

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 485**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

C07K 14/33 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2010 PCT/EP2010/000985**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.08.2010 WO10094463**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2010 E 10705297 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2398824**

54 Título: **Medios y métodos para fabricar una neurotoxina altamente pura**

30 Prioridad:

19.02.2009 US 207989 P

19.02.2009 EP 09153226

26.08.2009 EP 09168679

26.08.2009 US 275173 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.03.2019

73 Titular/es:

MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA (100.0%)

Eckenheimer Landstrasse 100

60318 Frankfurt am Main, DE

72 Inventor/es:

PFEIL, MICHAEL;

FRIEDRICH, JOSEF;

TAYLOR, HAROLD V.;

EISELE, KARL-HEINZ y

BRÜNN, CORNELIA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 705 485 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Medios y métodos para fabricar una neurotoxina altamente pura

La invención se refiere al anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1. La invención se refiere además al método para la fabricación de un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado y/o parcialmente procesado, según la reivindicación 3, y a un anticuerpo que puede obtenerse mediante dicho método, según la reivindicación 8. La invención también se refiere al uso de los anticuerpos mencionados para la retirada del polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado y/o no procesado del BoNT/A procesado según la reivindicación 11, o para detectar la BoNT/A parcialmente procesada y/o no procesada en una muestra según la reivindicación 12. Además, la invención se refiere a un método para la fabricación de un polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado, según la reivindicación 13, y a un método para la fabricación de un medicamento, según la reivindicación 14.

Clostridium botulinum y *Clostridium tetani* producen neurotoxinas muy potentes, concretamente las toxinas botulínicas (BoNT) y la toxina del tétanos (TeNT), respectivamente. Estas neurotoxinas clostridiales ("clostridial neurotoxins", CNT) se unen específicamente a células neuronales y alteran la liberación de neurotransmisores. Cada toxina se sintetiza como una proteína monocatenaria de aproximadamente 150 kDa no procesada inactiva. El procesamiento postraducciona implica la formación de puentes disulfuro y una proteólisis limitada (melladura, "nicking") por una o más proteasas bacterianas. La neurotoxina dicatenaria activa consiste en dos cadenas, una cadena ligera N-terminal de aproximadamente 50 kDa y una cadena pesada de aproximadamente 100 kDa unidas por un enlace disulfuro. Las CNT consisten, desde el punto de vista estructural, en tres dominios, concretamente la cadena ligera catalítica, la cadena pesada que incluye el dominio de translocación (mitad N-terminal) y el dominio de unión al receptor (mitad C-terminal); véase, Krieglstein, 1990, Eur. J. Biochem., 188, 39; Krieglstein, 1991, Eur. J. Biochem., 202, 41; Krieglstein, 1994, J. Protein Chem., 13, 49.

Clostridium botulinum segrega siete serotipos antigénicamente diferenciados denominados A a G de la neurotoxina botulínica (BoNT). Todos los serotipos, junto con la neurotoxina del tétanos (TeNT) relacionada, segregados por *Clostridium tetani*, son Zn²⁺-endoproteasas que bloquean la exocitosis sináptica rompiendo las proteínas SNARE. Las CNT provocan la parálisis muscular flácida observada en el botulismo y el tétanos; véase Fischer, 2007, PNAS, 104, 10447.

A pesar de sus efectos tóxicos, el complejo de la toxina botulínica se ha empleado como agente terapéutico en un gran número de enfermedades. La toxina botulínica de serotipo A ha sido aprobada para un uso humano en EE. UU. en 1989 para el tratamiento del estrabismo, el blefaroespasma, y otros trastornos. Está disponible en el mercado como una preparación de proteínas de la toxina botulínica A, por ejemplo, bajo el nombre comercial BOTOX (Allergan, Inc.) o bajo el nombre comercial DYSPORT (Ipsen Ltd). Para aplicaciones terapéuticas, la preparación se inyecta directamente en el músculo que se va a tratar. A pH fisiológico, la toxina se libera del complejo de proteínas y se produce el efecto farmacológico deseado. Está disponible una preparación de BoNT/A mejorada que está exenta de proteínas complejantes con el nombre comercial XEOMIN (Merz Pharmaceuticals GmbH). El efecto de la toxina botulínica solo es temporal, lo cual constituye la razón de que puede ser necesaria la administración repetida de la toxina botulínica para mantener un efecto terapéutico.

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

Para la fabricación de las neurotoxinas clostridiales es especialmente importante la purificación de la disolución de fermentación que contiene neurotoxinas. En este contexto, habitualmente se aplican diferentes etapas de precipitación y extracción, seguidas de una etapa de concentración y otras etapas cromatográficas diferenciadas para obtener la neurotoxina purificada; véase DasGupta, 1984, Toxicon, 22, 415; Sathyamoorthy, 1985, J. Biol. Chemistry, 260, 10461. El documento US 2008/171347 describe composiciones de péptidos de BoNT/A, composiciones tolerizantes, composiciones que inducen respuestas inmunológicas a BoNT/A y composiciones de anticuerpos. Además, describe métodos para determinar la inmunorresistencia a la terapia con toxina botulínica en un individuo, métodos para prevenir o reducir la inmunorresistencia a la terapia con toxina botulínica en un individuo, métodos para vacunar a un individuo contra la toxina botulínica, métodos para preparar anticuerpos anti-BoNT/A, y métodos para tratar la toxicidad botulínica en un individuo, y métodos para reducir los anticuerpos antitoxina botulínica en un individuo. En la actualidad, las preparaciones de neurotoxinas disponibles comprenden, además de la neurotoxina activa deseada (procesada), un precursor proteolíticamente no procesado y/o un polipéptido de neurotoxina parcialmente procesado. El precursor proteolíticamente no procesado o el polipéptido parcialmente procesado se diferencian del polipéptido de neurotoxina activo (procesado) en una secuencia de tan solo unos pocos aminoácidos. Por tanto, apenas pueden distinguirse basándose en sus propiedades químicas y físicas. Por otra parte, la proporción de precursor proteolíticamente no procesado y/o polipéptido de neurotoxina parcialmente procesado con respecto a la proporción total de proteínas sigue siendo significativa en dichas preparaciones. Dicha proporción es debida al sistema biológico y es determinada por la biosíntesis y las condiciones del proceso de

fermentación. Así, la cantidad de precursor proteolíticamente no procesado y/o polipéptido de neurotoxina parcialmente procesado no deseados en las preparaciones de neurotoxinas está predefinida y, en la actualidad, es bastante difícil de reducir.

