alterar la endopeptidasa de LC eliminando la región H_{CC} de la región de unión de la cadena pesada. Además, los solicitantes suponen que se producirían resultados similares si la región H_{CC} se mutara en lugar de retirarse para eliminar la capacidad de la toxina para unirse al receptor de proteína.

10 Los solicitantes deseaban investigar si la toxina alterada puede redireccionarse para unirse selectivamente a otro tipo de célula. Como se muestra en la Fig. 4, los solicitantes consideraron que dichas variantes de neurotoxinas H_{CC} faltantes o H_{CC} inactivas pueden vincularse a ligandos selectivos (TL) cuidadosamente seleccionados, por ejemplo dirigidos a receptores purinérgicos.

15 Para generar LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1 (Fig. 5A), se obtuvo un producto de PCR que codifica un gen sintético LC.H_N.H_{CN}/A, utilizando el constructo pET29a-BoNT/A como plantilla y un par de cebadores (cebador de avance T7 y un cebador inverso específico con un sitio de restricción Sac I diseñado). Esto se procesó utilizando las endonucleasas Xba I y Sac I y se clonó en el vector pET29a(+) mediante estos dos sitios de restricción. El constructo resultante se procesó con Sac I y Xho I antes de la ligadura con un ácido nucleico que comprende un fragmento génico de purotoxina-1 sintético procesado con Sac I y Sal I endonucleasa (abreviado "PT-1": mostrado como secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 11) y la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12) para generar un constructo selectivo LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1. De manera similar, se creó LC.H_N/A-PT-1 excepto que la secuencia de nucleótidos que codifica LC.H_N de BoNT/A se fusionó directamente con PT-1 sin las secuencias de nucleótidos H_{CN} intermedias (Fig. 5A).

20 La secuencia de nucleótidos del constructo resultante se verificó mediante análisis de secuencia, luego cada uno de los constructos de vectores de expresión anteriores se transformó en la cepa huésped de *E. coli* Origami™ 2(DE3); esta cepa es un derivado K-12 que tiene mutaciones en ambos genes de la tiorredoxina reductasa (*trxB*) y la glutatión reductasa (*gor*), que aumentan considerablemente la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma de *E. coli*. La expresión de la proteína plasmídica se indujo mediante un medio de autoinducción (Wang y col., JBC, 2008).

30 Las proteínas expresadas se purificaron por IMAC como anteriormente, seguido por un análisis SDS-PAGE de LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1 (Fig. 5B) y LC.H_N/A-PT-1 (Fig. 5C) en geles reductores y no reductores, sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1. Las células se sedimentaron, se lavaron y se lisaron utilizando lizozima y varios ciclos de congelación / descongelación; el material insoluble se eliminó por centrifugación. Las proteínas fueron atrapadas por IMAC en resina TALON, eluidas con 500 mM de imidazol. En cada una de las Fig. 5B y 5C, el carril 1 corresponde al lisado despejado, 2 a la fracción de circulación, 3 a la fracción de lavado y las fracciones 4-8 a las fracciones de eluatos. El carril no marcado en cada gel comprende estándares de peso molecular.

40 Como se puede ver, a diferencia de los experimentos que utilizan rA^{H_{CN}} expresado, ambas LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1 y LC.H_N/A-PT-1 se expresaron en gran parte en forma de DC, como se refleja por el aspecto en condiciones reductoras de LC y H_N.H_{CN}/A-PT-1 o H_N/A-PT-1 en SDS-PAGE (Fig. 5B y Fig. 5C). Este hecho sugiere que en este experimento el sitio de trombina intra-bucle en cada constructo se escindió después de la expresión o durante la purificación sin la necesidad de una etapa de escisión *in vitro*. Se confirmó la presencia de especies discretas de LC y "HC" mediante hibridación Western; la Fig. 6A muestra que el anticuerpo anti-LC/A detecta la doble cadena unida por disulfuro LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1 en geles no reductores, pero solo la LC en geles reductores. De manera similar, el anticuerpo anti-His6 ("His6" descrito como SEQ ID NO: 19) detecta la cadena doble unida por disulfuro LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1 en geles no reductores, pero solo la H_N.H_{CN}/A-PT-1 en condiciones reductoras. La tinción con azul de Coomassie del gel muestra que ambas cadenas están presentes en condiciones reductoras. La Fig. 6B muestra el mismo experimento utilizando la LC.H_N/A-PT-1 purificada, con resultados similares.

50 Se realizó la incubación de 1,6 nM de LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1 o LC.H_N/A-PT-1 con neuronas sensoriales de ganglios trigeminales de rata como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la Fig. 6C, solo las células incubadas con LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1 mostraron escisión detectable de SNAP-25 mediante esta concentración de proteína. En cambio, LC.H_N/A-PT-1 no pudo escindir SNAP-25 dentro de las células de los ganglios trigeminales de rata a pesar de transportar la misma LC. El resultado se muestra cuantitativamente en la Fig. 6D. Estos hallazgos sugieren que H_{CN} desempeña un papel importante al permitir que el polipéptido LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1 entre en las neuronas sensoriales y escienda su objetivo intracelular; la carencia de resultados de H_{CN} trae consigo una capacidad considerablemente atenuada o ausente de que la proteína penetre la célula. Por lo tanto, los solicitantes han

descubierto que la presencia de H_{CN} es muy importante para permitir que los agentes terapéuticos basados en toxina clostridial (incluso aquellos como LC.H_N/A-PT-1 que producen un TL selectivo para un receptor de proteína indicado por la célula diana) entren en la célula madre.

- 5 En la presente memoria descriptiva (a menos que se indique lo contrario), todas las secuencias de aminoácidos se muestran en la dirección del amino terminal al carboxi terminal, y las secuencias de nucleótidos se muestran en la dirección 5' a 3'.

10 **Fragmento de ácido nucleico de purotoxina-1 sintético (con codones de parada) y sus aminoácidos codificados.**

15 SEQ ID NO: 9 y 10 son la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos, respectivamente, del fragmento de ácido nucleico de purotoxina-1 sintético y sus aminoácidos codificados, incluidas las regiones enlazadoras adicionales. A continuación se muestra una alineación de estas secuencias con los sitios de endonucleasas de restricción relevantes que se muestran como sigue: Los nucleótidos 1-18 comprenden sitios de restricción para Sal I, Sac I y EcoRV; nucleótidos 19-63: tres iteraciones de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos Gly₄Ser (SEQ ID NO: 20) (un enlazador no estructurado); nucleótidos 64-171 (se muestran subrayados y en negrita): el fragmento de purotoxina-1, que incluye un codón de parada (*); nucleótidos 172-177: el sitio de restricción para la endonucleasa Xho I.

20

V D E L D I G G G G S G G G G S G G G G S **G Y C A E K**
 1 GTCGAC GAGCTC GATATC GGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGTTTCAGGTTGGTGGTGGCAGT **GGTTATTGTGCAGAAAA** 80
 SalI Sac I EcoRV

G I R C D D I H C C T G L K C K C N A S G Y N C V C
 81 **AGGTATTTCGCTGTGATGATATTCATTGTTGCACCGGTCTGAAATGTAAATGTAATGCCAGCGGTTATAATTGCGTGTGCC** 160

R K K * L E (SEQ ID NO :10)

161 **GCAAAAAGTAA** CTCGAG 177 (SEQ ID NO :9)
 XhoI

25 **Fragmento de ácido nucleico de purotoxina-1 sintético (sin codones de parada) y sus aminoácidos codificados.**

30 SEQ ID NO: 11 y 12 son la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos, respectivamente, del fragmento de ácido nucleico de purotoxina-1 sintético y sus aminoácidos codificados, incluidas las regiones enlazadoras adicionales. A continuación se muestra una alineación de estas secuencias con los sitios de endonucleasas de restricción relevantes que se muestran como sigue: Los nucleótidos 1-18 comprenden sitios de restricción para Sal I, Sac I y EcoRV; nucleótidos 19-63: tres iteraciones de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos Gly₄Ser (SEQ ID NO: 20) (un enlazador no estructurado); nucleótidos 64-168 (se muestran subrayados y en negrita): el fragmento de purotoxina-1(sin un codón de parada); nucleótidos 169-174: el sitio de restricción para la endonucleasa Sal I.

V D E L D I G G G G S G G G S G G G S G Y C A E K
 1 GTCGAC GAGCTC GATATC GGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGTTTCAGGTGGTGGTGGCAGT GGTTATTGTGCAGAAA 80
 Sal I SacI EcoRV

G I R C D D I H C C T G L K C K C N A S G Y N C V C
 81 AGGTATTGCGCTGTGATGATATTGTTGACCGGTCTGAAATGTAAATGTAATGCCAGCGGTTATAATTGCGTGTGCC 160

R K K V D (SEQ ID NO :12)
 161 GCAAAAAG GTCGAC 174 (SEQ ID NO :11)
 Sal I

Ejemplo 3: Inhibidores selectivos de derivados de BoNT de exocitosis para células que secretan los factores inflamatorios

La liberación de citoquinas y otros mediadores de la inflamación se asocia con varios tipos de dolor crónico. La liberación de muchos de estos mediadores implica la exocitosis dependiente de SNARE (Stow y col., NATURE REVIEWS Immunol. 6, 919-29, 2006). En otra realización de la presente invención, los agentes terapéuticos derivados de toxina clostridial pueden dirigirse a las células implicadas en la liberación de estos actores al unir TL que tienen una afinidad selectiva por dichas células, como los péptidos IL-1RA o antagonista de CGRP (véase más arriba), que se unen a sus receptores requeridos en la superficie de células no neuronales que secretan dolor y / o mediadores inflamatorios. Dichas células pueden ser neuronas o no neuronas.

Con este fin, se analizó una línea celular sinovial humana (hSC) para las especies de proteínas SNARE y se descubrió que contenía predominantemente SNAP-23, VAMP 3 y syntaxina 2, 3 y 4. Como se muestra en la Fig. 7, las SNARE SNAP-25, la syntaxina 1 y la VAMP 2 no se detectaron en un grado apreciable en las células hSC. De manera similar, en una línea celular de macrófagos RAW264.9 (mMC) se detectan SNAP-23, VAMP 3, syntaxina 2, syntaxina 3 y syntaxina 4.

Los tipos celulares adicionales analizados para las proteínas SNARE incluyeron neuronas de gránulos cerebelosos de rata (rCGN). Como se muestra en la Fig. 7, estos contenían SNAP-25, VAMP 2 y syntaxina 1.

Como se muestra en la Fig. 8A-8D, las células hSC se incubaron durante 7-10 días con lentivirus de shARN (ARN de horquilla corta) que transportan secuencias de nucleótidos dirigidas específicamente a la regulación negativa de la expresión de SNAP-23. Luego, las células se incubaron durante la noche con IL-1 β (100 ng/ml) en medio de cultivo para inducir secreción de TNF- α e IL-6. Después de recoger el sobrenadante, los lisados de estas células se sometieron a SDS-PAGE y las proteínas se detectaron por análisis de hibridación Western mediante anticuerpos dirigidos a SNAP-23, VAMP 3 o la proteína de control no dirigido β -tubulina. KD se refiere a "knock down" inducido por shARN o inhibición de expresión. Los resultados del gel (Fig. 8A y 8C) muestran que la expresión de SNAP-23 y VAMP 3 disminuye sustancialmente en las células tratadas con el shRNA en comparación con las células no tratadas (control). Además, en las Fig. 8B y 8D, los niveles de factor de necrosis tisular alfa (TNF- α) e interleuquina-6 (IL-6) cuantificados por ELISA en células tratadas con shRNA se comparan con los niveles en células no tratadas, y la reducción se expresa como porcentaje de inhibición relativa al control; la Fig. 8B también muestra el porcentaje de knock-down) de SNAP-23 y la Fig. 8D el porcentaje de knock-down de VAMP 3, en relación con las células no tratadas. Estas observaciones proporcionan evidencia de que se requieren VAMP 3 y SNAP-23 en la exocitosis de ambas citoquinas analizadas. Los niveles de SNAP-23 o VAMP 3 en células tratadas con shRNA en relación con una proteína de referencia interna (β -tubulina) se compararon con los de las células no tratadas y se expresó la reducción como porcentaje de KD en relación con el control.

Por lo tanto, como lo ilustran estos hallazgos, ciertas realizaciones de la presente invención implican composiciones y procedimientos para inhibir la liberación de citoquinas mediante un agente analgésico derivado de BoNT dirigido a estas células a través de un TL unido, tal como IL-1RA o un antagonista de CGRP; véase la Fig. 4.

Por ejemplo, la escisión de VAMP 3 en células que secretan factores inflamatorios puede lograrse ligando un segmento de ácido nucleico sintético preparado que codifica la proteasa LC/D de escisión de VAMP 3 en un constructo terapéutico como BoNT/D(H_{CC}), a un ácido nucleico sintético que codifica un polipéptido capaz de unirse

(IL-1RA) que tiene afinidad selectiva por el receptor de IL-1 humano (la secuencia completa se muestra en el presente documento como SEQ ID NO: 13 con la secuencia de aminoácidos traducida mostrada como SEQ ID NO: 14).

- 5 Como un TL alternativo para prevenir la secreción de factores inflamatorios de las células, el uso de un antagonista para el receptor 1 de CGRP proporciona un medio similar para dirigirse a las células no neuronales y las neuronas sensoriales. En el presente documento, se describe un ácido nucleico sintético que codifica una porción de unión de la secuencia codificante del antagonista de CGRP humano (CGRP₈₋₃₇); esta secuencia se muestra como SEQ ID NO: 15, y su secuencia de aminoácidos traducida se proporciona como SEQ ID NO: 16. El fragmento de ácido nucleico se fusionó mediante digestión con endonucleasas de restricción y ligación a BoNT/D(H_{CC}) para generar un gen de fusión, BoNT/D(-H_{CC}) -CGRP₈₋₃₇. La secuencia de la (SEQ ID NO: 17, y su secuencia de aminoácidos traducida se proporciona como SEQ ID NO: 18).

15 Estos dos ácidos nucleicos híbridos se clonan por separado en el vector de expresión pET29a(+) y se expresan en cepa de *E. coli* BL21(DE3). Una estrategia adicional o alternativa para inhibir la liberación de citoquinas puede depender de la inactivación de SNAP-23; en este enfoque, una fracción LC/E, capaz de escindir SNAP-23, puede unirse a BoNT/A-H_{CC}-IL-1RA o BoNT/X (PrR)-IL-1RA. Por ejemplo, el residuo mutante de Lys224 en la fracción LC/E a Asp aumentó significativamente su escisión de SNAP-23 humana (Chen y Barbieri, Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos, 106:9180-9184, 2009). Esta LC/E mutante puede unirse a BoNT/B (Lys¹¹⁹² → Glu y / o Ala¹¹⁹⁶ → Lys:PrR)-IL-1RA (véase el texto anterior sobre PrP). Estos constructos se pueden utilizar junto con agentes bioterapéuticos que tienen la capacidad de escindir otras proteínas SNARE para proporcionar un efecto terapéutico más fuerte. Además, como el receptor de IL-1 también reside en macrófagos que también poseen SNARE susceptibles a BoNT (véase la Fig. 7), se puede adoptar un enfoque similar al descrito anteriormente para la hSC para dirigirse a estas células.

25 Todos estos constructos comprenden híbridos BoNT/X-TL (o ácidos nucleicos que codifican dichos híbridos) que carecen de la región H_{CC} o que tienen una región H_{CC} inactiva. Los polipéptidos se construyen preferentemente para contener secuencias inter-catenarias de bucle corto que poseen un sitio de escisión selectivo y susceptible a la proteasa situado entre HC y LC de BoNT, de modo que las proteínas monocatenarias expresadas se pueden convertir *in vitro* en la forma di-catenaria activada según sea necesario .

30 En las siguientes secuencias de nucleótidos, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 17 y su respectiva secuencia de aminoácidos, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 18), los aminoácidos se identifican utilizando las designaciones de aminoácidos de una sola letra, con la secuencia de aminoácidos mostrada en la dirección del amino terminal al carboxi terminal y la secuencia de nucleótidos mostrada en la dirección 5' a 3'.