5 Son muy deseables medios y métodos para reducir la cantidad de polipéptidos de neurotoxina no procesados y/o parcialmente procesados y, con ello, mejorar la calidad de las preparaciones de neurotoxinas, pero todavía no están disponibles.

10 Así, el problema técnico que subyace a la presente invención puede considerarse como el suministro de medios y métodos para mejorar la fabricación de polipéptidos de neurotoxina mediante la satisfacción de las necesidades anteriormente mencionadas. El problema técnico es resuelto por las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y a continuación.

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epitopo que consiste en un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:1.

15 El término "anticuerpo", tal como se emplea en la presente, incluye un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo quimerizado, primatizado, humanizado o humano, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo sintético, derivados química o enzimáticamente modificados, un fragmento de cualquiera de dichos anticuerpos o aptámeros que consisten en los ácidos nucleicos naturales y/o químicamente modificados. Los fragmentos de dichos anticuerpos incluyen fragmentos F(ab')₂, F(ab), Fv o scFv, o derivados química o enzimáticamente modificados de cualquiera de estos fragmentos. El anticuerpo de la presente invención se unirá específicamente al epitopo que consiste en el péptido mencionado anteriormente si dicho péptido está formado por el polipéptido neurotoxina parcialmente procesado o no procesado.

20 El término "epitopo", según la presente invención, se refiere al determinante antigénico que es reconocido por el anticuerpo de la presente invención. Consiste en un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en in SEQ ID NO:1. El epitopo mencionado anteriormente representa, en un aspecto de la invención, un péptido que está flanqueado por los sitios de ruptura para las enzimas procesadoras de neurotoxinas o que cubre dicho sitio o sitios de ruptura; véanse las siguientes tablas 1 y 2. El epitopo, en un aspecto de la invención, está formado por un polipéptido de neurotoxina BoNT/A proteolíticamente no procesado o por un polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado. El polipéptido de neurotoxina parcialmente procesado puede ser la cadena ligera del polipéptido de neurotoxina BoNT/A alargada con la secuencia peptídica según se muestra en SEQ ID NO:1, o la cadena pesada del polipéptido de neurotoxina BoNT/A alargada con la secuencia peptídica según se muestra en SEQ ID NO:1. Debido a la presencia de dicho epitopo, el polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado o parcialmente procesado puede unirse específicamente al anticuerpo.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de los epitopos y de los polipéptidos de longitud completa de los serotipos de neurotoxinas

SEQ ID NO:	Secuencia del péptido escindido	Sitios de ruptura	Neurotoxina/cepa bacteriana	SEQ ID NO: (neurotoxina de longitud completa)	n.º de registro
1 ^b	TKSLDKGY NK	K438 / T439 K448 / A449	BoNT/A (Hall/62A)	17	ABD65472
2 ^c	CKSVKAPG IC	K441 / A442	BoNT/B (okra)	18	BAE48264
3 ^d	SLYNK	R444 / S445 K449 / T450	BoNT/C1 (C-6814)	19	BAA89713
4 ^d	NSR	K442 / N443 R445 / D446	BoNT/D (CB16)	20	BAA90661
5 ^e	GIR	K419 / G420 R422 / K423	BoNT/E (beluga)	21	CAA43999
6 ^d	KGTK	R435 / K436 K439 / A440	BoNT/F (NCTC10281)	22	CAA73972
7	NGTK	nn	BoNT/G	23	CAA52275
8 ^a	ENLYNR	R449 (z.T. R455)	TeNT	24	P04958
^a Krieglstein <i>et al.</i> , 1991, Eur. J. Biochem., 202, 41-51; Krieglstein <i>et al.</i> , 1990, Eur. J. Biochem., 188, 39-45.					

- ^b Beecher y DasGupta, 1997, J. Protein Chem., 16, 701-712; Krieglstein *et al.*, 1994, J. Protein Chem., 13, 49-57.
^c Antharavally y DasGupta, 1998, J. Protein Chem., 17, 417-428.
^d Sagane *et al.*, 1999, J. Protein Chem., 18, 885-892.
^e Antharavally y DasGupta, 1997, J. Protein Chem., 16, 787-799.

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos que incluyen los sitios de ruptura de los serotipos de neurotoxinas

SEQ ID NO:	Secuencia que incluye los sitios de ruptura (destacados)	Neurotoxina (cepa bacteriana)
9	KLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALN D LCIKV	BoNT/A (Hall/62A)
10	IQMCKSVKAPG ICIDV	BoNT/B (okra)
11	TKFCHKAIDGRSL YNKTL DC RELLV	BoNT/C1 (C-6814)
12	TKVCLRLTK NSRD DS TCIKV	BoNT/D
13	IRFCKNIVSVKG IRK S ICIEI	BoNT/E (beluga)
14	VKFCKSVIPRKG TKAP PR LCIRV	BoNT/F (NCTC10281)
15	IAMCKPVMYKNT GKS E QCIIV	BoNT/G
16	IGLCKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGGE LCIKI	TeNT