Secuencia génica de BoNT/D (H_{CC}) -humana IL-1RA y sus aminoácidos codificados (SEQ ID NO: 13 Y 14)

ES 2 694 425 T3

M T W P V K D F N Y S D P V N D N D I L Y L R I P Q N
 1 ATGACCTGGCCGGTGAAAGACTTTAACTATAGCGATCCGGTGAACGATAACGATATTCTGTATCTGCGTATCCCGCAGAA 80

 K L I T T P V K A F M I T Q N I W V I P E R F S S D
 81 CAAACTGATTACCCCGGTGAAAGCCTTCATGATTACCCAGAACATTTGGGTGATTCCGGAACGTTTTAGCAGCGATA 160

 T N P S L S K P P R P T S K Y Q S Y Y D P S Y L S T D
 161 CCAATCCGAGCCTGAGCAAACCGCCGCTCCGACCAGCAAATATCAGAGCTATTACGATCCGAGCTATCTGAGCACCGAT 240

 E Q K D T F L K G I I K L F K R I N E R D I G K K L I
 241 GAACAGAAAGATACCTTCCTGAAAGGCATCATCAAACGTGTTCAAACGCATTAACGAACGCGATAATGGCAAAAACCTGAT 320

 N Y L V V G S P F M G D S S T P E D T F D F T R H T
 321 CAACTATCTGGTGGTGGGCAGCCCGTTTTATGGGCGATAGCAGCACCCCGGAAGATACCTTTGATTTTACCCGTCATACCA 400

 T N I A V E K F E N G S W K V T N I I T P S V L I F G
 401 CGAACATTCGCGGTGGAAAAATTTGAAAACGGCAGCTGGAAGTGACCAACATTATTACCCCGAGCGTCTGATTTTTGGC 480

 P L P N I L D Y T A S L T L Q G Q Q S N P S F E G F G
 481 CCGCTGCCGAACATTTCTGGATTATACCCGCGAGCCTGACGCTGCAAGGCCAGCAGCAATCCGAGCTTTGAAGGCTTTGG 560

 T L S I L K V A P E F L L T F S D V T S N Q S S A V
 561 CACCCGTGAGCATTCTGAAAGTGGCGCCGGAATTTCTGCTGACCTTTAGCGATGTGACCAGCAACCAGAGCAGCGCGGTGC 640

 L G K S I F C M D P V I A L M H E L T H S L H Q L Y G
 641 TGGGCAAAAGCATTTTTGCATGGATCCGGTATTGCGCTGATGCATGAACTGACCCATAGCCTGCATCAGCTGTATGGC 720

 I N I P S D K R I R P Q V S E G F F S Q D G P N V Q F
 721 ATTAACATTCGAGCGATAAACGATTCCTCCGCGAGTGGCGAAGGCTTTTTAGCCAGGATGGCCCGAACCTGCAGTT 800

 E E L Y T F G G L D V E I I P Q I E R S Q L R E K A
 801 TGAAGAACTGTATAACCTTTGGCGGCTGGATGTGAAATTTATCCGAGATTGAACGTAGCCAGCTGCGTGA AAAAGCGC 880

 L G H Y K D I A K R L N N I N K T I P S S W I S N I D
 881 TGGGCCACTATAAAGATATTGCGAAACGCCTGAACAACATCAACAAAACCATTCGAGCAGCTGGATTAGCAACATCGAT 960

 K Y K K I F S E K Y N F D K D N T G N F V V N I D K F
 961 AAATACAAAAAATCTTCAGCGAAAAATATAACTTCGATAAAGATAACACCCGGCAACTTCGTGGTGAACATTGATAAATF 1040

 N S L Y S D L T N V M S E V V Y S S Q Y N V K N R T
 1041 CAACAGCCTGTATAGCGATCTGACCAACGTGATGAGCGAAGTGGTGTATAGCAGCCAGTATAACGTGAAAAACCGCACCC 1120

 H Y F S R H Y L P V F A N I L D D N I Y T I R D G F N
 1121 ATTATTCAGCCGTCATTATCTGCCGGTGTTCGGAATATTCTGGATGATAACATCTATACCATCCGTGATGGCTTTAAC 1200

 L T N K G F N I E N S G Q N I E R N P A L Q K L S S E
 1201 CTGACCAACAAAGGCTTTAACATTGAAAACAGCGGCCAGAACATTGAACGTAATCCGGCGCTGCAGAACTGTCTAGCGA 1280

Sitio de escisión de trombina

 S V V D L F T K V C L R L T L V P R G S T C I K V K

ES 2 694 425 T3

1281 AAGCGTGGTGGACCTGTTTACCAAAGTGTGCCTGCGCTGACCOCTGGTCCACGCGGTAGCACCTGCATCAAAGTAAAA 1360
 N N R L P Y V A D K D S I S Q E I F E N K I I T D E T
 1361 ACAACCGTCTGCCGTATGTGGCGGATAAAGATAGCATTAGCCAGGAAATCTTCGAAAACAAAATCATCACCGATGAAACC 1440
 N V Q N Y S D K F S L D E S I L D G Q V P I N P E I V
 1441 AACGTGCAGAACTACAGCGATAAAATTCAGCCTGGATGAAAGCATTCTGGATGGCCAGGTGCCGATTAATCCGAAAATTGT 1520
 D P L L P N V N M E P L N L P G E E I V F Y D D I T
 1521 GGATCCGCTGCTGCCGAACGTGAACATGGAACCGCTGAACCTGCCGGCCGAAGAAATTGTGTTCTATGATGATATTACCA 1600
 K Y V D Y L N S Y Y Y L E S Q K L S N N V E N I T L T
 1601 AATATGTGATTATCTGAACAGCTACTACTATCTGGAAGCCAGAAACTGAGCAACAACGTGAAAACATTACCCGTACC 1680
 T S V E E A L G Y S N K I Y T F L P S L A E K V N K G
 1681 ACCTCTGTGGAAGAAGCGCTGGGTATAGCAACAAAATCTACACCTTTCTGCCGAGCCTGGCCGAAAAAAGTGAACAAAAG 1760
 V Q A G L F L N W A N E V V E D F T T N I M K K D T
 1761 CGTGCAGCGGGCCCTGTTTCTGAACTGGGCGAAGCAAGTGGTGAAGATTTTACCACCAATATCATGAAAAAGATACCC 1840
 L D K I S D V S V I I P Y I G P A L N I G N S A L R G
 1841 TGGATAAAATCAGCGATGTGAGCGTGAATPATTCCGTATATGGTCCGGCGCTGAACATGGCAACAGCGCCCTGCGTGGC 1920
 N F N Q A F A T A G V A F L L E G F P E F T I P A L G
 1921 AACPTTAACAGGCGTTTCCGACCCGCGGTGTGGCGTTTCTGCTGGAAGGCTTTCCGGAATTCACCATTCCGGCGCTGG 2000
 V F T F Y S S I Q E R E K I I K T I E N C L E Q R V
 2001 CGTGTTTACCTTTTATAGCAGCATTGAGAACGCGAAAAATCATCAAAACCATCGAAAACCTGCCTGGAACAGCGTGTGA 2080
 K R W K D S Y Q W M V S N W L S R I T T Q F N H I N Y
 2081 AACGTTGGAAGATAGCTATCAGTGGATGGTGAGCAACTGGCTGTCTCGTATTACCACCCAGTTTAAACCATCAACTAT 2160
 Q M Y D S L S Y Q A D A I K A K I D L E Y K K Y S G S
 2161 CAGATGTATGACAGCCTGAGCTATCAGGGCGATGCGATTAAGCGAAAAATCGATCTGGAATACAAAAATACAGCGGCAG 2240
 D K E N I K S Q V E N L K N S L D V K I S E A M N N
 2241 CGATAAAGAAAACATCAAAAGCCAGGTGGAACACTGAAAACAGCCTGGATGTGAAAATTAGCGAAGCCATGAATAACA 2320
 I N K F I R E C S V T Y L F K N M L P K V I D E L N K
 2321 TCAACAAATTCATCCGTGAATGACGCGTGAACCTACCTGTTTAAAAACATGCTGCCGAAAGTGATTGATGAACCTGAACAAA 2400
 F D L R T K T E L I N L I D S H N I I L V G E V D R L
 2401 TTTGATCTGCCACCAAAAACCGAAGTGAATTAACCTGATCGATAGCCATAACATTATTCTGGTGGGCGAAGTGGATCGTCT 2480
 K A K V N E S F E N T M P F N I F S Y T N N S L L K
 2481 GAAAGCGAAGTGAACGAAAGCTTCGAAAACACCATGCCGTTTAAACATCTTCAGCTACACCAACAACAGCCTGCTGAAAG 2560
 D I I N E Y F N S I N D S K I L S L Q N K K N A L V D
 2561 ATATTATCAACGAATATTTTAAACAGCATCAACGATAGCAAAATCTGAGCCTGCAGAACAAAAAACCGCGCTGGTTGAT 2640
 T S G Y N A E V R V G D N V Q L N T I Y T N D F K L S
 2641 ACCAGCGCTATAACGCGGAAGTGGCTGPGGGCGATAACGTGACGCTGAACACCATTTATACCAACGATTTCAAACCTGAG 2720
 S S G D K I I V N L N N N I L Y S A I Y E N S S V S
 2721 CAGCAGCGCGGATAAAATTTATGTGAACCTGAATAACAACATTCTGTACAGCGGATTTATGAAAACAGCAGCGGTGAGCT 2800

ES 2 694 425 T3

```

2801  F W I K I S K D L T N S H N E Y T I I N S I E Q N S G
      TTTGGATCAAAATCAGCAAAGATCTGACCAACAGCCATAACGAATACACCATCATCAACAGCATTGAACAGAACAGCGGC 2880

2881  W K L C I R N G N I E W I L Q D V N R K Y K S L I F D
      TGGAAACTGTGCATTTCGTAACGGCAACATTGAATGGATTCTGCAGGATGTGAACCGCAAATATAAAAAGCCTGATCTTCGA 2960

2961  Y S E S L S H T G Y T N K W F F V T I T N N I M G Y
      TTATAGCGAAAAGCCTGAGCCATACCGGCTATACCAACAAATGGTTCTTTGTGACCATCACCAACAACATTATGGGCTATA 3040

3041  M K L Y I N G E L K Q S Q K I E D L D E V K L D K T I
      TGAAACTGTATATCAACGGCGAACTGAAACAGAGCCAGAAAATCGAAGATCTGGATGAAAGTGAACCTGGATAAAACCATC 3120

3121  V F G I D E N I D E N Q M L W I R D F N I F S K E L S
      GTGTTTGGCATCGATGAAAACATTGATGAAAACCAGATGCTGTGGATTTCGGATTTTAAACATCTTTAGCAAAGAAGCTGAG 3200

3201  N E D I N I V Y E G Q I E L G G G G S G G G G S R P
      CAACGAAGATATTAACATCGTGTACGAAGGCCAGATTGAGCTCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGTAGTCTGTCGGA 3280

3281  S G R K S S K M Q A F R I W D V N Q K T F Y L R N N Q
      GCGGTTCGTAAGCAGCAAATGCAGGCATTTTCGTATTTGGGATGTGAATCAGAAAACCTTTTATCTGCGCAACAATCAG 3360

3361  L V A G Y L Q G P N V N L E E K I D V V P I E P H A L
      CTGGTTGCAGGTTATCTGCGAGGGTCCGAATGTTAATCTGGAAGAAAAAATTGATGTGGTGCCGATTGAACCGCATGCACT 3440

3441  F L G I H G G K M C L S C V K S G D E T R L Q L E A
      GTTTCGGGTATTTCATGGTGGTAAAATGTGTCTGAGCTGTGTTAAAAGCGGTGATGAAACCCGCTGCGAGCTGGAAGCAG 3520

3521  V N I T D L S E N R K Q D K R F A F I R S D S G P T T
      TGAATATCACCGATCTGAGCGAAAATCGTAAACAGGATAAACGCTTTGCCTTATTCGTAGCGATAGCGGTCCGACCACC 3600

3601  S F E S A A C P G W F L C T A M E A D Q P V S L T N M
      AGTTTTGAAAGCGCAGCATGTCGGGTTGGTTTCTGTGTACCGCAATGGAAGCAGATCAGCCGGTTAGCCTGACCAATAT 3680

      Sitio de escisión de trombina
      ↓
3681  P D E G V M V T K F Y F Q E D E V D L V P R G S K L
      CCCGGATGAAGGTTTATGCTGACCAAAATTCATTTTCAGCAAGATGAAGTCCGACCTGTTGCCACCGCGGTAGCAAGCTTC 3760

3761  A A A L E H H H H H H H *
      CGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA 3795

```

La secuencia de nucleótidos sintética proporcionada anteriormente contiene las siguientes regiones, respectivamente (identificadas con respecto a los residuos de nucleótidos y los péptidos codificados en la misma),
5 residuos 1-3237: LC.H_N.H_{CN}/D; residuos 3274-3729 (subrayados), IL-1RA humano. Las secuencias de ADN entre estas áreas (por ejemplo, la secuencia que comprende los nucleótidos 3238-3273) se introducen como un enlazador entre el TL y el resto del constructo y aseguran el marco de lectura adecuado. Las secuencias de aminoácidos se muestran alineadas sobre los nucleótidos correspondientes. Se muestra una secuencia de reconocimiento de proteasa de trombina diseñada en el bucle entre LC/D y H_N/D; de manera similar, otro sitio de trombina fue diseñado
10 para tener una secuencia de escisión al sitio carboxi del gen IL-1RA humano para el corte y eliminación simultáneos de His₆ C-terminal (SEQ ID NO: 19); las flechas indican sitios de escisión.

Fragmento sintético de antagonista de CGRP (CGRP₈₋₃₇) y sus aminoácidos codificados (SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16)

15

ES 2 694 425 T3

481 CCGCTGCCGAACATTCTGGATTATAACCGGAGCCTGACGCTGCAAGGCCAGCAGAGCAATCCGAGCTTTGAAGGCTTTGG 560

T L S I L K V A P E F L L T F S D V T S N Q S S A V

561 CACCCCTGAGCATTCTGAAAAGTGGCGCCGGAATTTCTGTGTGACCTTTAGCGATGTGACCAGCAACCAGAGCAGCGCGGTGC 640

L G K S I F C M D P V I A L M H E L T H S L H Q L Y G

641 TGGGCAAAAAGCATTTTTTCATGGATCCGGTGTGGCGTGTGCATGAACTGACCCATAGCCTGCATCAGCTGTATGGC 720

I N I P S D K R I R P Q V S E G F F S Q D G P N V Q F

721 ATTAACATCCGAGCGATAAACGTATTCGTCGCCAGGTGAGCGAAGGCTTTTTTAGCCAGGATGGCCCGAACGTGCAGTT 800

E E L Y T F G G L D V E I I P Q I E R S Q L R E K A

801 TGAAGAAGTGTATAACCTTTGGCGGCCTGGATGTGAAAATTATTCGCGAGATTGAACGTAGCCAGCTGCGTGA AAAAGCGC 880

L G H Y K D I A K R L N N I N K T I P S S W I S N I D

881 TGGGCCACTATAAAGATATTGCGAAAACGCTGAACAACATCAACAAAACCATTCGAGCAGCTGGATTAGCAACATCGAT 960

K Y K K I F S E K Y N F D K D N T G N F V V N I D K F

961 AAATACAAAAAATCTTCAGCGAAAAATATAACTTCGATAAAGATAACACCGGCAACTTCGTGGTGAACATTGATAAATT 1040

N S L Y S D L T N V M S E V V Y S S Q Y N V K N R T

1041 CAACAGCCTGTATAGCGATCTGACCAACGTGATGAGCGAAGTGGTGTATAGCAGCCAGTATAACGTGAAAAACCGCACCC 1120

H Y F S R H Y L P V F A N I L D D N I Y T I R D G F N

1121 ATTATTTAGCCGTCATTATCTGCCGGTGTGGCGAATATCTGGATGATAACATCTATACCATCCGTGATGGCTTTAAC 1200

L T N K G F N I E N S G Q N I E R N P A L Q K L S S E

1201 CTGACCAACAAGGCTTTAACATTGAAAACAGCGCCAGAACATGAACGTAAATCCGCGCTGCAGAAAAGTGTCTAGCGA 1280

Sitio de escisión de trombina

↓

S V V D L F T K V C L R L T **L V P R G S** T C I K V K

1281 AAGCGTGGTGGACCTGTTTACCAAAAGTGCCTGCGTCTGACCTGGTGGCCAGCGGTAGCACCTGCATCAAAGTGA AAA 1360

N N R L P Y V A D K D S I S Q E I F E N K I I T D E T

1361 ACAACCGTCTGCCGTATGTGGCGGATAAAGATAGCATAGCCAGGAAATCTTCGAAAACAAAATCATCACCGATGAAACC 1440

N V Q N Y S D K F S L D E S I L D G Q V P I N P E I V

1441 AACGTGCAGAACTACAGCGATAAATTCAGCCTGGATGAAAGCATTCTGGATGGCCAGGTGCCGATTAATCCGGAAATGT 1520

D P L L P N V N M E P L N L P G E E I V F Y D D I T

1521 GGATCCGCTGCTGCCGAACGTGAACATGGAACCGCTGAACCTGCCGGCGAAGAATTTGTGTTCTATCATGATATTACCA 1600

K Y V D Y L N S Y Y Y L E S Q K L S N N V E N I T L T

1601 AATATGTGGATTATCTGAACAGCTACTACTATCTGAAAAGCCAGAAAAGTGGCAACAACGTGGAAAACATTACCCTGACC 1680

T S V E E A L G Y S N K I Y T F L P S L A E K V N K G

1681 ACCTCTGTGGAAGAAGCGCTGGGTTATAGCAACAAAATCTACACCTTTCTGCCGAGCCTGGCCGAAAAGTGAACAAAAG 1760

V Q A G L F L N W A N E V V E D F T T N I M K K D T

1761 CGTGCAGGCGGGCCTGTTTCTGAACTGGGCGAACGAAGTGGTGGAAAGATTTTACCACCAATATCATGAAAAAGATACCC 1840

L D K I S D V S V I I P Y I G P A L N I G N S A L R G

1841 TGGATAAATCAGCGATGTGAGCGTGTATTCCTGATATTTGGTCCGCGCTGAACATTGGCAACAGCGCCCTGCGTGGC 1920

N F N Q A F A T A G V A F L L E G F P E F T I P A L G

ES 2 694 425 T3

1921 AACTTTAACCAGCGCTTTGCGACCGCGGTTGGCGTTCCTGCTGGAAGGCTTCCGGAATTCACCATTCCGGCGCTGGG 2000
 V F T F Y S S I Q E R E K I I K T I E N C L E Q R V
 2001 CGTGTTTACCTTTTATAGCAGCATTTCAGGAACCGGAAAAATCATCAAAACCATCGAAAACCTGCCTGGAAACAGCGTGTGA 2080
 K R W K D S Y Q W M V S N W L S R I T T Q F N H I N Y
 2081 AACGTTGGAAAGATAGCTATCAGTGGATGGTGAGCAACTGGCTGTCTCGTATTACCACCCAGTTTAACCACATCAACTAT 2160
 Q M Y D S L S Y Q A D A I K A K I D L E Y K K Y S G S
 2161 CAGATGTATGACAGCCTGAGCTATCAGGCGGATGCGATTAAGCGAAAAATCGATCTGGAATACAAAAATACAGCGGCAG 2240
 D K E N I K S Q V E N L K N S L D V K I S E A M N N
 2241 CGATAAAGAAAAACATCAAAAGCCAGGTGAAAAACCTGAAAAACAGCCTGGATGTGAAAATTAGCGAAGCCATGAATAACA 2320
 I N K F I R E C S V T Y L F K N M L P K V I D E L N K
 2321 TCAACAATTCATCCGTGAATGCAGCGTGACCTACCTGTTTAAAAACATGCTGCCGAAAGTGATTGATGAACTGAACAAA 2400
 F D L R T K T E L I N L I D S H N I I L V G E V D R L
 2401 TTTGATCTGCGCACCAAAAACCGAACTGATTAACCTGATCGATAGCCATAACATTATCTGGTGGGCGAAGTGGATCGTCT 2480
 K A K V N E S F E N T M P F N I F S Y T N N S L L K
 2481 GAAAGCGAAAGTGAACGAAAGCTTCGAAAACACCATGCCGTTAACATCTTCAGCTACACCAACACAGCCTGCTGAAAG 2560
 D I I N E Y F N S I N D S K I L S L Q N K K N A L V D
 2561 ATATTATCAACGAATATTTTAAACAGCATCAACGATAGCAAAATTCCTGAGCCTGCAGAACAAAAAACGCGCTGGTTGAT 2640
 T S G Y N A E V R V G D N V Q L N T I Y T N D F K L S
 2641 ACCAGCGGCTATAACCGGAAGTGCCTGTGGCGGATAACGTCCAGCTGAACACCATTATACCAACGATTTCAAACCTGAG 2720
 S S G D K I I V N L N N N I L Y S A I Y E N S S V S
 2721 CAGCAGCGCGGATAAAAATTTGTGAACCTGAATAACAACATTCTGTACAGCGCGATTTATGAAAACAGCAGCGTGAAGT 2800
 F W I K I S K D L T N S H N E Y T I I N S I E Q N S G
 2801 TTTGGATCAAAATCAGCAAGATCTGACCAACAGCCATAACGAATACCCATCATCAACAGCATTGAACAGAACAGCGGC 2880
 W K L C I R N G N I E W I L Q D V N R K Y K S L I F D
 2881 TGGAAACTGTGCATTCTGTAACGGCAACATTGAATGGATTCTGCAGGATGTGAACCGCAAATATAAAAGCCTGATCTTCGA 2960
 Y S E S L S H T G Y T N K W F F V T I T N N I M G Y
 2961 TTATAGCGAAAGCCTGAGCCATACCGGCTATACCAACAAATGGTTCTTTGTGACCATCACCAACAACATTATGGGCTATA 3040
 M K L Y I N G E L K Q S Q K I E D L D E V K L D K T I
 3041 TGAACCTGTATATCAACCGCGAACCGAACAGAGCCAGAAAATCGAAGATCTGGATGAAGTGAACCTGGATAAAACCATC 3120
 V F G I D E N I D E N Q M L W I R D F N I F S K E L S
 3121 GTGTTTGGCATCGATGAAAACATTGATGAAAACAGATGCTGTGGATTCCGCGATTTTAAACATCTTTAGCAAAAGAACTGAG 3200
 N E D I N I V Y E G Q I D I G G G S G G G G S G G
 3201 CAACGAAGATATTAACATCGTGTACGAAGGCCAGATTGATATCGGTGCTGGTGGTAGCGTGGTGGCGGTTTCAGTGGTG 3280
 G G S V T H R L A G L L S R S G G V V K N N F V P T N
 3281 GTGGCAGCGTTACCATCGTCTGGCTGCTGCTCTCGTAGCGGTGGTGTGTGAAAAACAATTTTGGCCGACAAAT 3360
 V G S K A F *
 3361 GTGGTAGCAAAGCATTTTAA CTCGAG 3387