La expresión "se une específicamente" significa que el anticuerpo de la presente invención no presenta reacción cruzada en un grado significativo con otros epitopos sobre dichos polipéptidos de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesados o sobre dichos polipéptidos de neurotoxina BoNT/A no procesados, o sobre otros polipéptidos en general. En un aspecto de la invención, el anticuerpo de la presente invención no presenta reacción cruzada con dicho polipéptido de neurotoxina BoNT/A activo completamente procesado. La especificidad de epitopo es una característica importante del anticuerpo de la presente invención. La especificidad del anticuerpo con respecto a la neurotoxina BoNT/A parcialmente procesada o no procesada frente a la neurotoxina BoNT/A procesada será, en un aspecto, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%. La unión específica puede ensayarse mediante diversas técnicas muy conocidas, que incluyen, por ejemplo, estudios de competición. Otra característica importante es la sensibilidad del anticuerpo. La sensibilidad, en un aspecto de la invención, será de tal forma que se una al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% de la neurotoxina BoNT/A procesada comprendida en una muestra. La sensibilidad puede ensayarse mediante técnicas muy conocidas. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando la experimentación habitual. Las técnicas convencionales para los estudios de unión incluyen el radioinmunoensayo, ELISA, diálisis en equilibrio, microcalorimetría isotérmica, ensayos BIACORE® (resonancia de plasmón de superficie, "surface plasmon resonance", SPR) u otros métodos de adsorción sobre una superficie. El sistema BIACORE® SPR mide la interacción anticuerpo-antígeno. La respuesta de SPR refleja un cambio en la concentración de masa en la superficie del detector a medida que los analitos se unen o se disocian. Basándose en SPR, las mediciones de BIACORE® a tiempo real controlan las interacciones directamente a medida que suceden; véase BIAApplications Handbook, versión AB (reeditado en 1998), n.º de código de BIACORE®: BR-1001-86; BIAtechnology Handbook, versión AB (reeditado en 1998), n.º de código de BIACORE®: BR-1001-84. Las propiedades de unión, tales como la sensibilidad, de un anticuerpo de la presente invención pueden determinarse, en principio, mediante estudios de unión empleando un antígeno inmovilizado (el ligando) presentado sobre una superficie detectora. El anticuerpo que se va a ensayar (el analito) se proporcionará en la fase móvil, es decir, en una disolución. En algunos casos, el antígeno se une de modo indirecto a la superficie a través de la unión a otra molécula inmovilizada que se denomina molécula de captura. Cuando el anticuerpo se inyecta en un pulso discreto a través de la superficie con los antígenos inmovilizados, esto se puede subdividir fundamentalmente en tres fases: (i) asociación del anticuerpo con el antígeno durante la inyección de la muestra; (ii) estado en equilibrio o estacionario durante la inyección de la muestra, en el que la tasa de unión del anticuerpo es equilibrada por la disociación del

complejo de anticuerpo-antígeno; (iii) disociación del anticuerpo de la superficie durante el flujo del tampón. Se entenderá que dicho ensayo puede realizarse, como alternativa, con los anticuerpos inmovilizados que se van a investigar y con una disolución que contiene antígeno como fase móvil. Las fases de asociación y disociación proporcionan información sobre la cinética de la interacción de analito-ligando (k_a y k_d , las tasas de formación de complejos y de disociación, $k_d/k_a = K_D$). La fase en equilibrio proporciona información sobre la afinidad de la interacción analito-ligando (K_D). En un aspecto de la invención, el anticuerpo de la presente invención tiene una K_D menor que $0,5 \mu\text{M}$, en un aspecto, menor que $0,05 \mu\text{M}$ y, en otro aspecto, menor que $0,02 \mu\text{M}$.

El anticuerpo mencionado en la presente invención puede fabricarse empleando métodos descritos, por ejemplo, en Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales mediante las técnicas descritas originariamente en Kohler, 1975, Nature, 256, 495; y Galfré, 1981, Meth. Enzymol., 73, 3. Dichas técnicas comprenden la fusión de células de mieloma de ratón con células de bazo derivadas de mamíferos inmunizados. Los anticuerpos pueden mejorarse aún más mediante técnicas muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, la resonancia de plasmón de superficie, tal como se emplea en el sistema BIACORE®, puede emplearse para aumentar la eficacia de anticuerpos de fagos que se unen al epítipo mencionado anteriormente dentro del polipéptido de neurotoxina proteolíticamente no procesado; véase Schier, 1996, Human Antibodies Hybridomas, 7, 97; Malmberg, 1995, J. Immunol. Methods, 183, 7.

En un aspecto de la invención, el anticuerpo según la presente invención es producido, en un aspecto, empleando un oligopéptido que comprende el epítipo mencionado anteriormente. Dicho oligopéptido puede producirse de modo sintético o mediante expresión recombinante. Como alternativa, el anticuerpo de la invención puede producirse aplicando un polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado o parcialmente procesado natural. En este último caso, debe entenderse que los anticuerpos resultantes se ensayarán posteriormente para determinar su especificidad con respecto al polipéptido o polipéptidos de neurotoxina BoNT/A no procesados y/o parcialmente procesados. En otro aspecto de la invención, el anticuerpo monoclonal de la invención se produce empleando un polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado o no procesado, que puede tratarse con un detergente para hacer que el epítipo esté inmunológicamente disponible. Sin embargo, se entenderá que, en el caso en que el anticuerpo se dirija contra un epítipo conformacional, no debe realizarse este tratamiento con detergente. En otro aspecto, también pueden aplicarse agentes de inmunoestimulación, tales como hemocianina de lapa ("keyhole limpet hemocyanin", KLH), en dicho proceso, en especial cuando se usa un oligopéptido sintético.

El anticuerpo indicado en la presente invención puede utilizarse, por ejemplo, para una cromatografía de afinidad, para la inmunoprecipitación, y la inmunolocalización del polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado o no procesado, así como para controlar la presencia de dicho polipéptido en muestras o en organismos recombinantes.

Se describe el polipéptido de neurotoxina parcialmente procesado o no procesado procedente de *Clostridium spp.* En un aspecto de la invención, procede de *Clostridium botulinum* seleccionado del grupo de *Clostridium botulinum* ATCC 3502, *Clostridium botulinum* ATCC 3502 - cepa Hall. La estructura primaria de dicho polipéptido de neurotoxina no procesado procedente de *Clostridium botulinum* se describe en Kriegelstein, 1994, J. Protein Chem., 13,49.

Clostridium spp., según se indica en la presente, es el género de bacterias Gram-positivas, formador de endosporas y anaerobio obligado que pertenece a Firmicutes. Las neurotoxinas clostridiales pueden ser producidas por clostridios diferentes desde el punto de vista fenotípico y genético que pertenecen a las especies *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium barati*, y *Clostridium tetani*. *Clostridium botulinum*, tal como se emplea en la presente, es una especie de bacteria con forma de varilla, Gram-positiva y anaerobia obligada que produce, además de las neurotoxinas, endosporas ovales y subterminales, y que se encuentra habitualmente en el suelo.

Además, en otro aspecto del anticuerpo de la presente invención, dicho anticuerpo está unido a un vehículo polipeptídico. En un aspecto del anticuerpo de la presente invención, dicho vehículo polipeptídico se selecciona del grupo que consiste en: una proteína de unión a FC, proteína A y proteína G, y un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo de la presente invención. Este puede ser, por ejemplo, en un aspecto, un anticuerpo que es específico de especie. Dicho anticuerpo se une específicamente a la porción FC o F(ab) del anticuerpo de la invención. En otro aspecto del anticuerpo de la presente invención, dicho vehículo polipeptídico es la proteína A procedente de *Staphylococcus aureus*. Dicho vehículo polipeptídico puede usarse, en un aspecto de la invención, para aislar el anticuerpo de la presente invención.

Además, en otro aspecto del anticuerpo de la presente invención, dicho anticuerpo está unido a una matriz. En un aspecto, dicha matriz es una matriz sólida.

El término "unido", tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier tipo de conexión entre el anticuerpo y la matriz, con la condición de que dicha conexión no interfiera fundamentalmente con la unión del anticuerpo al polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado y/o no procesado. Dicha conexión puede establecerse mediante interacciones que incluyen enlaces indirectos o directos, no reversibles o reversibles, físicos y químicos, electrostáticos y/o covalentes. En un aspecto, el anticuerpo está covalentemente unido, directamente o a través de una molécula conectora, a la matriz.

El término "matriz", tal como se emplea según la presente invención, se refiere a una estructura tridimensional o disposición espacial capaz de unirse a un antígeno o a un anticuerpo. Las matrices conocidas comprenden polipéptidos, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, polietilenglicol (PEG), dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabros, y magnetita. Una matriz sólida, en un aspecto de la invención, es una matriz de polisacáridos seleccionada del grupo que consiste en Sepharose, Sephadex; agarosa, Sephacell, microcelulosa, y esferas de alginato. En otro aspecto, dicha matriz sólida puede consistir en esferas de vidrio y/o matrices polipeptídicas.

El anticuerpo puede unirse a dicha matriz a través de un conector, que incluye compuestos de molécula pequeña, moléculas de conectores peptídicos y esferas. La matriz puede tener casi cualquier disposición o configuración estructural posible, con la condición de que el anticuerpo acoplado sea capaz de unirse a su antígeno. Así, la matriz puede ser esférica, tal como sucede en una esfera, o cilíndrica, tal como sucede en la superficie interna de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Como alternativa, la superficie puede ser irregular o plana, tal como una lámina, una tira de ensayo, etc. En un aspecto, dichos soportes incluyen esferas de poliestireno.

La matriz mencionada anteriormente, en un aspecto de la invención, tiene al menos un sitio de unión para el anticuerpo de la presente invención. En otro aspecto de la invención, dicha matriz tiene otros sitios de unión para otros anticuerpos que reconocen otros epitopos. En un aspecto, dichos epitopos son otros epitopos que permiten la unión específica del polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado y/o no procesado. Otros anticuerpos inmovilizados sobre la matriz también incluyen anticuerpos que reconocen polipéptidos bacterianos distintos a los polipéptidos de neurotoxina BoNT/A. Estos otros anticuerpos comprendidos por la matriz pueden usarse para retirar otros polipéptidos no deseados y, así, con el objetivo de purificar aún más una preparación de neurotoxina BoNT/A. Sin embargo, debe entenderse que, en otro aspecto, la neurotoxina BoNT/A procesada no será unida específicamente por los anticuerpos inmovilizados sobre la matriz.

El anticuerpo de la presente invención mencionado anteriormente es adecuado para la fabricación de un polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado porque se une específicamente al epitopo caracterizado anteriormente, y así permite la unión del polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado o no procesado y después lo separa del polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado activo. Un anticuerpo que es capaz de unirse y retirar el polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado y no procesado evita, en un aspecto de la invención, la interacción con el polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado activo que conserva su actividad biológica. Gracias a la presente invención, es posible la purificación de la neurotoxina BoNT/A, por la cual el polipéptido activo deseado no ve afectada fundamentalmente su actividad. Los expertos en la técnica saben que se obtiene "actividad" solo después de la ruptura proteolítica del precursor de polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado, aunque dicho precursor no procesado puede ejercer algunas funciones biológicas. Por consiguiente, el "polipéptido de neurotoxina BoNT/A proteolíticamente procesado", en un aspecto de la invención, es el polipéptido de neurotoxina BoNT/A biológicamente activo. La expresión "biológicamente activo", tal como se emplea en la presente invención, se refiere a la capacidad del polipéptido de neurotoxina BoNT/A para llevar a cabo una posterior unión al receptor, internalización, translocación a través de la membrana endosómica hacia el citosol y/o ruptura endoproteolítica de una o más proteínas implicadas en la fusión de membranas de vesículas sinápticas.

Debe entenderse que las definiciones y las explicaciones de los términos y las expresiones dadas anteriormente se aplican, *mutatis mutandis*, a todos los aspectos descritos en esta memoria descriptiva a continuación, excepto que se indique lo contrario.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la fabricación de un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado y/o parcialmente procesado, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto un antisuero policlonal procedente de un animal no humano que ha sido inmunizado empleando un inmunógeno de péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO:25, con un péptido que tiene SEQ ID NO:25, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo que comprende el péptido mencionado anteriormente y un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado o parcialmente procesado;

b) retirar el complejo formado en la etapa a) del antisuero; y

c) liberar el anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado o parcialmente procesado de dicho complejo,

en el que dicho método comprende además, antes de la etapa a), las etapas de:

i) poner en contacto dicho antisuero policlonal procedente de un animal no humano que ha sido inmunizado empleando un inmunógeno de péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO:25, con los siguientes péptidos de captura indicados en SEQ ID NO:26 a 28, bajo condiciones que permiten la formación de complejos de captura que comprenden los anticuerpos no específicos incluidos en el antisuero policlonal y los péptidos de captura; y

ii) retirar los complejos de captura del antisuero policlonal.

La expresión "inmunógeno de péptido", tal como se empleó anteriormente, se refiere a un oligopéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO:25, que se proporciona de una manera que permite suscitar una respuesta inmunológica en un animal no humano. En un aspecto, dicho inmunógeno comprende además KLH, y en otro aspecto, dicha KLH está unida a través de una cisteína y, en un aspecto, una cisteína C-terminal, al péptido que tiene SEQ ID NO:25 a través del conector N-[gamma-maleimidobutirilo]succinimida éster (GMBS). El modo de unir KLH a un péptido a través de una molécula conectora, tal como GMBS, es muy conocido en la técnica o se describe en los ejemplos adjuntos que aparecen a continuación. En otro aspecto, el animal no humano es un mamífero, y en un aspecto es una rata, ratón, conejo, oveja o cabra. Antes de realizar el método de la invención, un animal no humano que será la fuente del antisuero policlonal se inmunizará empleando el inmunógeno de péptido mencionado anteriormente. El modo de inmunizar un animal no humano es muy conocido en la técnica y se describe en los ejemplos adjuntos que aparecen a continuación. Como resultado de dicha inmunización, el animal no humano producirá anticuerpos policlonales contra el inmunógeno de péptido.