La secuencia de nucleótidos sintética proporcionada anteriormente contiene las siguientes regiones, respectivamente (identificadas con respecto a los residuos de nucleótidos - residuos 1-3237 LC.H_N.H_{CN}/D; residuos 3289-3381 (subrayados y en negrita), antagonista de CGRP (CGRP₈₋₃₇). La secuencia de ADN que comprende los nucleótidos (3238-3288) se introduce como un enlazador y garantiza el marco de lectura adecuado. Las secuencias de aminoácidos alineadas se muestran sobre los nucleótidos correspondientes. Una secuencia de reconocimiento de trombina está diseñada en la región de bucle intercatenaria entre LC/D y H_N/D; la flecha indica este sitio de escisión.

Se entenderá que todas y cada una de las secuencias de nucleótidos (incluidas las SEQ ID NO. 13 y 17) que codifican la secuencia de aminoácidos (incluidas las SEQ ID NO. 14 y 18) son y están destinadas a ser, específicamente e individualmente descritas como parte de esta solicitud de patente. Los expertos en la técnica entenderán también que los constructos de ácido nucleico específicos descritos en la Secuencia ID No. 13 y 17 y sus respectivas secuencias de aminoácidos codificadas en la Secuencia ID No. 14 y 18 de esta memoria descriptiva son ejemplares, y que las variaciones moderadamente modificadas de estas secuencias de nucleótidos y aminoácidos pueden realizarse sin apartarse del alcance de la invención descrita en el presente documento. Por lo tanto, un constructo de ácido nucleico que tiene 95 % o más o 90 % o más o 85 % o más o 80 % o más o 75 % o más o 70 % o más o 60 % o más de homología con, por ejemplo y sin limitación, SEQ ID NO: 13 y 17 que tienen la actividad terapéutica selectiva indicada en el presente documento pretenden estar dentro del marco de la presente invención. Además, todos los constructos de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria descriptiva están incluidas dentro del alcance de esta invención.

Asimismo, los expertos en la técnica entenderán que las secuencias de aminoácidos que tienen un 95 % o más o un 90 % o más o un 85 % o más o un 80 % o más o un 75 % o más o un 70 % o más o un 60 % o más de homología con las Secuencias ID. No. 14 y 18 están dentro del marco de esta realización de la invención.

También se entenderá que se pueden generar otros agentes bioterapéuticos analgésicos con una aplicación particularmente valiosa para el dolor crónico utilizando constructos génicos similares a los descritos anteriormente, que tienen una o más fracciones de TL que codifican fragmentos de variable monocatenaria basados en anticuerpos (scFVs) o Fabs que se unen a dominios expuestos a la membrana de antígenos. Dichos constructos pueden tener estas fracciones de TL, ya sea en lugar del antagonista de CGRP, fracciones de TL PT-1 o IL-1RA, tales como los descritos anteriormente o pueden insertarse además en dicho TL. Todos los ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas bioterapéuticas híbridas pueden expresarse en *E. coli*, células de mamíferos o de insectos (u otro par de células huésped / vector adecuado seleccionado y utilizado), y las proteínas recombinantes resultantes se purifican mediante cualquier medio adecuado, como la cromatografía por afinidad e intercambio iónico. Sus especificidades y potencias pueden luego evaluarse en varios modelos, como en neuronas cultivadas, modelos animales de dolor neuropático crónico (por ejemplo, lesión del nervio espinal) y dolor inflamatorio y en sistemas *in vitro*, incluidos, por ejemplo, los modelos y sistemas descritos en este documento.

Ejemplo 4: Tratamiento del dolor crónico mediante un derivado de neurotoxina clostridial de BoNT/D(H_{CC})-TL

Una mujer de 42 años presenta quejas por síndrome del intestino irritable crónico (SII). El clínico revela una distensión abdominal significativa y diarrea crónica frecuente, acompañada de dolor abdominal localizado, calificado por la paciente como un 8 en una escala de 1 a 10.

La paciente se inyecta directamente en los nervios sensoriales intestinales con una cantidad terapéutica del agente analgésico bioterapéutico BoNT/D(H_{CC})-TL, en el que el TL es PT-1.

Se observa a la paciente una semana más tarde, y el examen revela que el dolor agudo y crónico asociado con el SII se ha aliviado a una cantidad sustancial, desde una puntuación de dolor de "8" hasta una puntuación de dolor de "3" en una escala de 1 a 10.

La paciente vuelve a ser observada tres semanas después de la inyección y la actividad analgésica del agente bioterapéutico BoNT/D(H_{CC})-TL sigue siendo alta y la paciente informa una puntuación de dolor de "4" después de tres semanas.

Ejemplo 5: Tratamiento del dolor crónico asociado con el cáncer de esófago mediante un derivado de neurotoxina clostridial de TL BoNT/C1(-H_{CC})-(TRPV1 scFV)

Un hombre de 55 años con antecedentes de alcoholismo se presenta con cáncer de esófago en fase 3, náuseas,

dolor crónico severo en la garganta que se irradia a la base del cráneo y la incapacidad de tomar alimentos por vía oral.

Al paciente se le administran los scFvs derivados de la neurotoxina clostridial BoNT/C1(-H_{CC})-TRPV1 en una dosis efectiva mediante inyección directamente en el ganglio nodoso vagal y en el ganglio yugular. El constructo génico se realiza de manera similar a la descrita anteriormente para la construcción del constructo de BoNT/D(H_{CC})-CGRP₈₋₃₇, y se expresa en *E. coli*. El derivado de toxina clostridial se purifica por afinidad mediante el tag His₆ (SEQ ID NO: 19) y por cromatografía de intercambio iónico antes de su uso.

10 Dentro de las 48 horas, hay una mejora notable en la extensión y la agudeza del dolor y dentro de una semana el paciente puede tomar alimentación oral. El paciente vuelve a ser observado tres semanas después de la inyección y la actividad analgésica del agente bioterapéutico BoNT/C1(H_{CC})-(TRPV1 scFvs) sigue siendo alta y el paciente informa una puntuación de dolor de "4" después de tres semanas.

15 Aunque se han descrito aspectos de la presente invención con referencia a las realizaciones descritas, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los ejemplos específicos descritos son solo ilustrativos de estos aspectos y no limitan de ninguna manera la presente invención. Se pueden hacer varias modificaciones sin apartarse del marco de la presente invención.

20 **Ejemplo 6: Tratamiento del dolor crónico asociado con la artritis reumatoide mediante un derivado de neurotoxina clostridial BoNT/D^HCC-IL-1RA**

Una mujer de 42 años se presenta con dolor articular crónico severo en la cadera izquierda y tiene dificultad para caminar. Después del examen, la paciente es diagnosticada con artritis reumatoide de la articulación acetábulo femoral (cadera).

A la paciente se le administra el derivado de neurotoxina clostridial BONT/D^HCC-IL-1RA en una dosis efectiva mediante inyección directamente en el ganglio femoral y en el ganglio ciático. El constructo génico se realiza como se describe en el Ejemplo 3 y se expresa en *E. coli*. El derivado de toxina clostridial se purifica por afinidad mediante el tag His₆ (SEQ ID NO: 19) y por cromatografía de intercambio iónico antes de su uso.

Dentro de las 48 horas, hay una mejora notable en la extensión y la agudeza del dolor y dentro de una semana la paciente puede caminar.

35 Aunque se han descrito aspectos de la presente invención con referencia a las realizaciones descritas, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los ejemplos específicos descritos son solo ilustrativos de estos aspectos y no limitan de ninguna manera la presente invención.

También se describen en el presente documento las siguientes realizaciones enumeradas.

40

1) Una composición que comprende un derivado de neurotoxina clostridial, comprendiendo dicha composición:

a) un primer dominio activo de endopeptidasa derivado de toxina clostridial eficaz para escindir una proteína SNARE en condiciones fisiológicas;

45

b) un dominio de translocación derivado de toxina clostridial eficaz para facilitar el movimiento de dicho primer y segundo dominio de endopeptidasa a través de una membrana celular en el citosol en condiciones fisiológicas; y

c) un dominio de unión derivado de toxina no clostridial que comprende un primer ligando selectivo (TL) que se une selectivamente, en condiciones fisiológicas, a un primer receptor de superficie celular indicado por una célula diana seleccionada del grupo que consiste en una neurona sensorial y una célula que secreta al menos una citoquina inflamatoria, y sustancialmente no indicada por una neurona motora o autónoma; donde al menos una proteasa de cadena ligera de dicho derivado de neurotoxina clostridial es asimilada por dicha célula diana tras la unión de dicho TL a la célula diana, y donde el derivado de neurotoxina posee un dominio H_{CN} derivado de neurotoxina clostridial funcional y carece de una actividad del dominio selectivo H_{CC} derivado de neurotoxina clostridial funcional.

55

2) La composición de la realización 1, donde el derivado de neurotoxina carece de un dominio selectivo H_{CC} derivado de neurotoxina clostridial.

3) La composición de la reivindicación 1, donde el derivado de neurotoxina contiene un dominio H_{CC} derivado de neurotoxina clostridial mutado para impedir la unión del dominio H_{CC} a su receptor de proteína natural.

60

4) La composición de la realización 3, donde dicho dominio H_{CC} mutado comprende un residuo de ácido glutámico

- en una posición correspondiente al aminoácido 1192 de BoNT/B.
- 5) La composición de la realización 3, donde dicho dominio HCC mutado comprende un residuo de lisina en una posición correspondiente al aminoácido 1196 de BoNT/B.
- 6) La composición de la realización 5, donde dicho dominio H_{CC} mutado comprende también un residuo de ácido glutámico en una posición correspondiente al aminoácido 1192 de BoNT/B.
- 7) La composición de la realización 3, donde dicho dominio Hcc mutado se deriva de BoNT/B.
- 8) La composición de la realización 4, donde dicho dominio Hcc mutado se deriva de BoNT/B.
- 9) La composición de la realización 5, donde dicho dominio Hcc mutado se deriva de BoNT/B.
- 10) La composición de la realización 6, donde dicho dominio Hcc mutado se deriva de BoNT/B.
- 10 11) La composición de la realización 1, donde dicho derivado de neurotoxina comprende un segundo dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial que contiene una mutación que lo hace sustancialmente proteolíticamente inactivo.
- 12) La composición de la realización 1, donde dicho derivado de neurotoxina comprende un segundo dominio de endopeptidasa diferente derivado de toxina clostridial activo o inactivo.
- 15 13) La composición de acuerdo con la reivindicación 12, donde el segundo dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial se deriva de BoNT/A.
- 14) La composición de la realización 1, donde el primer dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial comprende una endopeptidasa derivada de BoNT/E.
- 15) La composición de la realización 1, donde el dominio de translocación derivado de toxina clostridial se deriva de un subtipo BoNT/X seleccionado del grupo que consiste en BoNT/A, BoNT/C1, BoNT/D y BoNT/E.
- 20 16) La composición de la realización 1, donde el dominio de translocación derivado de toxina clostridial se deriva de un subtipo BoNT/X seleccionado del grupo que consiste en BoNT/A, BoNT/C1, BoNT/D y BoNT/E.
- 17) La composición de la realización 1, donde el TL comprende un componente selectivo seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de CGRP, un anticuerpo selectivo de CGRP o específico de CGRP o un fragmento selectivo del mismo, un antagonista de TRPV1, un anticuerpo selectivo de TRPV1 o específico de TRPV1 o un fragmento del mismo, un agonista de interleuquina 1 o un antagonista del receptor de interleuquina 1, un anticuerpo selectivo del receptor de IL-1 o específico del receptor de IL-1 o un fragmento del mismo o un antagonista de P2X3 o un anticuerpo selectivo de P2X3 o específico de P2X3 o un fragmento del mismo.
- 25 18) La composición de la realización 17, donde el TL comprende un componente selectivo seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de CGRP, un anticuerpo selectivo de CGRP o específico de CGRP o un fragmento selectivo del mismo, un antagonista de TRPV1, un anticuerpo selectivo de TRPV1 o específico de TRPV1 o un fragmento del mismo, un agonista de interleuquina 1 o un antagonista del receptor de interleuquina 1, un anticuerpo selectivo del receptor de IL-1 o específico del receptor de IL-1 o un fragmento del mismo o un antagonista de P2X3 o un anticuerpo selectivo de P2X3 o específico de P2X3 o un fragmento del mismo.
- 30 19) La composición de la realización 1 que comprende un polipéptido que comprende un dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial activo que comprende una endopeptidasa derivada de BoNT/E, un dominio de translocación derivado de toxina clostridial que se deriva de BoNT/A y un dominio de TL.
- 20) La composición de la realización 17, donde el TL comprende un componente selectivo que comprende un antagonista de CGRP.
- 40 21) El derivado de neurotoxina de la realización 1 en el que dicho dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial comprende una endopeptidasa que tiene una vida media enzimática de 10 días o más cuando se inyecta en el músculo gastrocnemio de ratón en condiciones sustancialmente fisiológicas.
- 22) El derivado de neurotoxina de la realización 11, en el que dicho primer o segundo dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial comprende una endopeptidasa que tiene una vida media enzimática de 10 días o más cuando se inyecta en el músculo gastrocnemio de ratón en condiciones sustancialmente fisiológicas.
- 45 23) El derivado de neurotoxina de la realización 1, que comprende una cadena ligera de BoNT/D, un dominio de translocación de BoNT/D y un ligando selectivo que comprende CGRP₈₋₃₇ y que carece de un dominio H_{CC} funcional.
- 24) El derivado de neurotoxina de la realización 23, donde el derivado de neurotoxina contiene un dominio H_{CC} derivado de neurotoxina clostridial mutado para impedir la unión del dominio H_{CC} a su receptor de proteína natural.
- 50 25) El derivado de neurotoxina de la realización 23, que comprende BoNT/D(-H_{CC})-CGRP₈₋₃₇.
- 26) El derivado de neurotoxina de la realización 1, que comprende una cadena ligera de BoNT/D, un dominio de translocación de BoNT/D y un ligando selectivo que comprende IL-1RA humano y que carece de un dominio H_{CC} funcional.
- 27) El derivado de neurotoxina de la realización 26, donde el derivado de neurotoxina contiene un dominio H_{CC} derivado de neurotoxina clostridial mutado para impedir la unión del dominio H_{CC} a su receptor de proteína natural.
- 28) El derivado de neurotoxina de la realización 26, que comprende BoNT/D(H_{CC})-IL-1RA humano.
- 29) El derivado de neurotoxina de la realización 1, que comprende una cadena ligera de BoNT/A, un dominio de translocación de BoNT/A y un ligando selectivo que comprende un ligando de receptor purinérgico y que carece de un dominio H_{CC} funcional.
- 60