Puede obtenerse un antisuero policlonal a partir del animal no humano mediante diversas técnicas. En un aspecto se obtiene de sangre, suero o plasma mediante técnicas convencionales muy conocidas en la técnica y descritas en los ejemplos adjuntos que aparecen a continuación. Así, la expresión "antisuero policlonal", incluye suero purificado y parcialmente purificado procedente de dicho animal. Dicho antisuero policlonal es el material de partida para el método mencionado anteriormente. Además del anticuerpo (o anticuerpos) deseado que une específicamente al polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado y/o parcialmente procesado, el antisuero policlonal puede comprender otros anticuerpos que no se unen específicamente al polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado y/o parcialmente procesado. Estos anticuerpos se separan de los anticuerpos específicos deseados poniendo en contacto el antisuero policlonal con un péptido que también tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:25. En un aspecto, dicho péptido se inmoviliza sobre un vehículo, tal como se describe en detalle en otro punto de la presente. Como resultado de dicho contacto se forma un complejo del péptido y los anticuerpos específicos que después puede retirarse del suero policlonal. Los anticuerpos específicos pueden liberarse del complejo retirado. Las técnicas adecuadas para liberar anticuerpos de dicho complejo se describen en otro punto de la presente.

En otro aspecto, dicho método comprende además, antes de la etapa a), las etapas de:

i) poner en contacto dicho antisuero policlonal procedente de un animal no humano que ha sido inmunizado empleando un inmunógeno de péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO:25, con los siguientes péptidos de captura SLD, LDK, e YNK, bajo condiciones que permiten la formación de complejos de captura que comprenden los anticuerpos no específicos incluidos en el antisuero policlonal y los péptidos de captura; y

ii) retirar los complejos de captura del antisuero policlonal.

En los estudios que subyacen a la invención, se generó un suero policlonal contra la neurotoxina botulínica no procesada de tipo A (BoNT/A), empleando el péptido conector acoplado a KLH como inmunógeno (suero de antipéptido conector de scBoNT/A) en cabras. Incluso después de la purificación de afinidad, el suero muestra reactividad cruzada con BoNT/A procesada en una transferencia Western. Se demostró que la reactividad cruzada depende del reconocimiento de tripéptidos (SLD, LDK e YNK) que aparecen en el péptido conector, así como en las cadenas ligera y pesada de BoNT/A procesada. Un segundo lote de inmunosuero de cabra se purificó mediante una cromatografía de afinidad de dos etapas, retirando los anticuerpos de tripéptidos con reactividad cruzada. El segundo suero de antipéptido conector de scBoNT/A no mostró reactividad cruzada con BoNT/A procesada en una transferencia Western. Los tripéptidos pueden aplicarse, en un aspecto, a la purificación de afinidad en forma de los derivados mostrados en cualquiera de SEQ ID NO:26 a 28.

En un aspecto del método, las etapas a) a c) se realizan por medio una cromatografía de afinidad.

Una cromatografía de afinidad, tal como se emplea en la presente invención, se refiere a una técnica para separar moléculas en una fase móvil basándose en sus diferentes afinidades por una fase estacionaria empleada en la cromatografía. En un aspecto, dicha técnica se refiere a la adsorción selectiva y la posterior recuperación de un compuesto desde un ligando inmovilizado. En otro aspecto, dicha técnica se diseña para la purificación altamente específica y eficaz de proteínas y compuestos relacionados utilizando ligandos selectivos apropiados sobre matrices de esferas y porosas para la unión de compuestos diana, que después pueden recuperarse bajo condiciones suaves. Dicha técnica se basa en una interacción altamente específica, tal como la que se produce entre un antígeno y un anticuerpo, una enzima y un sustrato, o un receptor y un ligando. En otro aspecto, dicha cromatografía de afinidad se realiza como una cromatografía en columna. La cromatografía de afinidad, según se ha caracterizado en detalle anteriormente, es, en un aspecto, una cromatografía inmunoabsorbente y una cromatografía de interacción hidrófoba ("hydrophobic interaction chromatography", HIC), una cromatografía en fase inversa y, en otro aspecto, una cromatografía de inmunoafinidad que aplica el agente de unión que, en otro aspecto, es el anticuerpo de la presente invención. Una fase estacionaria, tal como se menciona en la presente, consiste, en un aspecto, en el agente mencionado anteriormente como matriz sólida. Dicho agente, en un aspecto, está unido a un vehículo

polipeptídico acoplado a una matriz sólida y, en otro aspecto, está unido a proteína A acoplada a una matriz sólida.

En otro aspecto del método mencionado anteriormente, las etapas i) y ii) se realizan por medio de una cromatografía de afinidad.

5 Se describe un método para identificar un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de neurotoxina no procesado y/o parcialmente procesado, que comprende las etapas de:

a) determinar si el anticuerpo se une a un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:25; y

b) determinar si el anticuerpo se une a péptidos que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos SLD, LDK e YNK,

10 en el que un anticuerpo que se une a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:25, pero no a péptidos que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos SLD, LDK e YNK, se identifica como un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de neurotoxina no procesado y/o parcialmente procesado.

15 El término "determinar", tal como se emplea según el método para identificar un anticuerpo, incluye técnicas bien establecidas para determinar la unión de un anticuerpo a un péptido concreto, tal como las técnicas de inmunotransferencia (técnicas de transferencia por puntos o Western), cromatografía de afinidad, técnicas de resonancia de plasma de superficie (ensayos BIACORE®) y similares. Se entenderá que, en un aspecto, la unión mencionada anteriormente del anticuerpo al péptido o péptidos es una unión específica (es decir, una unión sin reactividad cruzada).

20 En un aspecto, el método mencionado anteriormente para identificar un anticuerpo se realiza con anticuerpos monoclonales. En un aspecto, el método se emplea para seleccionar líneas celulares de hibridoma y posteriormente producir anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al polipéptido de neurotoxina no procesado y/o parcialmente procesado. En otro aspecto, el método puede aplicarse para seleccionar anticuerpos policlonales, por ejemplo, anticuerpos de péptidos, que se unen específicamente al polipéptido de neurotoxina no procesado y/o
25 parcialmente procesado. En un aspecto, el método puede aplicarse para la confirmación de la especificidad de un anticuerpo fabricado mediante un método de la presente invención mencionado en otro punto en esta memoria descriptiva.