- 30) El derivado de neurotoxina de la realización 29, donde el ligando selectivo es un ligando del receptor P2X3.
- 31) El derivado de neurotoxina de la realización 30, donde el ligando selectivo comprende una purtoxina 1 o un fragmento de unión selectiva de la misma.
- 32) El derivado de neurotoxina de la realización 31, que comprende LC.H_N.H_{CN}/A-PT-1.
- 5 33) El derivado de neurotoxina de la realización 1, en el que el TL se une específicamente, en condiciones fisiológicas, a un primer receptor de superficie celular indicado por una neurona sensorial, con preferencia por las neuronas motoras o autónomas.
- 34) El derivado de neurotoxina de la realización 33 que comprende al menos dos dominios de TL.
- 35) El derivado de neurotoxina de la realización 1, donde el dominio de translocación de neurotoxina clostridial se
10 selecciona del grupo que consiste en
- a) un dominio de translocación BoNT-A;
b) un dominio de translocación BoNT-B;
c) un dominio de translocación BoNT-C1;
15 d) un dominio de translocación BoNT-D;
e) un dominio de translocación BoNT-E;
f) un dominio de translocación BoNT-F;
g) un dominio de translocación BoNT-G, y
h) variantes moderadamente modificadas e isoformas de cualquiera de los anteriores.
- 20 36) Un derivado de neurotoxina clostridial analgésico que comprende:
- a) un primer dominio activo de endopeptidasa derivado de toxina clostridial eficaz para escindir una proteína SNARE en condiciones fisiológicas y que tiene una vida media enzimática de 10 días o más cuando se inyecta
25 en un músculo gastrocnemio de ratón en condiciones sustancialmente fisiológicas;
b) un dominio de translocación derivado de toxina clostridial eficaz para facilitar el movimiento de dicho primer dominio de endopeptidasa a través de una membrana celular en el citosol en condiciones fisiológicas; y
c) un dominio de unión que comprende un primer ligando selectivo (TL) que se une selectivamente, en
30 condiciones fisiológicas, a un primer receptor de superficie celular indicado por un tipo de célula diana seleccionada del grupo que consiste en neuronas sensoriales y células secretoras de citoquina con preferencia por un tipo de célula no diana seleccionada del grupo que consiste en neuronas motoras y neuronas autónomas; donde dicho derivado de neurotoxina carece de un dominio H_{CC} de toxina clostridial funcional y donde una célula diana asimila al menos el dominio de endopeptidasa de dicho derivado de neurotoxina clostridial tras la unión de dicho TL a la célula diana.
- 35 37) El derivado de neurotoxina de la realización 36, donde el derivado de neurotoxina contiene un dominio H_{CC} derivado de neurotoxina clostridial mutado para impedir la unión del dominio H_{CC} a su receptor de proteína natural.
- 38) El derivado de neurotoxina de la realización 37 que comprende un dominio H_{CN} activo.
- 39) El derivado de neurotoxina de la realización 38, donde dicho primer dominio de endopeptidasa derivado de
40 toxina clostridial activo se deriva de un serotipo de toxina seleccionado del grupo que consiste en BoNT/A, BoNT/E, BoNT/C1 y BoNT/D.
- 40) El derivado de neurotoxina de la realización 38, donde el dominio de translocación de neurotoxina clostridial se
selecciona del grupo que consiste en
- 45 a) un dominio de translocación BoNT-A;
b) un dominio de translocación BoNT-B;
c) un dominio de translocación BoNT-C1;
d) un dominio de translocación BoNT-D;
e) un dominio de translocación BoNT-E;
50 f) un dominio de translocación BoNT-F;
g) un dominio de translocación BoNT-G, y
h) variantes moderadamente modificadas e isoformas de cualquiera de los anteriores.
- 41) El derivado de neurotoxina de la realización 38, en el que el dominio de endopeptidasa y el primer dominio de
55 endopeptidasa activo se derivan del mismo serotipo BoNT.
- 42) El derivado de neurotoxina de la realización 37, que comprende un segundo dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial activo o inactivo.
- 43) El derivado de neurotoxina de la realización 42 en el que el segundo dominio de endopeptidasa derivado de
60 toxina clostridial carece de actividad de proteasa endopeptidasa eficaz para escindir sustancialmente una población de proteínas SNARE en condiciones fisiológicas.

- 44) El derivado de neurotoxina de la realización 37, en el que el TL comprende un componente selectivo seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de CGRP, un anticuerpo selectivo de CGRP o específico de CGRP o un fragmento selectivo del mismo, un antagonista de TRPV1, un anticuerpo selectivo de TRPV1 o específico de TRPV1 o un fragmento del mismo, un agonista de interleuquina 1 o un antagonista del receptor de interleuquina 1, un anticuerpo selectivo del receptor de IL-1 o específico del receptor de IL-1 o un fragmento del mismo o un antagonista de P2X3 o un anticuerpo selectivo de P2X3 o específico de P2X3 o un fragmento del mismo y variantes e isoformas moderadamente modificadas de cualquiera de los anteriores.
- 5 45) El derivado de neurotoxina de la realización 37 que comprende al menos dos dominios de TL.
- 46) El derivado de neurotoxina de la realización 37, en el que dicho primer dominio de endopeptidasa y dicho dominio de translocación se derivan ambos de BoNT/D.
- 10 47) El derivado de neurotoxina de la realización 37, en el que dicho primer dominio de endopeptidasa y dicho dominio de translocación se derivan ambos de BoNT/A.
- 48) El derivado de neurotoxina de la realización 46, en el que el TL comprende un componente selectivo seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de CGRP, un anticuerpo selectivo de CGRP o específico de CGRP o un fragmento selectivo del mismo, un antagonista de TRPV1, un anticuerpo selectivo de TRPV1 o específico de TRPV1 o un fragmento del mismo, un agonista de interleuquina 1 o un antagonista del receptor de interleuquina 1, un anticuerpo selectivo del receptor de IL-1 o específico del receptor de IL-1 o un fragmento del mismo o un antagonista de P2X3 o un anticuerpo selectivo de P2X3 o específico de P2X3 o un fragmento del mismo y variantes e isoformas moderadamente modificadas de cualquiera de los anteriores.
- 15 49) El derivado de neurotoxina de la realización 47, en el que el TL comprende un componente selectivo seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de CGRP, un anticuerpo selectivo de CGRP o específico de CGRP o un fragmento selectivo del mismo, un antagonista de TRPV1, un anticuerpo selectivo de TRPV1 o específico de TRPV1 o un fragmento del mismo, un agonista de interleuquina 1 o un antagonista del receptor de interleuquina 1, un anticuerpo selectivo del receptor de IL-1 o específico del receptor de IL-1 o un fragmento del mismo o un antagonista de P2X3 o un anticuerpo selectivo de P2X3 o específico de P2X3 o un fragmento del mismo y variantes e isoformas moderadamente modificadas de cualquiera de los anteriores.
- 20 50) El derivado de neurotoxina de la realización 36, en el que dicho primer dominio de endopeptidasa y dicho dominio de translocación se derivan ambos de BoNT/C1.
- 51) El derivado de neurotoxina de la realización 50, en el que el TL comprende un componente selectivo seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de CGRP, un anticuerpo selectivo de CGRP o específico de CGRP o un fragmento selectivo del mismo, un antagonista de TRPV1, un anticuerpo selectivo de TRPV1 o específico de TRPV1 o un fragmento del mismo, un agonista de interleuquina 1 o un antagonista del receptor de interleuquina 1, un anticuerpo selectivo del receptor de IL-1 o específico del receptor de IL-1 o un fragmento del mismo o un antagonista de P2X3 o un anticuerpo selectivo de P2X3 o específico de P2X3 o un fragmento del mismo y variantes e isoformas moderadamente modificadas de cualquiera de los anteriores.
- 25 52) Un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende el derivado de neurotoxina clostridial de la realización 1.
- 53) Un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende el derivado de neurotoxina clostridial de la realización 36.
- 30 54) Una célula huésped seleccionada del grupo que consiste en una célula huésped bacteriana, levadura, una célula de mamífero y una célula de insecto, donde la célula huésped contiene un vector de ácido nucleico que comprende el ácido nucleico de la realización 52.
- 55) La célula huésped de la realización 52, donde la célula huésped es una célula de *E. coli*.
- 56) Un lisado despejado de células de *E. coli* que comprende el derivado de neurotoxina clostridial de la realización 1.
- 35 57) Una célula huésped seleccionada del grupo que consiste en una célula huésped bacteriana, levadura, una célula de mamífero y una célula de insecto, donde la célula huésped contiene un vector de ácido nucleico que comprende el ácido nucleico de la realización 53.
- 58) La célula huésped de la realización 53, donde la célula huésped es una célula de *E. coli*.
- 50 59) Un lisado despejado de células de *E. coli* que comprende el derivado de neurotoxina clostridial de la realización 36.
- 60) Un procedimiento para tratar a un paciente que necesita tratamiento para el dolor o profilaxis para el dolor, que comprende administrar a un paciente un derivado de neurotoxina clostridial de la realización 1.
- 61) El procedimiento de la realización 60 en el que dicha administración es por inyección.
- 55 62) El procedimiento de la realización 60, donde el dolor es un dolor crónico.
- 63) El procedimiento de la realización 62, donde dicho dolor crónico se selecciona del grupo que consiste en dolor nociceptivo inflamatorio y dolor neuropático.
- 64) El procedimiento de la realización 62, donde dicho dolor crónico es un dolor neuropático.
- 65) El procedimiento de la realización 64, donde dicho dolor neuropático se selecciona del grupo que consiste en dolor por cáncer, dolor postoperatorio, dolor neuropático, alodinia, neuralgia posherpética, síndrome del intestino
- 60

irritable y otros dolores viscerales, dolor óseo, neuropatía periférica, dolor asociado al sistema circulatorio y cefalea.

66) Un procedimiento para tratar a un paciente que necesita tratamiento para el dolor o profilaxis para el dolor, que comprende administrar a un paciente un derivado de neurotoxina clostridial de la realización 36.

67) El procedimiento de la realización 66 en el que dicha administración es por inyección.

5 68) El procedimiento de la realización 66, donde el dolor es un dolor crónico.

69) El procedimiento de la realización 68, donde dicho dolor crónico se selecciona del grupo que consiste en dolor nociceptivo inflamatorio y dolor neuropático.

70) El procedimiento de la realización 68, donde dicho dolor crónico es un dolor neuropático.

10 71) El procedimiento de la realización 70, donde dicho dolor neuropático se selecciona del grupo que consiste en dolor por cáncer, dolor postoperatorio, dolor neuropático, dolor por artritis, alodinia, neuralgia posherpética, síndrome del intestino irritable y otros dolores viscerales, dolor óseo, neuropatía periférica, dolor asociado al sistema circulatorio y cefalea.

LISTADO DE SECUENCIAS

15

<110> UNIVERSIDAD DE LA CIUDAD DE DUBLÍN

<120> BIOTERAPIA PARA EL DOLOR

20 <130> P105865PC00

<140>

<141>

25 <160> 21

<170> Patente versión 3.5

<210> 1

30 <211> 1296

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 1

35

ES 2 694 425 T3

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
 165 170 175

ES 2 694 425 T3

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

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg

ES 2 694 425 T3

			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 2 694 425 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
705 710 715 720

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

Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
740 745 750

Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
755 760 765

Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
770 775 780

Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
785 790 795 800

Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
805 810 815

Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
820 825 830

Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
835 840 845

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

Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
865 870 875 880

Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
885 890 895

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

Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu
915 920 925

ES 2 694 425 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
 1160 1165 1170

ES 2 694 425 T3

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> 2
 <211> 1291
 5 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum
 <400> 2

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 2 694 425 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
 325 330 335

ES 2 694 425 T3

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

ES 2 694 425 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 2 694 425 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> 3
<211> 1291
5 <212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<400> 3

ES 2 694 425 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

ES 2 694 425 T3

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
 500 505 510

ES 2 694 425 T3

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

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

ES 2 694 425 T3

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 2 694 425 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 2 694 425 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> 4

<211> 1276

5 <212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 4

ES 2 694 425 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 694 425 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 2 694 425 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
 675 680 685

ES 2 694 425 T3

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

Glu Asn Ser Ser Val Ser Phe Trp Ile Lys Ile Ser Lys Asp Leu Thr

ES 2 694 425 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> 5
- <211> 1252
- 5 <212> PRT
- <213> Clostridium botulinum
- <400> 5

ES 2 694 425 T3

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Leu Gly Asn Asp Asn Thr Pro Asp Asn Gln Phe His Ile Gly Asp

ES 2 694 425 T3

	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 2 694 425 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 2 694 425 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
 865 870 875 880

ES 2 694 425 T3

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

 Thr Ile Leu Leu Ala Asn Arg Leu Tyr Ser Gly Ile Lys Val Lys

ES 2 694 425 T3

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> 6
 <211> 1274
 5 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum

<400> 6

ES 2 694 425 T3

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
65 70 75 80

ES 2 694 425 T3

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
 Gln Trp Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asn Ala Asp Gly Ser Tyr Thr Val

ES 2 694 425 T3

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 2 694 425 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 2 694 425 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
1070 1075 1080

ES 2 694 425 T3

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> 7
 <211> 1297
 5 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum

<400> 7

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

10

ES 2 694 425 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
 260 265 270

ES 2 694 425 T3

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

Glu Pro Phe Thr Asn Phe Asp Asp Ile Asp Ile Pro Val Tyr Ile Lys

ES 2 694 425 T3

	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 2 694 425 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 2 694 425 T3

Ile Tyr Ile Asn Gly Ser Leu Lys Lys Ser Glu Lys Ile Leu Asn
1025 1030 1035

Leu Asp Arg Ile Asn Ser Ser Asn Asp Ile Asp Phe Lys Leu Ile
1040 1045 1050

Asn Cys Thr Asp Thr Thr Lys Phe Val Trp Ile Lys Asp Phe Asn
1055 1060 1065

Ile Phe Gly Arg Glu Leu Asn Ala Thr Glu Val Ser Ser Leu Tyr
1070 1075 1080

Trp Ile Gln Ser Ser Thr Asn Thr Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn
1085 1090 1095

Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Gln Tyr Tyr Leu Phe Asn Gln Gly Met
1100 1105 1110

Gln Asn Ile Tyr Ile Lys Tyr Phe Ser Lys Ala Ser Met Gly Glu
1115 1120 1125

Thr Ala Pro Arg Thr Asn Phe Asn Asn Ala Ala Ile Asn Tyr Gln
1130 1135 1140

Asn Leu Tyr Leu Gly Leu Arg Phe Ile Ile Lys Lys Ala Ser Asn
1145 1150 1155

Ser Arg Asn Ile Asn Asn Asp Asn Ile Val Arg Glu Gly Asp Tyr
1160 1165 1170

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

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

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

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

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

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

ES 2 694 425 T3

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> 8

<211> 1315

5 <212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 8

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 2 694 425 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
 225 230 235 240

Gly Leu Tyr Gly Met Gln Val Ser Ser His Glu Ile Ile Pro Ser Lys
 245 250 255

Gln Glu Ile Tyr Met Gln His Thr Tyr Pro Ile Ser Ala Glu Glu Leu
 260 265 270

Phe Thr Phe Gly Gly Gln Asp Ala Asn Leu Ile Ser Ile Asp Ile Lys
 275 280 285

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

Lys Leu Ser Gln Val Thr Ser Cys Asn Asp Pro Asn Ile Asp Ile Asp
 305 310 315 320

Ser Tyr Lys Gln Ile Tyr Gln Gln Lys Tyr Gln Phe Asp Lys Asp Ser
 325 330 335

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

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
 420 425 430

ES 2 694 425 T3

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
465 470 475 480

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
545 550 555 560

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
625 630 635 640

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

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

Leu Leu Glu Tyr Ile Pro Glu Ile Thr Leu Pro Val Ile Ala Ala Leu

ES 2 694 425 T3

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 2 694 425 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

ES 2 694 425 T3

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> 9

<211> 177

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(168)

15

<400> 9

ES 2 694 425 T3

```

gtc gac gag ctc gat atc ggt ggt ggt ggt agc ggt ggt ggc ggt tca      48
Val Asp Glu Leu Asp Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1           5           10           15

ggt ggt ggt ggc agt ggt tat tgt gca gaa aaa ggt att cgc tgt gat      96
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Tyr Cys Ala Glu Lys Gly Ile Arg Cys Asp
           20           25           30

gat att cat tgt tgc acc ggt ctg aaa tgt aaa tgt aat gcc agc ggt      144
Asp Ile His Cys Cys Thr Gly Leu Lys Cys Lys Cys Asn Ala Ser Gly
           35           40           45

tat aat tgc gtg tgc cgc aaa aag taactcgag      177
Tyr Asn Cys Val Cys Arg Lys Lys
           50           55

```

5
 <210> 10
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

15 <400> 10

```

Val Asp Glu Leu Asp Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1           5           10           15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Tyr Cys Ala Glu Lys Gly Ile Arg Cys Asp
           20           25           30

Asp Ile His Cys Cys Thr Gly Leu Lys Cys Lys Cys Asn Ala Ser Gly
           35           40           45

Tyr Asn Cys Val Cys Arg Lys Lys
           50           55

```

<210> 11
 20 <211> 174
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"
 <220>
 <221> CDS
 30 <222> (1)..(174)
 <400> 11

ES 2 694 425 T3

```

gtc gac gag ctc gat atc ggt ggt ggt ggt agc ggt ggt ggc ggt tca      48
Val Asp Glu Leu Asp Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1           5           10           15

ggt ggt ggt ggc agt ggt tat tgt gca gaa aaa ggt att cgc tgt gat      96
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Tyr Cys Ala Glu Lys Gly Ile Arg Cys Asp
          20           25           30

gat att cat tgt tgc acc ggt ctg aaa tgt aaa tgt aat gcc agc ggt      144
Asp Ile His Cys Cys Thr Gly Leu Lys Cys Lys Cys Asn Ala Ser Gly
          35           40           45

tat aat tgc gtg tgc cgc aaa aag gtc gac      174
Tyr Asn Cys Val Cys Arg Lys Lys Val Asp
          50           55

```

5

<210> 12

<211> 58

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

15

<400> 12

```

Val Asp Glu Leu Asp Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1           5           10           15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Tyr Cys Ala Glu Lys Gly Ile Arg Cys Asp
          20           25           30

Asp Ile His Cys Cys Thr Gly Leu Lys Cys Lys Cys Asn Ala Ser Gly
          35           40           45

Tyr Asn Cys Val Cys Arg Lys Lys Val Asp
          50           55

```

20 <210> 13

<211> 3795

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<220>

30 <221> CDS

<222> (1)..(3792)

ES 2 694 425 T3

```

<400> 13
atg acc tgg ccg gtg aaa gac ttt aac tat agc gat ccg gtg aac gat      48
Met Thr Trp Pro Val Lys Asp Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val Asn Asp
1          5          10          15

aac gat att ctg tat ctg cgt atc ccg cag aac aaa ctg att acc acc      96
Asn Asp Ile Leu Tyr Leu Arg Ile Pro Gln Asn Lys Leu Ile Thr Thr
20          25          30

ccg gtg aaa gcg ttc atg att acc cag aac att tgg gtg att ccg gaa      144
Pro Val Lys Ala Phe Met Ile Thr Gln Asn Ile Trp Val Ile Pro Glu
35          40          45

```

ES 2 694 425 T3

cgt ttt agc agc gat acc aat ccg agc ctg agc aaa ccg ccg cgt ccg Arg Phe Ser Ser Asp Thr Asn Pro Ser Leu Ser Lys Pro Pro Arg Pro 50 55 60	192
acc agc aaa tat cag agc tat tac gat ccg agc tat ctg agc acc gat Thr Ser Lys Tyr Gln Ser Tyr Tyr Asp Pro Ser Tyr Leu Ser Thr Asp 65 70 75 80	240
gaa cag aaa gat acc ttc ctg aaa ggc atc atc aaa ctg ttc aaa cgc Glu Gln Lys Asp Thr Phe Leu Lys Gly Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg 85 90 95	288
att aac gaa cgc gat att ggc aaa aaa ctg atc aac tat ctg gtg gtg Ile Asn Glu Arg Asp Ile Gly Lys Lys Leu Ile Asn Tyr Leu Val Val 100 105 110	336
ggc agc ccg ttt atg ggc gat agc agc acc ccg gaa gat acc ttt gat Gly Ser Pro Phe Met Gly Asp Ser Ser Thr Pro Glu Asp Thr Phe Asp 115 120 125	384
ttt acc cgt cat acc acg aac att gcg gtg gaa aaa ttt gaa aac ggc Phe Thr Arg His Thr Thr Asn Ile Ala Val Glu Lys Phe Glu Asn Gly 130 135 140	432
agc tgg aaa gtg acc aac att att acc ccg agc gtg ctg att ttt ggc Ser Trp Lys Val Thr Asn Ile Ile Thr Pro Ser Val Leu Ile Phe Gly 145 150 155 160	480
ccg ctg ccg aac att ctg gat tat acc gcg agc ctg acg ctg caa ggc Pro Leu Pro Asn Ile Leu Asp Tyr Thr Ala Ser Leu Thr Leu Gln Gly 165 170 175	528
cag cag agc aat ccg agc ttt gaa ggc ttt ggc acc ctg agc att ctg Gln Gln Ser Asn Pro Ser Phe Glu Gly Phe Gly Thr Leu Ser Ile Leu 180 185 190	576
aaa gtg gcg ccg gaa ttt ctg ctg acc ttt agc gat gtg acc agc aac Lys Val Ala Pro Glu Phe Leu Leu Thr Phe Ser Asp Val Thr Ser Asn 195 200 205	624
cag agc agc gcg gtg ctg ggc aaa agc att ttt tgc atg gat ccg gtg Gln Ser Ser Ala Val Leu Gly Lys Ser Ile Phe Cys Met Asp Pro Val 210 215 220	672
att gcg ctg atg cat gaa ctg acc cat agc ctg cat cag ctg tat ggc Ile Ala Leu Met His Glu Leu Thr His Ser Leu His Gln Leu Tyr Gly 225 230 235 240	720
att aac att ccg agc gat aaa cgt att cgt ccg cag gtg agc gaa ggc Ile Asn Ile Pro Ser Asp Lys Arg Ile Arg Pro Gln Val Ser Glu Gly 245 250 255	768
ttt ttt agc cag gat ggc ccg aac gtg cag ttt gaa gaa ctg tat acc Phe Phe Ser Gln Asp Gly Pro Asn Val Gln Phe Glu Glu Leu Tyr Thr 260 265 270	816
ttt ggc ggc ctg gat gtg gaa att att ccg cag att gaa cgt agc cag Phe Gly Gly Leu Asp Val Glu Ile Ile Pro Gln Ile Glu Arg Ser Gln 275 280 285	864
ctg cgt gaa aaa gcg ctg ggc cac tat aaa gat att gcg aaa cgc ctg Leu Arg Glu Lys Ala Leu Gly His Tyr Lys Asp Ile Ala Lys Arg Leu 290 295 300	912

ES 2 694 425 T3

aac aac atc aac aaa acc att ccg agc agc tgg att agc aac atc gat Asn Asn Ile Asn Lys Thr Ile Pro Ser Ser Trp Ile Ser Asn Ile Asp 305 310 315 320	960
aaa tac aaa aaa atc ttc agc gaa aaa tat aac ttc gat aaa gat aac Lys Tyr Lys Lys Ile Phe Ser Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Lys Asp Asn 325 330 335	1008
acc ggc aac ttc gtg gtg aac att gat aaa ttc aac agc ctg tat agc Thr Gly Asn Phe Val Val Asn Ile Asp Lys Phe Asn Ser Leu Tyr Ser 340 345 350	1056
gat ctg acc aac gtg atg agc gaa gtg gtg tat agc agc cag tat aac Asp Leu Thr Asn Val Met Ser Glu Val Val Tyr Ser Ser Gln Tyr Asn 355 360 365	1104
gtg aaa aac cgc acc cat tat ttc agc cgt cat tat ctg ccg gtg ttt Val Lys Asn Arg Thr His Tyr Phe Ser Arg His Tyr Leu Pro Val Phe 370 375 380	1152
gcg aat att ctg gat gat aac atc tat acc atc cgt gat ggc ttt aac Ala Asn Ile Leu Asp Asp Asn Ile Tyr Thr Ile Arg Asp Gly Phe Asn 385 390 395 400	1200
ctg acc aac aaa ggc ttt aac att gaa aac agc ggc cag aac att gaa Leu Thr Asn Lys Gly Phe Asn Ile Glu Asn Ser Gly Gln Asn Ile Glu 405 410 415	1248
cgt aat ccg gcg ctg cag aaa ctg tct agc gaa agc gtg gtg gac ctg Arg Asn Pro Ala Leu Gln Lys Leu Ser Ser Glu Ser Val Val Asp Leu 420 425 430	1296
ttt acc aaa gtg tgc ctg cgt ctg acc ctg gtg cca cgc ggt agc acc Phe Thr Lys Val Cys Leu Arg Leu Thr Leu Val Pro Arg Gly Ser Thr 435 440 445	1344
tgc atc aaa gtg aaa aac aac cgt ctg ccg tat gtg gcg gat aaa gat Cys Ile Lys Val Lys Asn Asn Arg Leu Pro Tyr Val Ala Asp Lys Asp 450 455 460	1392
agc att agc cag gaa atc ttc gaa aac aaa atc atc acc gat gaa acc Ser Ile Ser Gln Glu Ile Phe Glu Asn Lys Ile Ile Thr Asp Glu Thr 465 470 475 480	1440
aac gtg cag aac tac agc gat aaa ttc agc ctg gat gaa agc att ctg Asn Val Gln Asn Tyr Ser Asp Lys Phe Ser Leu Asp Glu Ser Ile Leu 485 490 495	1488
gat ggc cag gtg ccg att aat ccg gaa att gtg gat ccg ctg ctg ccg Asp Gly Gln Val Pro Ile Asn Pro Glu Ile Val Asp Pro Leu Leu Pro 500 505 510	1536
aac gtg aac atg gaa ccg ctg aac ctg ccg ggc gaa gaa att gtg ttc Asn Val Asn Met Glu Pro Leu Asn Leu Pro Gly Glu Glu Ile Val Phe 515 520 525	1584
tat gat gat att acc aaa tat gtg gat tat ctg aac agc tac tac tat Tyr Asp Asp Ile Thr Lys Tyr Val Asp Tyr Leu Asn Ser Tyr Tyr Tyr 530 535 540	1632
ctg gaa agc cag aaa ctg agc aac aac gtg gaa aac att acc ctg acc Leu Glu Ser Gln Lys Leu Ser Asn Asn Val Glu Asn Ile Thr Leu Thr	1680

ES 2 694 425 T3

545	550	555	560	
acc tct gtg gaa gaa gcg ctg ggt tat agc aac aaa atc tac acc ttt				1728
Thr Ser Val Glu Glu Ala Leu Gly Tyr Ser Asn Lys Ile Tyr Thr Phe	565	570	575	
ctg ccg agc ctg gcc gaa aaa gtg aac aaa ggc gtg cag gcg ggc ctg				1776
Leu Pro Ser Leu Ala Glu Lys Val Asn Lys Gly Val Gln Ala Gly Leu	580	585	590	
ttt ctg aac tgg gcg aac gaa gtg gtg gaa gat ttt acc acc aat atc				1824
Phe Leu Asn Trp Ala Asn Glu Val Val Glu Asp Phe Thr Thr Asn Ile	595	600	605	
atg aaa aaa gat acc ctg gat aaa atc agc gat gtg agc gtg att att				1872
Met Lys Lys Asp Thr Leu Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Val Ile Ile	610	615	620	
ccg tat att ggt ccg gcg ctg aac att ggc aac agc gcc ctg cgt ggc				1920
Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Ser Ala Leu Arg Gly	625	630	635	640
aac ttt aac cag gcg ttt gcg acc gcg ggt gtg gcg ttt ctg ctg gaa				1968
Asn Phe Asn Gln Ala Phe Ala Thr Ala Gly Val Ala Phe Leu Leu Glu	645	650	655	
ggc ttt ccg gaa ttc acc att ccg gcg ctg ggc gtg ttt acc ttt tat				2016
Gly Phe Pro Glu Phe Thr Ile Pro Ala Leu Gly Val Phe Thr Phe Tyr	660	665	670	
agc agc att cag gaa cgc gaa aaa atc atc aaa acc atc gaa aac tgc				2064
Ser Ser Ile Gln Glu Arg Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile Glu Asn Cys	675	680	685	
ctg gaa cag cgt gtg aaa cgt tgg aaa gat agc tat cag tgg atg gtg				2112
Leu Glu Gln Arg Val Lys Arg Trp Lys Asp Ser Tyr Gln Trp Met Val	690	695	700	
agc aac tgg ctg tct cgt att acc acc cag ttt aac cac atc aac tat				2160
Ser Asn Trp Leu Ser Arg Ile Thr Thr Gln Phe Asn His Ile Asn Tyr	705	710	715	720
cag atg tat gac agc ctg agc tat cag gcg gat gcg att aaa gcg aaa				2208
Gln Met Tyr Asp Ser Leu Ser Tyr Gln Ala Asp Ala Ile Lys Ala Lys	725	730	735	
atc gat ctg gaa tac aaa aaa tac agc ggc agc gat aaa gaa aac atc				2256
Ile Asp Leu Glu Tyr Lys Lys Tyr Ser Gly Ser Asp Lys Glu Asn Ile	740	745	750	
aaa agc cag gtg gaa aac ctg aaa aac agc ctg gat gtg aaa att agc				2304
Lys Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Asn Ser Leu Asp Val Lys Ile Ser	755	760	765	
gaa gcc atg aat aac atc aac aaa ttc atc cgt gaa tgc agc gtg acc				2352
Glu Ala Met Asn Asn Ile Asn Lys Phe Ile Arg Glu Cys Ser Val Thr	770	775	780	
tac ctg ttt aaa aac atg ctg ccg aaa gtg att gat gaa ctg aac aaa				2400
Tyr Leu Phe Lys Asn Met Leu Pro Lys Val Ile Asp Glu Leu Asn Lys	785	790	795	800
ttt gat ctg cgc acc aaa acc gaa ctg att aac ctg atc gat agc cat				2448

ES 2 694 425 T3

Phe	Asp	Leu	Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Leu	Ile	Asn	Leu	Ile	Asp	Ser	His	
				805					810					815		
aac	att	att	ctg	gtg	ggc	gaa	gtg	gat	cgt	ctg	aaa	gcg	aaa	gtg	aac	2496
Asn	Ile	Ile	Leu	Val	Gly	Glu	Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Ala	Lys	Val	Asn	
			820					825					830			
gaa	agc	ttc	gaa	aac	acc	atg	ccg	ttt	aac	atc	ttc	agc	tac	acc	aac	2544
Glu	Ser	Phe	Glu	Asn	Thr	Met	Pro	Phe	Asn	Ile	Phe	Ser	Tyr	Thr	Asn	
		835						840				845				
aac	agc	ctg	ctg	aaa	gat	att	atc	aac	gaa	tat	ttt	aac	agc	atc	aac	2592
Asn	Ser	Leu	Leu	Lys	Asp	Ile	Ile	Asn	Glu	Tyr	Phe	Asn	Ser	Ile	Asn	
	850					855					860					
gat	agc	aaa	att	ctg	agc	ctg	cag	aac	aaa	aaa	aac	gcg	ctg	gtt	gat	2640
Asp	Ser	Lys	Ile	Leu	Ser	Leu	Gln	Asn	Lys	Lys	Asn	Ala	Leu	Val	Asp	
865					870				875						880	
acc	agc	ggc	tat	aac	gcg	gaa	gtg	cgt	gtg	ggc	gat	aac	gtg	cag	ctg	2688
Thr	Ser	Gly	Tyr	Asn	Ala	Glu	Val	Arg	Val	Gly	Asp	Asn	Val	Gln	Leu	
				885					890					895		
aac	acc	att	tat	acc	aac	gat	ttc	aaa	ctg	agc	agc	agc	ggc	gat	aaa	2736
Asn	Thr	Ile	Tyr	Thr	Asn	Asp	Phe	Lys	Leu	Ser	Ser	Ser	Gly	Asp	Lys	
			900					905					910			
att	att	gtg	aac	ctg	aat	aac	aac	att	ctg	tac	agc	gcg	att	tat	gaa	2784
Ile	Ile	Val	Asn	Leu	Asn	Asn	Asn	Ile	Leu	Tyr	Ser	Ala	Ile	Tyr	Glu	
		915					920					925				
aac	agc	agc	gtg	agc	ttt	tgg	atc	aaa	atc	agc	aaa	gat	ctg	acc	aac	2832
Asn	Ser	Ser	Val	Ser	Phe	Trp	Ile	Lys	Ile	Ser	Lys	Asp	Leu	Thr	Asn	
	930					935					940					
agc	cat	aac	gaa	tac	acc	atc	atc	aac	agc	att	gaa	cag	aac	agc	ggc	2880
Ser	His	Asn	Glu	Tyr	Thr	Ile	Ile	Asn	Ser	Ile	Glu	Gln	Asn	Ser	Gly	
945					950				955						960	
tgg	aaa	ctg	tgc	att	cgt	aac	ggc	aac	att	gaa	tgg	att	ctg	cag	gat	2928
Trp	Lys	Leu	Cys	Ile	Arg	Asn	Gly	Asn	Ile	Glu	Trp	Ile	Leu	Gln	Asp	
				965					970					975		
gtg	aac	cgc	aaa	tat	aaa	agc	ctg	atc	ttc	gat	tat	agc	gaa	agc	ctg	2976
Val	Asn	Arg	Lys	Tyr	Lys	Ser	Leu	Ile	Phe	Asp	Tyr	Ser	Glu	Ser	Leu	
			980					985					990			
agc	cat	acc	ggc	tat	acc	aac	aaa	tgg	ttc	ttt	gtg	acc	atc	acc	aac	3024
Ser	His	Thr	Gly	Tyr	Thr	Asn	Lys	Trp	Phe	Phe	Val	Thr	Ile	Thr	Asn	
		995					1000					1005				
aac	att	atg	ggc	tat	atg	aaa	ctg	tat	atc	aac	ggc	gaa	ctg	aaa		3069
Asn	Ile	Met	Gly	Tyr	Met	Lys	Leu	Tyr	Ile	Asn	Gly	Glu	Leu	Lys		
	1010					1015					1020					
cag	agc	cag	aaa	atc	gaa	gat	ctg	gat	gaa	gtg	aaa	ctg	gat	aaa		3114
Gln	Ser	Gln	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu	Asp	Glu	Val	Lys	Leu	Asp	Lys		
	1025					1030					1035					
acc	atc	gtg	ttt	ggc	atc	gat	gaa	aac	att	gat	gaa	aac	cag	atg		3159
Thr	Ile	Val	Phe	Gly	Ile	Asp	Glu	Asn	Ile	Asp	Glu	Asn	Gln	Met		
	1040					1045					1050					

ES 2 694 425 T3

ctg tgg att cgc gat ttt aac atc ttt agc aaa gaa ctg agc aac Leu Trp Ile Arg Asp Phe Asn Ile Phe Ser Lys Glu Leu Ser Asn 1055 1060 1065	3204
gaa gat att aac atc gtg tac gaa ggc cag att gag ctc ggt ggt Glu Asp Ile Asn Ile Val Tyr Glu Gly Gln Ile Glu Leu Gly Gly 1070 1075 1080	3249
ggt ggt agc ggt ggt ggc ggt agt cgt ccg agc ggt cgt aaa agc Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser 1085 1090 1095	3294
agc aaa atg cag gca ttt cgt att tgg gat gtg aat cag aaa acc Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr 1100 1105 1110	3339
ttt tat ctg cgc aac aat cag ctg gtt gca ggt tat ctg cag ggt Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly 1115 1120 1125	3384
ccg aat gtt aat ctg gaa gaa aaa att gat gtg gtg ccg att gaa Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu 1130 1135 1140	3429
ccg cat gca ctg ttt ctg ggt att cat ggt ggt aaa atg tgt ctg Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu 1145 1150 1155	3474
agc tgt gtt aaa agc ggt gat gaa acc cgt ctg cag ctg gaa gca Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala 1160 1165 1170	3519
gtg aat atc acc gat ctg agc gaa aat cgt aaa cag gat aaa cgc Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg 1175 1180 1185	3564
ttt gcc ttt att cgt agc gat agc ggt ccg acc acc agt ttt gaa Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu 1190 1195 1200	3609
agc gca gca tgt ccg ggt tgg ttt ctg tgt acc gca atg gaa gca Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala 1205 1210 1215	3654
gat cag ccg gtt agc ctg acc aat atg ccg gat gaa ggt gtt atg Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met 1220 1225 1230	3699
gtg acc aaa ttc tat ttt cag gaa gat gaa gtc gac ctg gtg cca Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Val Asp Leu Val Pro 1235 1240 1245	3744
cgc ggt agc aag ctt gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac Arg Gly Ser Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His 1250 1255 1260	3789
cac tga His	3795

<210> 14
<211> 1264
<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

10

<400> 14

ES 2 694 425 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 694 425 T3

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

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

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

Ser Ile Ser Gln Glu Ile Phe Glu Asn Lys Ile Ile Thr Asp Glu Thr

ES 2 694 425 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Lys Lys Asn Ala Leu Val Asp
865 870 875 880

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

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

Ile Ile Val Asn Leu Asn Asn Asn Ile Leu Tyr Ser Ala Ile Tyr Glu
915 920 925

Asn Ser Ser Val Ser Phe Trp Ile Lys Ile Ser Lys Asp Leu Thr Asn
930 935 940

Ser His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Ser Ile Glu Gln Asn Ser Gly
945 950 955 960