30 La presente invención también se refiere a un anticuerpo que puede obtenerse mediante el método mencionado anteriormente para la fabricación de un anticuerpo que se une específicamente a la BoNT/A no procesada y/o parcialmente procesada. En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En otro aspecto, dicho anticuerpo está acoplado a un soporte sólido.

El anticuerpo de la invención, en un aspecto, permite la detección del polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado y/o no procesado con una alta sensibilidad y especificidad, en un aspecto con un límite de detección de 50 a 80 pg/ml, en un aspecto 69 pg/ml.

35 En principio, el anticuerpo mencionado anteriormente puede usarse para la retirada del polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado y/o no procesado del polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado, o para detectar BoNT/A parcialmente procesada y/o no procesada en una muestra.

Además, la presente invención se refiere a un método para fabricar un polipéptido de neurotoxina BoNT/A que comprende las etapas de:

40 a) poner en contacto una disolución que contiene una mezcla de polipéptidos de neurotoxina BoNT/A proteolíticamente procesados, parcialmente procesados y/o no procesados, con un anticuerpo que se une específicamente a los polipéptidos de neurotoxina BoNT/A no procesados o parcialmente procesados, pero no al polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado, bajo condiciones que permiten la unión de dicho anticuerpo al polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado o parcialmente procesado, por lo cual se forma un complejo de anticuerpo, y
45

b) retirar el complejo de anticuerpo formado en la etapa a), por lo cual se obtiene una disolución que contiene el polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado sin polipéptidos de neurotoxina BoNT/A no procesados o parcialmente procesados.

50 La expresión "poner en contacto", tal como se emplea en la presente, se refiere a poner en proximidad física al menos dos compuestos diferentes para permitir la interacción física y/o química de dichos compuestos. Según el método de esta invención, dichos dos compuestos diferentes son, en un aspecto, el anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado o no procesado que está incluido en la disolución. El contacto, con el significado dado en la presente, se realiza bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la interacción del anticuerpo y el polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado

o no procesado. Dicha interacción provocará la unión del polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado o no procesado al anticuerpo, por lo cual se forma un complejo de antígeno-anticuerpo. Tal como se indica en otro punto en la presente, dicha interacción comprende diversos tipos de unión, tales como medidas indirectas y directas, no reversibles y reversibles. Las condiciones adecuadas que permiten la interacción específica del anticuerpo y la disolución son muy conocidas por los expertos en la técnica y dichas condiciones pueden depender del anticuerpo y de la disolución que se van a aplicar en el método determinadas sin más. Además, los expertos en la técnica también pueden determinar sin más un tiempo que es suficiente para permitir la interacción. Las condiciones para los anticuerpos se describen en los ejemplos adjuntos que aparecen a continuación.

Una disolución, tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier sistema de disolvente que contenga el polipéptido de neurotoxina BoNT/A y sus polipéptidos de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesados y/o no procesados. El sistema de disolvente comprende además un disolvente. Los disolventes incluidos en diversos aspectos de la invención son agua, sistemas de tampones acuosos, disolventes orgánicos y líquidos iónicos. En un aspecto de la invención, es un sistema de disolvente acuoso. Además, el sistema de disolvente, aparte del polipéptido de neurotoxina BoNT/A y del disolvente, puede comprender también otras moléculas, que incluyen otros polipéptidos bacterianos.

El término "agente", tal como se emplea en la presente, se refiere a un compuesto que es capaz de unirse específicamente al polipéptido de neurotoxina parcialmente procesado o no procesado. Los compuestos adecuados comprenden polipéptidos, péptidos, anticuerpos y moléculas químicas orgánicas. En un aspecto de la presente invención, un agente es un anticuerpo, tal como se especifica en otro punto en la presente. Dicho agente, en otro aspecto de la presente invención, contiene al menos un sitio de unión para el polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado o no procesado. En otro aspecto de la invención, dicho agente contiene sitios de unión adicionales para otros anticuerpos que son capaces de unirse específicamente al agente. En otro aspecto de la invención, el agente es el anticuerpo de la presente invención, según se especificó anteriormente. Además, en otro aspecto, el agente puede comprender diferentes anticuerpos de la invención. Por ejemplo, es concebible que, como agente en el sentido de la invención, se emplee un anticuerpo según la invención que se une específicamente al polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado, en combinación con un anticuerpo de la invención que se une específicamente al polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado. Como alternativa, un agente en el sentido de la invención puede comprender dos o más anticuerpos diferentes de la invención, en los que cada anticuerpo se une específicamente a un epitopo diferente presente en el polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado y no procesado.

En un aspecto del método de la invención, el anticuerpo se inmoviliza sobre una matriz como se indica en otro punto en la presente. En otro aspecto, la inmovilización se logra mediante enlace covalente directo o unión indirecta del anticuerpo a la matriz.

La expresión "unión específica", tal como se emplea en la presente, se refiere a la unión del anticuerpo al polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado y/o no procesado sin que exista reacción cruzada con otras neurotoxinas, proteínas de la célula hospedante u otros péptidos, polipéptidos u otros compuestos. La unión específica puede ensayarse mediante diversas técnicas muy conocidas. A este respecto, se remite a las definiciones realizadas anteriormente en conexión con el anticuerpo de la invención, las cuales se aplican *mutatis mutandis*.

La expresión "complejo de anticuerpo", tal como se emplea en la presente invención, se refiere al anticuerpo unido al polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado o no procesado. Sin embargo, el complejo puede comprender, además, otras moléculas. En un aspecto de la invención, el complejo puede comprender moléculas que estabilizan el complejo o que facilitan la purificación, por ejemplo, permitiendo la interacción del complejo con otras moléculas o que facilitan la precipitación del complejo. Las otras moléculas incluidas en el complejo, en un aspecto de la invención, incluyen anticuerpos secundarios que se unen específicamente al anticuerpo o al complejo como tal. Dichos anticuerpos secundarios después pueden unirse a otros anticuerpos o moléculas de interacción, tales como vehículos polipeptídicos de modo directo o indirecto. Debe entenderse que el complejo también puede comprender otros polipéptidos bacterianos u otras moléculas incluidas en la disolución.