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

ES 2 694 425 T3

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

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

Asn Ile Met Gly Tyr Met Lys Leu Tyr Ile Asn Gly Glu Leu Lys
1010 1015 1020

Gln Ser Gln Lys Ile Glu Asp Leu Asp Glu Val Lys Leu Asp Lys
1025 1030 1035

Thr Ile Val Phe Gly Ile Asp Glu Asn Ile Asp Glu Asn Gln Met
1040 1045 1050

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser
1085 1090 1095

Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr
1100 1105 1110

Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly
1115 1120 1125

Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu
1130 1135 1140

Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu
1145 1150 1155

Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala
1160 1165 1170

Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg
1175 1180 1185

Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu
1190 1195 1200

Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala
1205 1210 1215

ES 2 694 425 T3

Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met
1220 1225 1230

Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Val Asp Leu Val Pro
1235 1240 1245

Arg Gly Ser Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His
1250 1255 1260

His

<210> 15

<211> 156

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(147)

15

<400> 15

gag ctc gat atc ggt ggt ggt ggt agc ggt ggt ggc ggt tca ggt ggt 48
Glu Leu Asp Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

ggt ggc agc gtt acc cat cgt ctg gct ggt ctg ctg tct cgt agc ggt 96
Gly Gly Ser Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu Ser Arg Ser Gly
20 25 30

ggt gtt gtg aaa aac aat ttt gtg ccg aca aat gtt ggt agc aaa gca 144
Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser Lys Ala
35 40 45

ttt taactcgag 156
Phe

20 <210> 16

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 16

30

Glu Leu Asp Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

ES 2 694 425 T3

atg acc tgg ccg gtg aaa gac ttt aac tat agc gat ccg gtg aac gat	48
Met Thr Trp Pro Val Lys Asp Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val Asn Asp	
1 5 10 15	
aac gat att ctg tat ctg cgt atc ccg cag aac aaa ctg att acc acc	96
Asn Asp Ile Leu Tyr Leu Arg Ile Pro Gln Asn Lys Leu Ile Thr Thr	
20 25 30	
ccg gtg aaa gcg ttc atg att acc cag aac att tgg gtg att ccg gaa	144
Pro Val Lys Ala Phe Met Ile Thr Gln Asn Ile Trp Val Ile Pro Glu	
35 40 45	
cgt ttt agc agc gat acc aat ccg agc ctg agc aaa ccg ccg cgt ccg	192
Arg Phe Ser Ser Asp Thr Asn Pro Ser Leu Ser Lys Pro Pro Arg Pro	
50 55 60	
acc agc aaa tat cag agc tat tac gat ccg agc tat ctg agc acc gat	240
Thr Ser Lys Tyr Gln Ser Tyr Tyr Asp Pro Ser Tyr Leu Ser Thr Asp	
65 70 75 80	
gaa cag aaa gat acc ttc ctg aaa ggc atc atc aaa ctg ttc aaa cgc	288
Glu Gln Lys Asp Thr Phe Leu Lys Gly Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg	
85 90 95	
att aac gaa cgc gat att ggc aaa aaa ctg atc aac tat ctg gtg gtg	336
Ile Asn Glu Arg Asp Ile Gly Lys Lys Leu Ile Asn Tyr Leu Val Val	
100 105 110	
ggc agc ccg ttt atg ggc gat agc agc acc ccg gaa gat acc ttt gat	384
Gly Ser Pro Phe Met Gly Asp Ser Ser Thr Pro Glu Asp Thr Phe Asp	
115 120 125	

ES 2 694 425 T3

ttt acc cgt cat acc acg aac att gcg gtg gaa aaa ttt gaa aac ggc	432
Phe Thr Arg His Thr Thr Asn Ile Ala Val Glu Lys Phe Glu Asn Gly	
130 135 140	
agc tgg aaa gtg acc aac att att acc ccg agc gtg ctg att ttt ggc	480
Ser Trp Lys Val Thr Asn Ile Ile Thr Pro Ser Val Leu Ile Phe Gly	
145 150 155 160	
ccg ctg ccg aac att ctg gat tat acc gcg agc ctg acg ctg caa ggc	528
Pro Leu Pro Asn Ile Leu Asp Tyr Thr Ala Ser Leu Thr Leu Gln Gly	
165 170 175	
cag cag agc aat ccg agc ttt gaa ggc ttt ggc acc ctg agc att ctg	576
Gln Gln Ser Asn Pro Ser Phe Glu Gly Phe Gly Thr Leu Ser Ile Leu	
180 185 190	
aaa gtg gcg ccg gaa ttt ctg ctg acc ttt agc gat gtg acc agc aac	624
Lys Val Ala Pro Glu Phe Leu Leu Thr Phe Ser Asp Val Thr Ser Asn	
195 200 205	
cag agc agc gcg gtg ctg ggc aaa agc att ttt tgc atg gat ccg gtg	672
Gln Ser Ser Ala Val Leu Gly Lys Ser Ile Phe Cys Met Asp Pro Val	
210 215 220	
att gcg ctg atg cat gaa ctg acc cat agc ctg cat cag ctg tat ggc	720
Ile Ala Leu Met His Glu Leu Thr His Ser Leu His Gln Leu Tyr Gly	
225 230 235 240	
att aac att ccg agc gat aaa cgt att cgt ccg cag gtg agc gaa ggc	768
Ile Asn Ile Pro Ser Asp Lys Arg Ile Arg Pro Gln Val Ser Glu Gly	
245 250 255	
ttt ttt agc cag gat ggc ccg aac gtg cag ttt gaa gaa ctg tat acc	816
Phe Phe Ser Gln Asp Gly Pro Asn Val Gln Phe Glu Glu Leu Tyr Thr	
260 265 270	
ttt ggc ggc ctg gat gtg gaa att att ccg cag att gaa cgt agc cag	864
Phe Gly Gly Leu Asp Val Glu Ile Ile Pro Gln Ile Glu Arg Ser Gln	
275 280 285	
ctg cgt gaa aaa gcg ctg ggc cac tat aaa gat att gcg aaa cgc ctg	912
Leu Arg Glu Lys Ala Leu Gly His Tyr Lys Asp Ile Ala Lys Arg Leu	
290 295 300	
aac aac atc aac aaa acc att ccg agc agc tgg att agc aac atc gat	960
Asn Asn Ile Asn Lys Thr Ile Pro Ser Ser Trp Ile Ser Asn Ile Asp	
305 310 315 320	
aaa tac aaa aaa atc ttc agc gaa aaa tat aac ttc gat aaa gat aac	1008
Lys Tyr Lys Lys Ile Phe Ser Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Lys Asp Asn	
325 330 335	
acc ggc aac ttc gtg gtg aac att gat aaa ttc aac agc ctg tat agc	1056
Thr Gly Asn Phe Val Val Asn Ile Asp Lys Phe Asn Ser Leu Tyr Ser	
340 345 350	
gat ctg acc aac gtg atg agc gaa gtg gtg tat agc agc cag tat aac	1104
Asp Leu Thr Asn Val Met Ser Glu Val Val Tyr Ser Ser Gln Tyr Asn	
355 360 365	
gtg aaa aac cgc acc cat tat ttc agc cgt cat tat ctg ccg gtg ttt	1152
Val Lys Asn Arg Thr His Tyr Phe Ser Arg His Tyr Leu Pro Val Phe	
370 375 380	

ES 2 694 425 T3

gcg aat att ctg gat gat aac atc tat acc atc cgt gat ggc ttt aac	1200
Ala Asn Ile Leu Asp Asp Asn Ile Tyr Thr Ile Arg Asp Gly Phe Asn	
385	390
395	400
ctg acc aac aaa ggc ttt aac att gaa aac agc ggc cag aac att gaa	1248
Leu Thr Asn Lys Gly Phe Asn Ile Glu Asn Ser Gly Gln Asn Ile Glu	
405	410
415	
cgt aat ccg gcg ctg cag aaa ctg tct agc gaa agc gtg gtg gac ctg	1296
Arg Asn Pro Ala Leu Gln Lys Leu Ser Ser Glu Ser Val Val Asp Leu	
420	425
430	
ttt acc aaa gtg tgc ctg cgt ctg acc ctg gtg cca cgc ggt agc acc	1344
Phe Thr Lys Val Cys Leu Arg Leu Thr Leu Val Pro Arg Gly Ser Thr	
435	440
445	
tgc atc aaa gtg aaa aac aac cgt ctg ccg tat gtg gcg gat aaa gat	1392
Cys Ile Lys Val Lys Asn Asn Arg Leu Pro Tyr Val Ala Asp Lys Asp	
450	455
460	
agc att agc cag gaa atc ttc gaa aac aaa atc atc acc gat gaa acc	1440
Ser Ile Ser Gln Glu Ile Phe Glu Asn Lys Ile Ile Thr Asp Glu Thr	
465	470
475	480
aac gtg cag aac tac agc gat aaa ttc agc ctg gat gaa agc att ctg	1488
Asn Val Gln Asn Tyr Ser Asp Lys Phe Ser Leu Asp Glu Ser Ile Leu	
485	490
495	
gat ggc cag gtg ccg att aat ccg gaa att gtg gat ccg ctg ctg ccg	1536
Asp Gly Gln Val Pro Ile Asn Pro Glu Ile Val Asp Pro Leu Leu Pro	
500	505
510	
aac gtg aac atg gaa ccg ctg aac ctg ccg ggc gaa gaa att gtg ttc	1584
Asn Val Asn Met Glu Pro Leu Asn Leu Pro Gly Glu Glu Ile Val Phe	
515	520
525	
tat gat gat att acc aaa tat gtg gat tat ctg aac agc tac tac tat	1632
Tyr Asp Asp Ile Thr Lys Tyr Val Asp Tyr Leu Ser Tyr Tyr Tyr	
530	535
540	
ctg gaa agc cag aaa ctg agc aac aac gtg gaa aac att acc ctg acc	1680
Leu Glu Ser Gln Lys Leu Ser Asn Asn Val Glu Asn Ile Thr Leu Thr	
545	550
555	560
acc tct gtg gaa gaa gcg ctg ggt tat agc aac aaa atc tac acc ttt	1728
Thr Ser Val Glu Glu Ala Leu Gly Tyr Ser Asn Lys Ile Tyr Thr Phe	
565	570
575	
ctg ccg agc ctg gcc gaa aaa gtg aac aaa ggc gtg cag gcg ggc ctg	1776
Leu Pro Ser Leu Ala Glu Lys Val Asn Lys Gly Val Gln Ala Gly Leu	
580	585
590	
ttt ctg aac tgg gcg aac gaa gtg gtg gaa gat ttt acc acc aat atc	1824
Phe Leu Asn Trp Ala Asn Glu Val Val Glu Asp Phe Thr Thr Asn Ile	
595	600
605	
atg aaa aaa gat acc ctg gat aaa atc agc gat gtg agc gtg att att	1872
Met Lys Lys Asp Thr Leu Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Val Ile Ile	
610	615
620	
ccg tat att ggt ccg gcg ctg aac att ggc aac agc gcc ctg cgt ggc	1920
Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Ser Ala Leu Arg Gly	

ES 2 694 425 T3

625	630	635	640	
aac ttt aac cag gcg ttt gcg acc gcg ggt gtg gcg ttt ctg ctg gaa				1968
Asn Phe Asn Gln Ala Phe Ala Thr Ala Gly Val Ala Phe Leu Leu Glu	645	650	655	
ggc ttt ccg gaa ttc acc att ccg gcg ctg ggc gtg ttt acc ttt tat				2016
Gly Phe Pro Glu Phe Thr Ile Pro Ala Leu Gly Val Phe Thr Phe Tyr	660	665	670	
agc agc att cag gaa cgc gaa aaa atc atc aaa acc atc gaa aac tgc				2064
Ser Ser Ile Gln Glu Arg Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile Glu Asn Cys	675	680	685	
ctg gaa cag cgt gtg aaa cgt tgg aaa gat agc tat cag tgg atg gtg				2112
Leu Glu Gln Arg Val Lys Arg Trp Lys Asp Ser Tyr Gln Trp Met Val	690	695	700	
agc aac tgg ctg tct cgt att acc acc cag ttt aac cac atc aac tat				2160
Ser Asn Trp Leu Ser Arg Ile Thr Thr Gln Phe Asn His Ile Asn Tyr	705	710	715	720
cag atg tat gac agc ctg agc tat cag gcg gat gcg att aaa gcg aaa				2208
Gln Met Tyr Asp Ser Leu Ser Tyr Gln Ala Asp Ala Ile Lys Ala Lys	725	730	735	
atc gat ctg gaa tac aaa aaa tac agc ggc agc gat aaa gaa aac atc				2256
Ile Asp Leu Glu Tyr Lys Lys Tyr Ser Gly Ser Asp Lys Glu Asn Ile	740	745	750	
aaa agc cag gtg gaa aac ctg aaa aac agc ctg gat gtg aaa att agc				2304
Lys Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Asn Ser Leu Asp Val Lys Ile Ser	755	760	765	
gaa gcc atg aat aac atc aac aaa ttc atc cgt gaa tgc agc gtg acc				2352
Glu Ala Met Asn Asn Ile Asn Lys Phe Ile Arg Glu Cys Ser Val Thr	770	775	780	
tac ctg ttt aaa aac atg ctg ccg aaa gtg att gat gaa ctg aac aaa				2400
Tyr Leu Phe Lys Asn Met Leu Pro Lys Val Ile Asp Glu Leu Asn Lys	785	790	795	800
ttt gat ctg cgc acc aaa acc gaa ctg att aac ctg atc gat agc cat				2448
Phe Asp Leu Arg Thr Lys Thr Glu Leu Ile Asn Leu Ile Asp Ser His	805	810	815	
aac att att ctg gtg ggc gaa gtg gat cgt ctg aaa gcg aaa gtg aac				2496
Asn Ile Ile Leu Val Gly Glu Val Asp Arg Leu Lys Ala Lys Val Asn	820	825	830	
gaa agc ttc gaa aac acc atg ccg ttt aac atc ttc agc tac acc aac				2544
Glu Ser Phe Glu Asn Thr Met Pro Phe Asn Ile Phe Ser Tyr Thr Asn	835	840	845	
aac agc ctg ctg aaa gat att atc aac gaa tat ttt aac agc atc aac				2592
Asn Ser Leu Leu Lys Asp Ile Ile Asn Glu Tyr Phe Asn Ser Ile Asn	850	855	860	
gat agc aaa att ctg agc ctg cag aac aaa aaa aac gcg ctg gtt gat				2640
Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Lys Lys Asn Ala Leu Val Asp	865	870	875	880
acc agc ggc tat aac gcg gaa gtg cgt gtg ggc gat aac gtg cag ctg				2688

ES 2 694 425 T3

Thr Ser Gly Tyr	Asn Ala Glu Val Arg Val Gly Asp Asn Val Gln Leu	
	885	890 895
aac acc att tat	acc aac gat ttc aaa ctg agc agc agc ggc gat aaa	2736
Asn Thr Ile Tyr	Thr Asn Asp Phe Lys Leu Ser Ser Ser Gly Asp Lys	
	900	905 910
att att gtg aac ctg aat aac aac att ctg tac agc gcg att tat gaa		2784
Ile Ile Val Asn Leu Asn Asn Asn Ile Leu Tyr Ser Ala Ile Tyr Glu		
	915	920 925
aac agc agc gtg agc ttt tgg atc aaa atc agc aaa gat ctg acc aac		2832
Asn Ser Ser Val Ser Phe Trp Ile Lys Ile Ser Lys Asp Leu Thr Asn		
	930	935 940
agc cat aac gaa tac acc atc atc aac agc att gaa cag aac agc ggc		2880
Ser His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Ser Ile Glu Gln Asn Ser Gly		
	945	950 955 960
tgg aaa ctg tgc att cgt aac ggc aac att gaa tgg att ctg cag gat		2928
Trp Lys Leu Cys Ile Arg Asn Gly Asn Ile Glu Trp Ile Leu Gln Asp		
	965	970 975
gtg aac cgc aaa tat aaa agc ctg atc ttc gat tat agc gaa agc ctg		2976
Val Asn Arg Lys Tyr Lys Ser Leu Ile Phe Asp Tyr Ser Glu Ser Leu		
	980	985 990
agc cat acc ggc tat acc aac aaa tgg ttc ttt gtg acc atc acc aac		3024
Ser His Thr Gly Tyr Thr Asn Lys Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr Asn		
	995	1000 1005
aac att atg ggc tat atg aaa ctg tat atc aac ggc gaa ctg aaa		3069
Asn Ile Met Gly Tyr Met Lys Leu Tyr Ile Asn Gly Glu Leu Lys		
	1010	1015 1020
cag agc cag aaa atc gaa gat ctg gat gaa gtg aaa ctg gat aaa		3114
Gln Ser Gln Lys Ile Glu Asp Leu Asp Glu Val Lys Leu Asp Lys		
	1025	1030 1035
acc atc gtg ttt ggc atc gat gaa aac att gat gaa aac cag atg		3159
Thr Ile Val Phe Gly Ile Asp Glu Asn Ile Asp Glu Asn Gln Met		
	1040	1045 1050
ctg tgg att cgc gat ttt aac atc ttt agc aaa gaa ctg agc aac		3204
Leu Trp Ile Arg Asp Phe Asn Ile Phe Ser Lys Glu Leu Ser Asn		
	1055	1060 1065
gaa gat att aac atc gtg tac gaa ggc cag att gat atc ggt ggt		3249
Glu Asp Ile Asn Ile Val Tyr Glu Gly Gln Ile Asp Ile Gly Gly		
	1070	1075 1080
ggt ggt agc ggt ggt ggc ggt tca ggt ggt ggt ggc agc gtt acc		3294
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Thr		
	1085	1090 1095
cat cgt ctg gct ggt ctg ctg tct cgt agc ggt ggt gtt gtg aaa		3339
His Arg Leu Ala Gly Leu Leu Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys		
	1100	1105 1110
aac aat ttt gtg ccg aca aat gtt ggt agc aaa gca ttt taactcgag		3387
Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser Lys Ala Phe		
	1115	1120 1125

<210> 18
<211> 1126
<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

10

<400> 18

ES 2 694 425 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 694 425 T3

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

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

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

ES 2 694 425 T3

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

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

Asp Gly Gln Val Pro Ile Asn Pro Glu Ile Val Asp Pro Leu Leu Pro
500 505 510

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Trp Leu Ser Arg Ile Thr Thr Gln Phe Asn His Ile Asn Tyr

ES 2 694 425 T3

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

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

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

Asn Ile Met Gly Tyr Met Lys Leu Tyr Ile Asn Gly Glu Leu Lys
 1010 1015 1020

Gln Ser Gln Lys Ile Glu Asp Leu Asp Glu Val Lys Leu Asp Lys
 1025 1030 1035

Thr Ile Val Phe Gly Ile Asp Glu Asn Ile Asp Glu Asn Gln Met
 1040 1045 1050

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

Glu Asp Ile Asn Ile Val Tyr Glu Gly Gln Ile Asp Ile Gly Gly
 1070 1075 1080

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Thr
 1085 1090 1095

His Arg Leu Ala Gly Leu Leu Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys
 1100 1105 1110

Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser Lys Ala Phe
 1115 1120 1125

<210> 19

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: tag 6xHis sintético"

<400> 19

His His His His His His

1 5

15

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

5

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

10 <210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 21

20

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un derivado de neurotoxina clostridial, comprendiendo dicha composición:
- 5 a) un primer dominio activo de endopeptidasa derivado de toxina clostridial que escinde una proteína SNARE en condiciones fisiológicas;
- b) un dominio de translocación derivado de toxina clostridial que facilita el movimiento de dicho primer dominio de endopeptidasa a través de una membrana celular en el citosol en condiciones fisiológicas;
- 10 c) un dominio de unión derivado de toxina no clostridial que comprende un primer ligando selectivo (TL) que se une selectivamente, en condiciones fisiológicas, a un primer receptor de superficie celular indicado por una célula diana, siendo seleccionada dicha célula diana del grupo que consiste en
- i) una neurona sensorial, y
- 15 ii) una célula que secreta al menos una citoquina inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en un macrófago, un sinoviocito y un mastocito, estando dicho receptor de superficie celular sustancialmente ausente de las neuronas motoras o autónomas;
- d) un dominio H_{CN} funcional derivado de toxina clostridial; y
- 20 donde dicha proteasa de cadena ligera de dicho derivado de neurotoxina clostridial es asimilada por dicha célula diana tras la unión de dicho TL a la célula diana, y donde un dominio selectivo H_{CC} está ausente o está mutado para impedir la unión del dominio H_{CC} a su receptor de proteína natural.
- 25 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho dominio selectivo H_{CC} está presente como un dominio H_{CC} mutado e inactivo.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho dominio selectivo H_{CC} está mutado para comprender uno o ambos de: un residuo de ácido glutámico en una posición correspondiente al aminoácido
- 30 1192 de BoNT/B y un residuo de lisina en una posición correspondiente al aminoácido 1196 de BoNT/B.
4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, donde dicho dominio H_{CC} mutado se deriva de BoNT/B.
- 35 5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho derivado de neurotoxina comprende un segundo dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial.
6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho segundo dominio de endopeptidasa está proteolíticamente activo o donde dicho segundo dominio de endopeptidasa está
- 40 sustancialmente proteolíticamente inactivo.
7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde cada uno del primer dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial y el dominio de translocación se deriva individualmente de un subtipo BoNT/X seleccionado del grupo que consiste en BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1,
- 45 BoNT/D, BoNT/E, BoNT/G y BoNT/F.
8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el TL comprende un componente selectivo seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de CGRP, un anticuerpo selectivo receptor de CGRP o específico receptor de CGRP o un fragmento selectivo del mismo o un
- 50 agonista de interleuquina 1 o un antagonista de receptor de interleuquina 1, un anticuerpo selectivo de receptor IL-1 o específico de receptor IL-1 o un fragmento del mismo y variantes e isoformas moderadamente modificadas de cualquiera de los anteriores.
9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende BoNT/D
- 55 (H_{CC})-CGRP₈₋₃₇.
10. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende BoNT/D (H_{CC})-IL-1 RA humano.
- 60 11. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende

LC.HN.HCN/A-PT-1.

12. Un derivado de neurotoxina clostridial analgésico que comprende:

- 5 a) un primer dominio activo de endopeptidasa derivado de toxina clostridial que escinde una proteína SNARE en condiciones fisiológicas y que tiene una vida media enzimática de 10 días o más cuando se inyecta en un músculo gastrocnemio de ratón en condiciones sustancialmente fisiológicas;
- b) un dominio de translocación derivado de toxina clostridial que facilita el movimiento de dicho primer dominio de endopeptidasa a través de una membrana celular en el citosol en condiciones fisiológicas;
- 10 d) un dominio H_{CN} funcional derivado de toxina clostridial; y
- c) un dominio de unión que comprende un primer ligando selectivo (TL) que se une selectivamente, en condiciones fisiológicas, a un primer receptor de superficie celular indicado por un tipo de célula diana seleccionada del grupo que consiste en:
- 15 i) neuronas sensoriales, y
- ii) células secretoras de citoquinas seleccionadas del grupo que consiste en un macrófago, un sinoviocito y un mastocito

con preferencia por un tipo de célula no diana seleccionada del grupo que consiste en neuronas motoras y neuronas autónomas;

donde dicho derivado de neurotoxina carece de un dominio H_{CC} funcional de toxina clostridial y

donde una célula diana asimila dicho primer dominio de endopeptidasa de dicho derivado de neurotoxina clostridial tras la unión de dicho TL a la célula diana.

13. El derivado de neurotoxina de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende un segundo dominio de endopeptidasa derivado de toxina clostridial.

14. El derivado de neurotoxina de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicha célula diana es una célula que secreta al menos una citoquina inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en un macrófago, un sinoviocito y un mastocito.

15. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, 13 o 14, donde el derivado de neurotoxina contiene un dominio H_{CC} derivado de neurotoxina clostridial mutado para impedir la unión del dominio H_{CC} a su receptor de proteína natural.

16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicho dominio selectivo H_{CC} está mutado para comprender uno o ambos de: un residuo de ácido glutámico en una posición correspondiente al aminoácido 1192 de BoNT/B y un residuo de lisina en una posición correspondiente al aminoácido 1196 de BoNT/B.

17. El derivado de neurotoxina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el TL comprende un componente selectivo seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de CGRP, un anticuerpo selectivo receptor de CGRP o específico receptor de CGRP o un fragmento selectivo del mismo o un agonista de interleuquina 1 o un antagonista de receptor de interleuquina 1, un anticuerpo selectivo de receptor IL-1 o específico de receptor IL-1 o un fragmento del mismo y variantes e isoformas moderadamente modificadas de cualquiera de los anteriores.

18. El derivado de neurotoxina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que dicho primer dominio de endopeptidasa y dicho dominio de translocación se derivan ambos de BoNT/D; o en el que dicho primer dominio de endopeptidasa y dicho dominio de translocación se derivan ambos de BoNT/A; o en el que dicho primer dominio de endopeptidasa y dicho dominio de translocación se derivan ambos de BoNT/C1.

19. Un compuesto o composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para su uso en el tratamiento del dolor crónico, donde dicho dolor crónico se selecciona del grupo que consiste en dolor por cáncer, dolor postoperatorio, dolor neuropático, alodinia, neuralgia posherpética, síndrome del intestino irritable y otros dolores viscerales, dolor por artritis, dolor óseo, neuropatía periférica, dolor asociado al sistema circulatorio y cefalea.

20. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 19 para el tratamiento de la artritis.

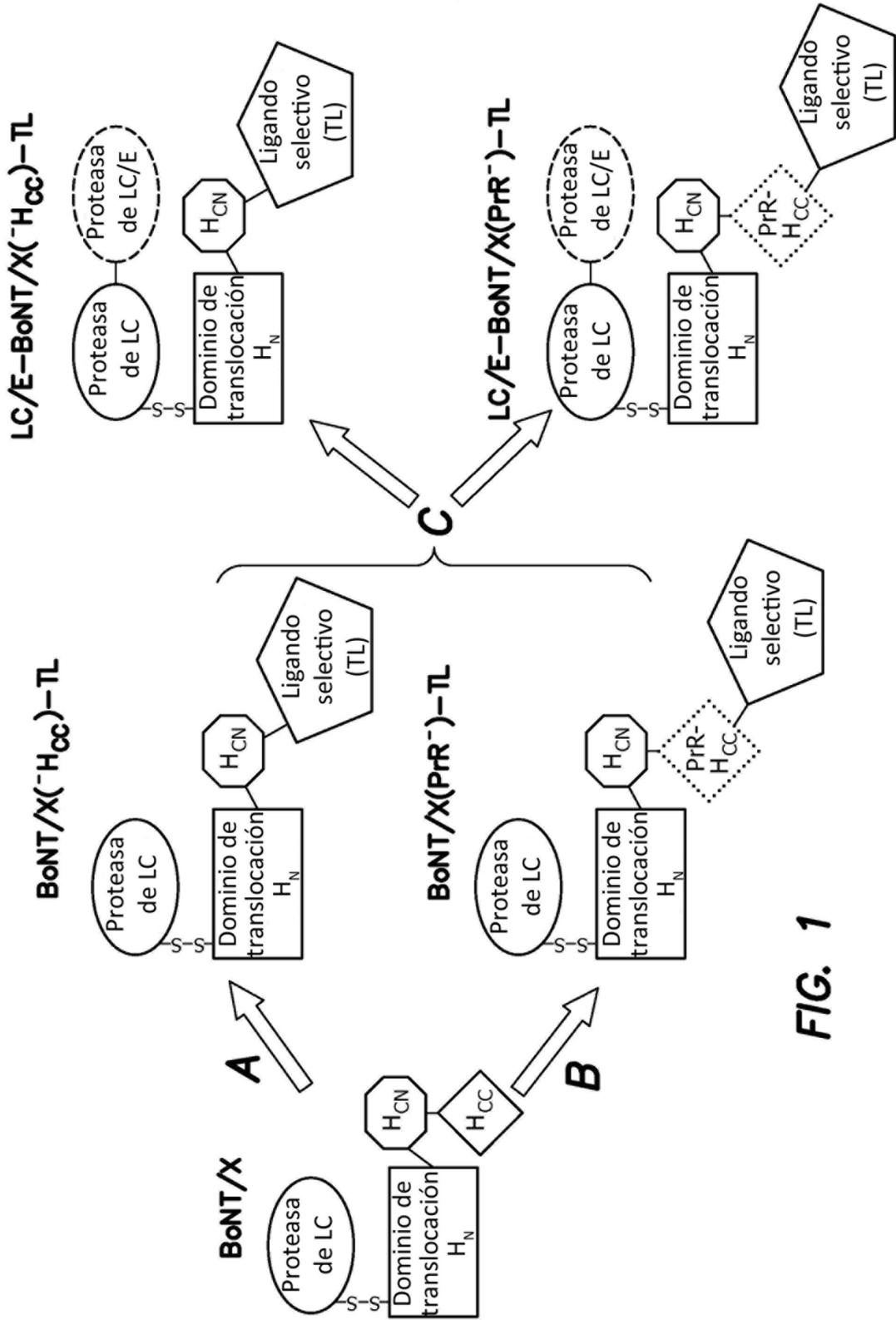


FIG. 1

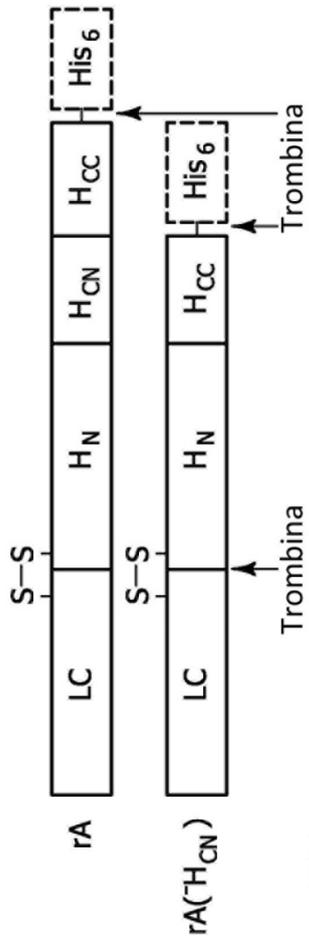


FIG. 2A

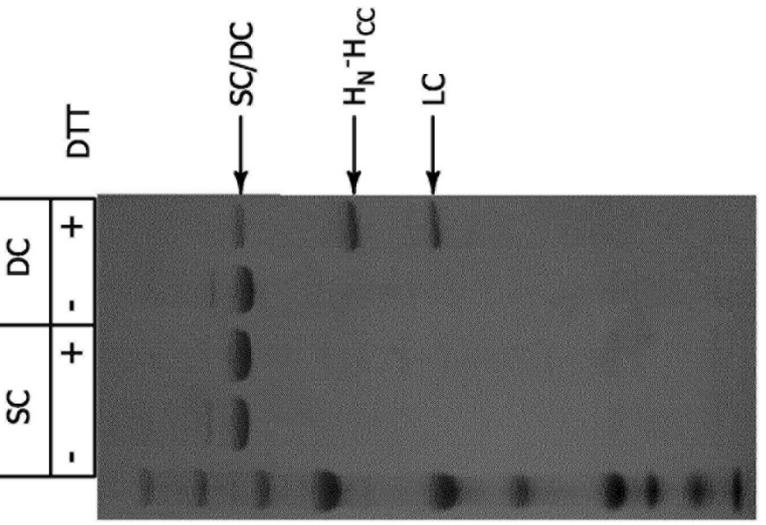


FIG. 2C

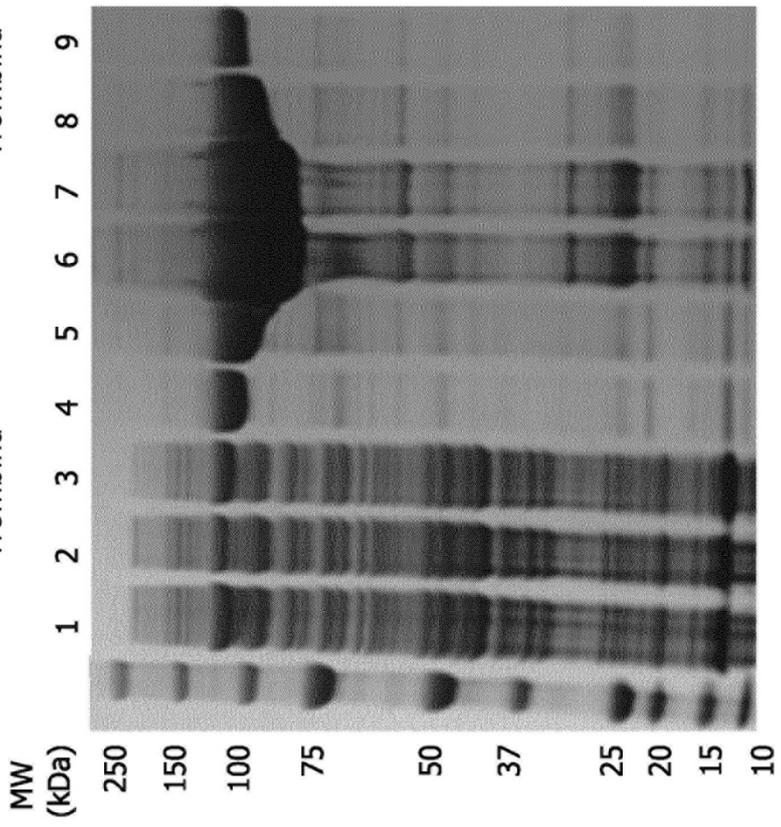
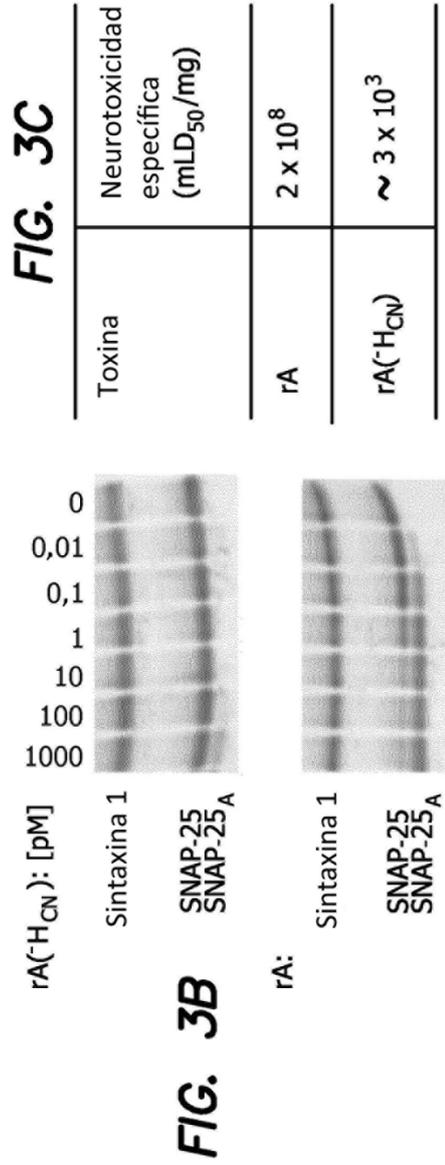
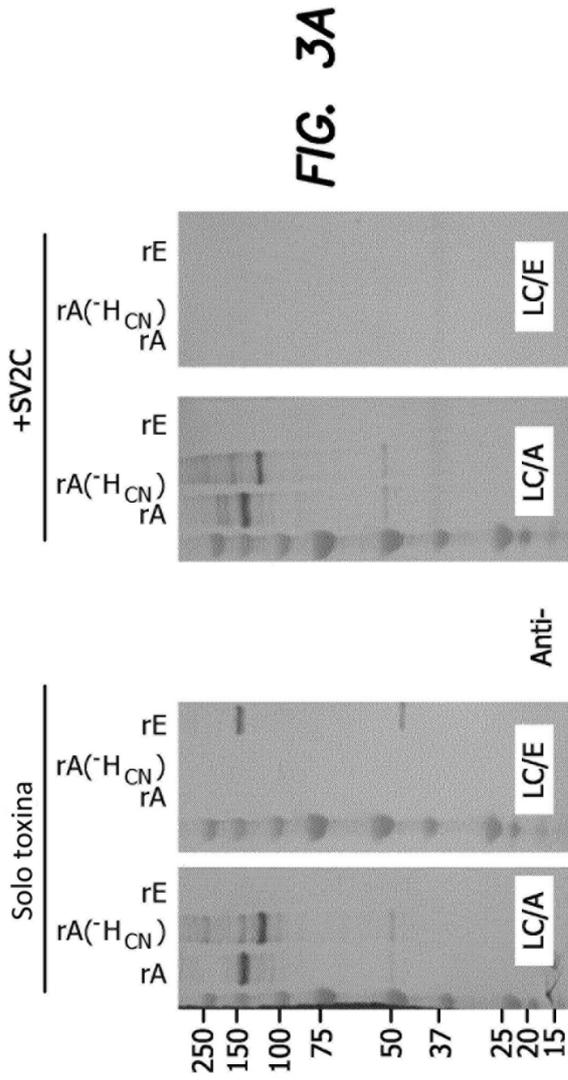