El término "retirar" el complejo de antígeno-anticuerpo, tal como se emplea en la presente invención, se refiere a la separación del polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado complejo y del polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado complejo de la disolución que contiene la neurotoxina de BoNT/A procesada activa. En un aspecto de la invención, dicha retirada se realiza por medio de una cromatografía de afinidad, por ejemplo, empleando inmunoesferas, o mediante inmunoprecipitación.

Como consecuencia de la retirada del polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado y del polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado, el método de la presente invención, en un aspecto, proporciona el polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado activo en una forma altamente pura. La expresión "forma altamente pura", tal como se emplea en la presente, se refiere, en un aspecto, al polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado activo exento de cantidades detectables de sus polipéptidos de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesados o no procesados y, en otro aspecto, al polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado activo también exento de cantidades detectables de otras impurezas. En un aspecto, la cantidad detectable de la neurotoxina BoNT/A parcialmente procesada o no procesada es menor que 2,5%, menor que 1% o, en otro aspecto, menor que 0,1%. En

otro aspecto de la presente invención, el polipéptido de neurotoxina BoNT/A de tipo A procesado activo, tal como se menciona en la presente, muestra, bajo condiciones reductoras, una única banda detectable a 100 kDa, y una única banda detectable a 50 kDa, pero no una banda a 150 kDa, que sería donde aparecen normalmente los polipéptidos de neurotoxina de tipo A parcialmente procesados o no procesados cuando se analiza, por ejemplo, mediante SDS-PAGE. Debe entenderse que otras impurezas de polipéptidos también pueden ser determinadas mediante SDS-PAGE. También debe entenderse que pueden analizarse otros serotipos de neurotoxinas procesadas activas, respectivamente.

En el método de la presente invención, dicho polipéptido de neurotoxina es un polipéptido de neurotoxina BoNT/A.

El término "neurotoxina", tal como se emplea en la presente, se refiere a serotipos antigénicamente diferentes de neurotoxinas botulínicas, concretamente, BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G, y a la neurotoxina de tétanos (TeNT). En un aspecto, dicha BoNT/A tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:17, BoNT/B tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:18, BoNT/C1 tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:19, BoNT/D tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:20, BoNT/E tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:21, BoNT/F tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:22, BoNT/G tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:23, y TeNT tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:24.

Se indica que dicho polipéptido de neurotoxina es un variante de uno cualquiera de los polipéptidos de neurotoxina mencionados anteriormente que tiene una secuencia comprende al menos una sustitución, adición y/o deleción de aminoácido con respecto a una cualquiera de SEQ ID NO:17 a 24. En otro aspecto, dicho polipéptido de neurotoxina variante tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 40% idéntica a la secuencia de aminoácidos de BoNT/A (SEQ ID NO:17), BoNT/B (SEQ ID NO:18), BoNT/C1 (SEQ ID NO:19), BoNT/D (SEQ ID NO:20), BoNT/E (SEQ ID NO:21), BoNT/F (SEQ ID NO:22), BoNT/G (SEQ ID NO:23), o TeNT (SEQ ID NO:24). En otro aspecto, el polipéptido de neurotoxina tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G o TeNT. El término "idéntica", tal como se emplea en la presente, se refiere a la identidad de una secuencia caracterizada determinando la identidad de las secuencias de aminoácidos, en la que las secuencias se alinean de modo que se obtiene el apareamiento de orden mayor, y puede calcularse usando técnica publicadas o métodos codificados en programas informáticos tales como, por ejemplo, BLASTP, BLASTN, FASTA; Altschul, 1990, J. Mol. Biol., 215, 403. Los valores de porcentaje de identidad se calculan, en un aspecto, a lo largo de la secuencia de aminoácidos completa. Para los expertos en la técnica están disponibles una serie de programas basados en una diversidad de algoritmos para comparar secuencias diferentes. En este contexto, los algoritmos de Needleman y Wunsch o de Smith y Waterman producen resultados particularmente fiables. Para realizar los alineamientos de las secuencias, se emplea el programa PileUp (1987, J. Mol. Evolution, 25, 351; Higgins, 1989, CABIOS, 5, 151) o los programas Gap y BestFit (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48; 443; Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math., 2, 482), que son parte del paquete de software GCG (Genetics Computer Group, 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE. UU. 53711). Los valores de identidad de secuencia indicados anteriormente en porcentaje (%) se determinan, en un aspecto, empleando el programa GAP a lo largo de la región de secuencia completa con los siguientes ajustes: peso de hueco: 50, anchura de longitud: 3, apareamiento promedio: 10,000 y desapareamiento promedio: 0,000, que, a menos que se especifique lo contrario, siempre se utilizarán como ajustes estándar para los alineamientos de las secuencias.

Se entenderá que los variantes mencionados anteriormente, en un aspecto, conservarán las propiedades biológicas de las neurotoxinas. Los expertos en la técnica apreciarán que la actividad biológica completa solo se logra después de la activación proteolítica, aunque es concebible que el precursor no procesado pueda ejercer ciertas funciones biológicas o ser parcialmente activo. Las "propiedades biológicas", tal como se emplean en la presente, se refieren a (a) la unión al receptor, (b) la internalización, (c) la translocación a través de la membrana endosómica hacia el citosol y/o (d) la ruptura endoproteolítica de proteínas implicadas en la fusión de membranas de vesículas sinápticas. Los ensayos *in vivo* para evaluar la actividad biológica incluyen el ensayo de LD50 (LD: dosis letal) de ratón y el ensayo de hemidiafragma de ratón *ex vivo* según describen Pearce L.B., Borodic G.E., First E.R., MacCallum R.D. (1994), Measurement of botulinum toxin activity: evaluation of the lethality assay, Toxicol. Appl. Pharmacol., 128: 69-77; y Dressler D., Lange M., Bigalke H. (2005), The mouse diaphragm assay for detection of antibodies against botulinum toxin type B, Mov. Disord., 20:1617-1619. La actividad biológica se expresa habitualmente en unidades de ratón ("Mouse Units", MU). Tal como se emplea en la presente, 1 MU es la cantidad de componente neurotóxico que mata 50% de una población de ratones especificada después de una inyección intraperitoneal, es decir la LD50 i.p. de ratón (Schantz y Kauter, 1978). En otro aspecto, los variantes puede ser neurotoxinas que presentan propiedades biológicas mejoradas o alteradas, por ejemplo, pueden comprender sitios de ruptura que están mejorados para el reconocimiento de enzimas o que pueden mejorarse para la unión al receptor o cualquier otra propiedad especificada anteriormente. Es concebible que el concepto de la presente invención se base en la presencia de uno, dos o más sitios de ruptura entre la cadena ligera y pesada del polipéptido de neurotoxina, aunque la naturaleza del sitio o sitios de ruptura y la secuencia de aminoácidos concreta entre ellos no importe, siempre que el agente sea específico para el polipéptido de neurotoxina parcialmente procesado o no procesado. Por consiguiente, otro aspecto lo constituye el reemplazo de sitios de reconocimiento de proteasas y del péptido conector entre la cadena

pesada y ligera del polipéptido de neurotoxina o de las secuencias flanqueantes que rodean al sitio de ruptura (en el caso de un único sitio de ruptura).