FIG. 2B



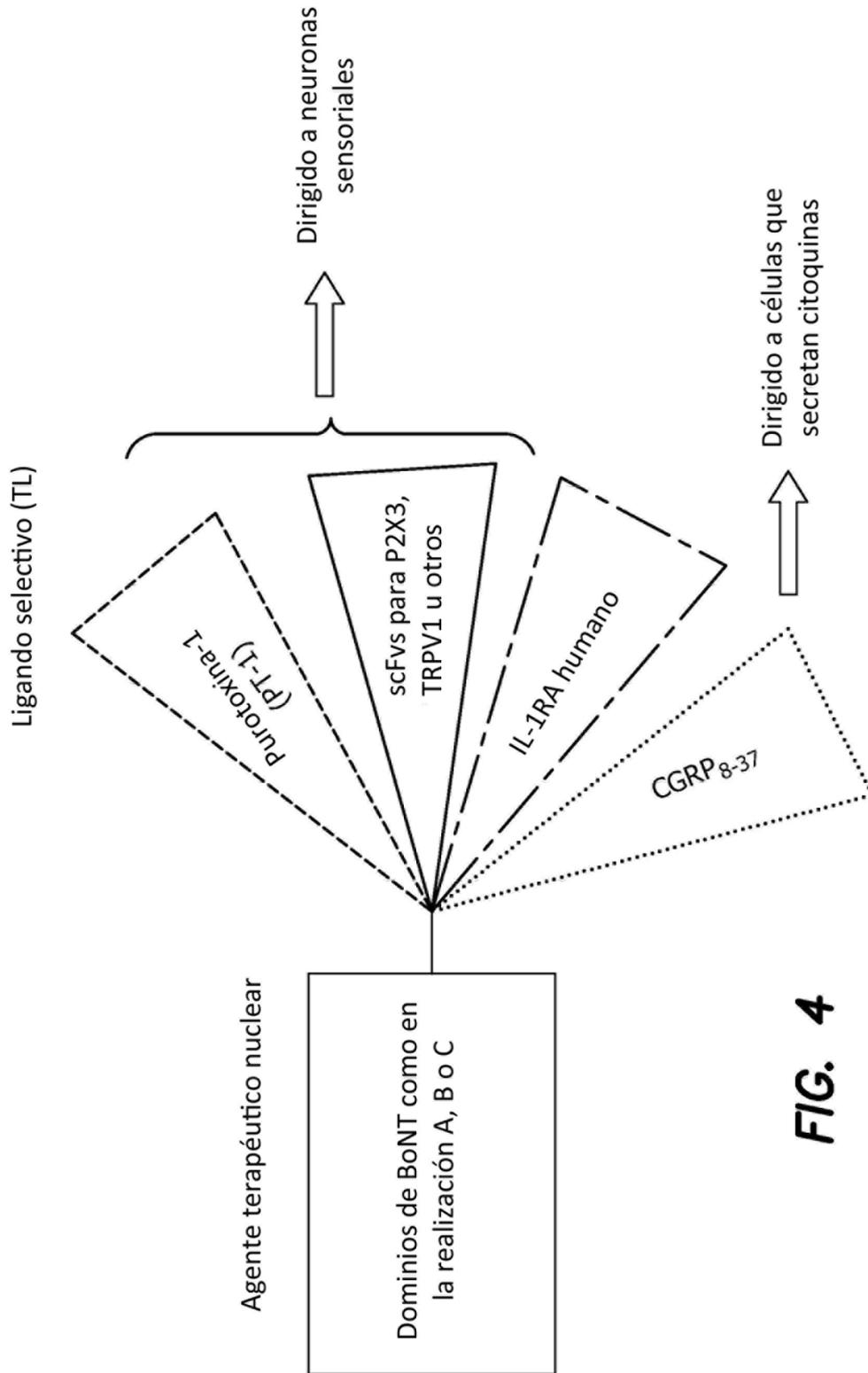


FIG. 4

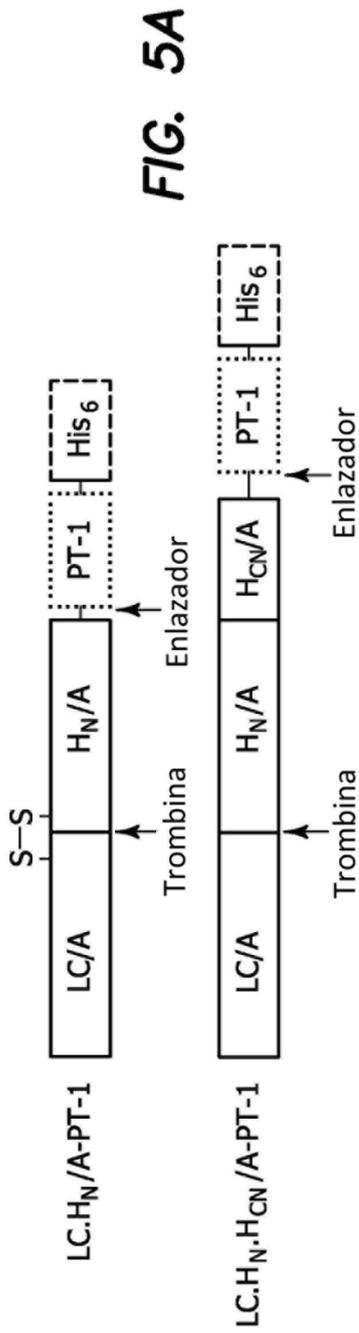


FIG. 5B

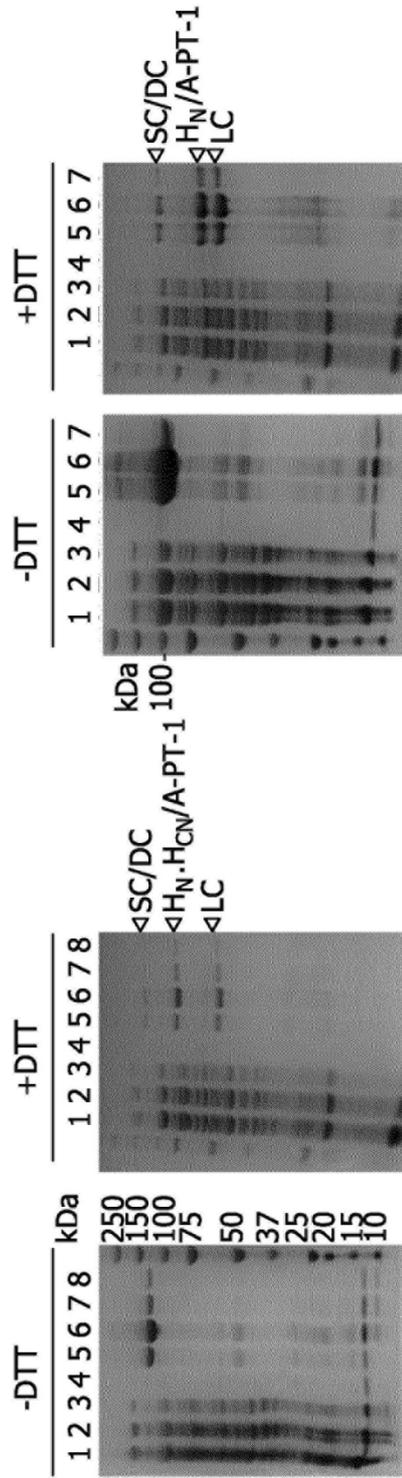
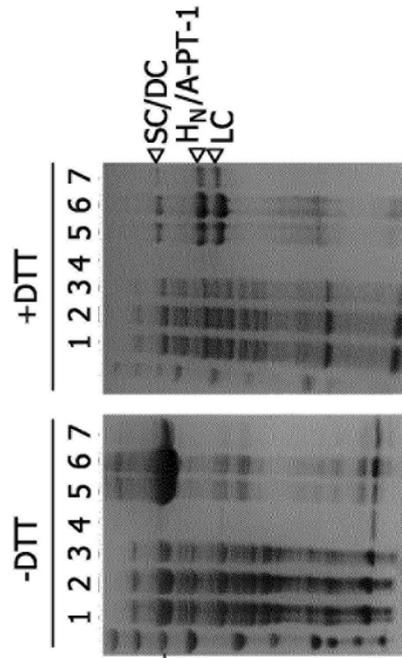
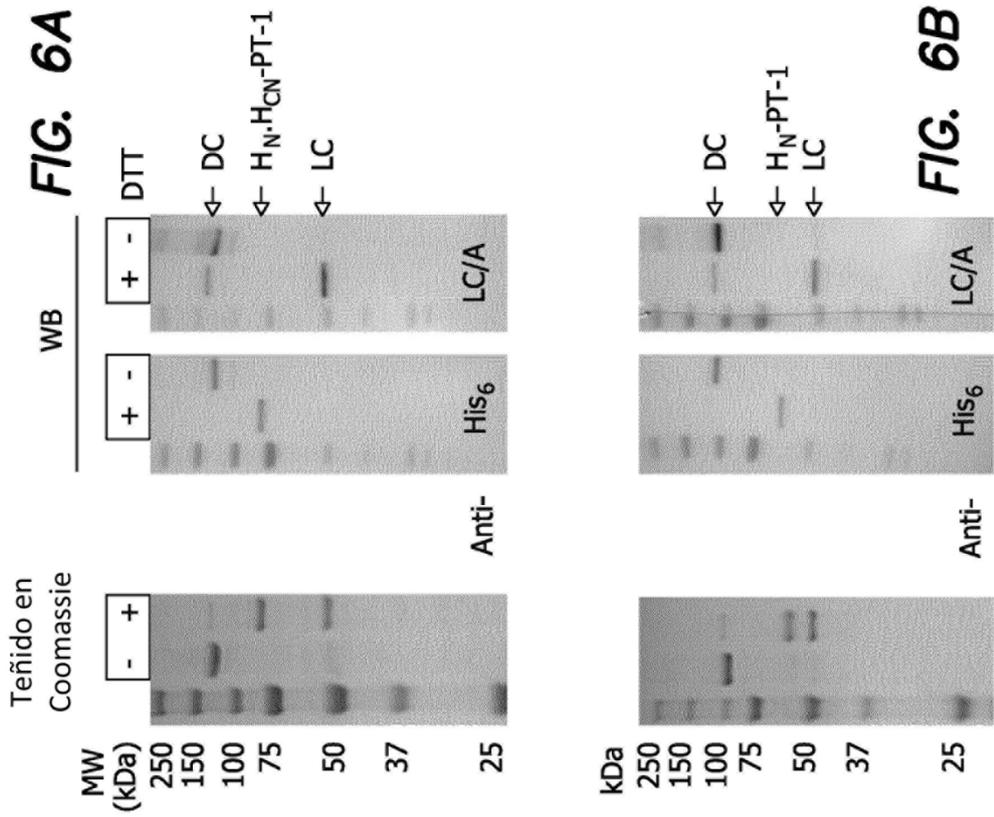
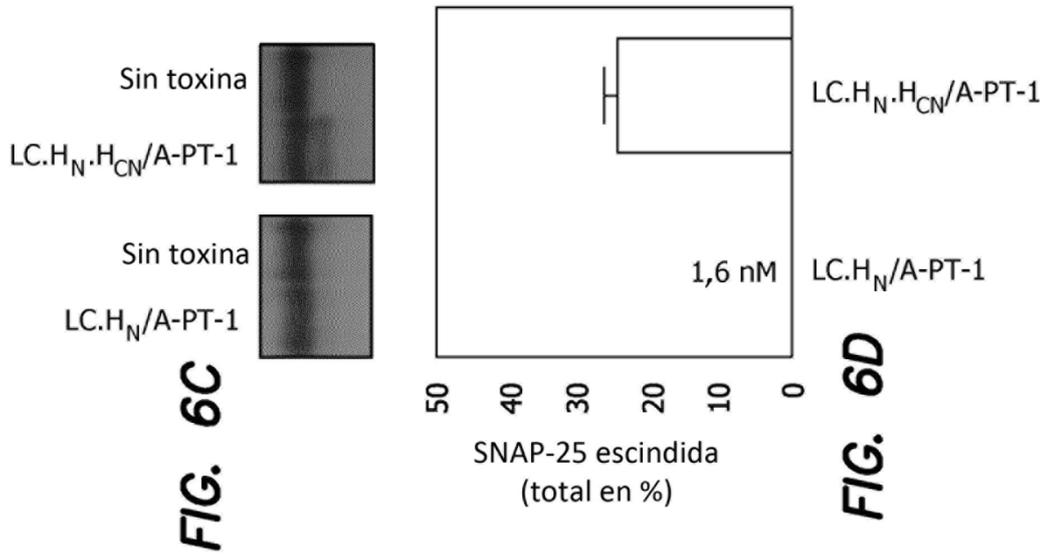


FIG. 5C





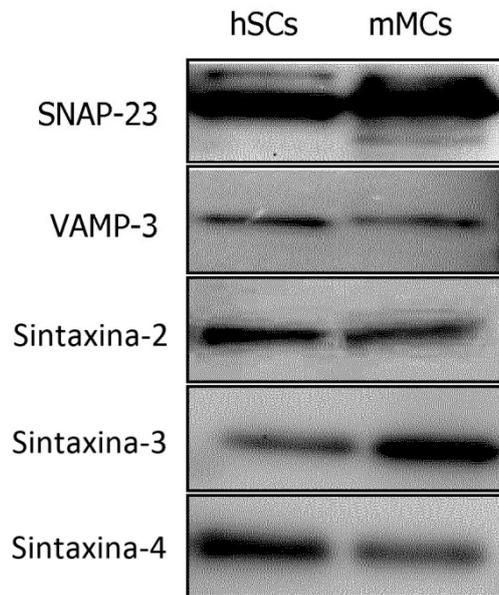


FIG. 7A

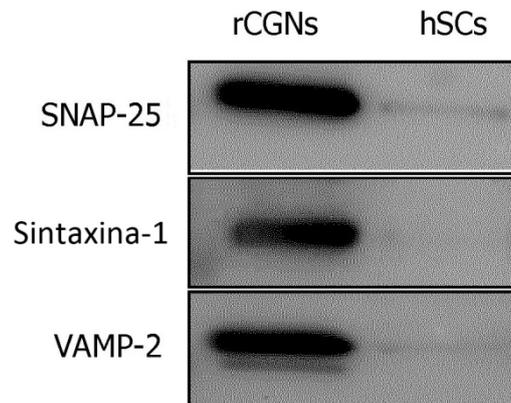


FIG. 7B

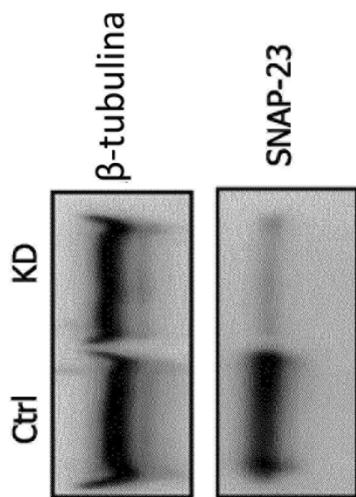


FIG. 8A

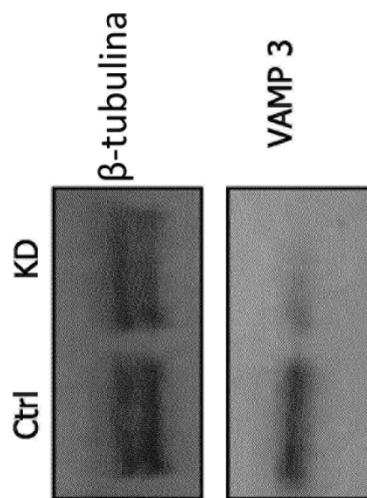


FIG. 8C

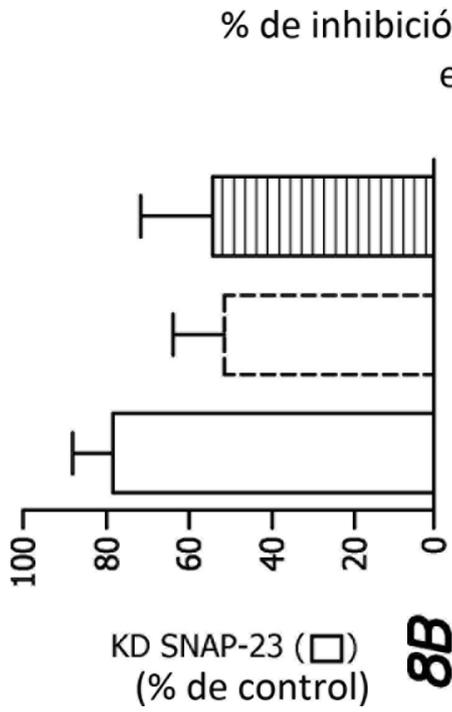


FIG. 8B

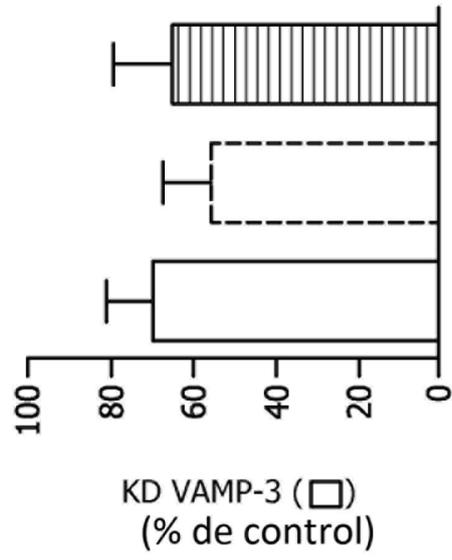


FIG. 8D