En otro aspecto, el polipéptido de neurotoxina BoNT/A según el método de la invención puede ser una molécula quimérica. Dicha molécula quimérica, en un aspecto, puede presentar dominios individuales sustituidos. Por consiguiente, en otro aspecto, la porción de cadena pesada de la neurotoxina BoNT/A está reemplazada por una porción de un dominio FC de un anticuerpo.

En un aspecto, el polipéptido de neurotoxina BoNT/A producido según el método de la presente invención puede usarse para herramientas analíticas, que incluyen ELISA, antígenos para ELISA, y patrones control.

Para lograr que una preparación de neurotoxina BoNT/A también esté exenta de impurezas, pueden añadirse otras etapas de purificación muy conocidas en la técnica al método de la presente invención mencionado anteriormente, el cual se explicará a continuación.

Tal como se sigue del texto anterior, en un aspecto del método de la presente invención, dicho método se realiza por medio de una cromatografía de afinidad.

En otro aspecto de la invención, el inmunoabsorbente específico para la cromatografía de inmunoafinidad se prepara como sigue:

- síntesis del oligopéptido específico (representado por SEQ ID NO:1 o 25) del precursor del polipéptido de BoNT/A no procesado o parcialmente procesado, en particular, preparación de un oligopéptido sintético;

- conjugación del péptido con un vehículo adecuado para la inmunización (que incluye hemocianina, BSA, lipopolisacáridos y otros), específicamente, la unión del oligopéptido a un vehículo polipeptídico;

- inmunización de animales para producir anticuerpos policlonales o monoclonales, en particular, inmunización de conejos o cabras para producir anticuerpos policlonales e inmunización de ratones para producir anticuerpos monoclonales (es necesario inmunizar al menos diez animales para obtener un anticuerpo de afinidad);

- generación de líneas celulares de hibridoma para producir anticuerpos monoclonales;

- purificación de los anticuerpos mediante cromatografía convencional y de afinidad (para la última, el oligopéptido se unirá a un vehículo), específicamente, los anticuerpos se purifican empleando, por ejemplo, proteína A o G y/o a través del oligopéptido unido a un vehículo (este último se empleó para la inmunización) o a través de una cromatografía de afinidad del péptido para retirar los anticuerpos no específicos, seguido de una cromatografía de afinidad;

- ruptura de los anticuerpos específicos en fragmentos Fab, en particular, los anticuerpos específicos se tratan con una proteasa, tal como papaína, para obtener los respectivos fragmentos Fab;

- los fragmentos Fab se caracterizan por sus propiedades de unión antes de posteriores aplicaciones;

- los anticuerpos se acoplarán a una matriz en columna, tal como Sepharose activada, en particular, los fragmentos Fab específicos se acoplan a un grupo de enlace activo de un material vehículo;

- el inmunoabsorbente (en una columna) se lava y se equilibra usando un sistema de tampón adecuado;

- el precursor del polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado o parcialmente procesado se une específicamente al inmunoabsorbente, mientras que el polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado activo pasa a través de la columna sin modificarse (sin que se una a ella) y se recogerá.

En otro aspecto del método de la invención, se realiza además una cromatografía de exclusión molecular. Mediante la cromatografía de exclusión molecular, tal como se usa en la presente invención, las partículas se separan basándose en su tamaño, concretamente en su volumen hidrodinámico. Una fase móvil es una disolución acuosa empleada para transportar la muestra (cromatografía de filtración en gel) o es un disolvente orgánico (cromatografía de permeación en gel). Una fase estacionaria es un medio en gel (poliacrilamida, dextrano o agarosa) que se filtra a baja presión, o es sílice o es un medio de poliestireno reticulado que se filtra a presión mayor. En otro aspecto, dicha cromatografía de exclusión molecular se realiza como una cromatografía en columna. En otro aspecto del método de la invención, dicha cromatografía de exclusión molecular se realiza empleando tamices molecular con tamaños de poro diferenciados, tales como carbono activado, gel de sílice, zeolita.

El método de la presente invención, en otro aspecto, comprende además una cromatografía de intercambio iónico.

Una cromatografía de intercambio iónico, tal como se usa en la presente invención, separa las moléculas basándose en las diferencias entre la carga global de las proteínas y los compuestos relacionados. Se emplea para la purificación de proteínas, para la purificación de oligonucleótidos, péptidos u otras moléculas cargadas. Dichas moléculas deben estar presentes en la disolución que se va a aplicar al método de purificación como contaminantes.

La proteína o el compuesto relacionado de interés, en el caso presente la neurotoxina BoNT/A, debe tener una carga opuesta a la del grupo funcional unido a la resina para que pueda unirse. Debido a que esta interacción es iónica, la unión debe realizarse bajo condiciones de baja ionicidad. La elución se logra aumentando la fuerza iónica para romper la interacción iónica o cambiando el pH de la proteína. En un aspecto del método de la invención, dicha cromatografía de intercambio se realiza como una cromatografía en columna.

En un aspecto, la cromatografía de intercambio, tal como se usa según la presente invención, es una cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico, tal como se usa en la presente invención, se realiza, en otro aspecto, por medio de una cromatografía de intercambio catiónico y/o aniónico. En una cromatografía de intercambio aniónico, tal como se emplea en la presente, la carga superficial de los solutos (proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, endotoxinas) que se van a unir será una carga neta negativa, por tanto para que una proteína específica se una, se debe lograr un pl cercano o mayor que el pl de esa proteína. Las resinas de intercambio aniónico que se emplean habitualmente son Q-resinas (Q Sepharose), una amina cuaternaria; y resina de DEAE (dietilaminoetano). En general, una resina de intercambio iónico es una matriz insoluble de esferas pequeñas que tienen una superficie cargada, que se emplea como una zeolita artificial. Los diferentes tipos de resinas pueden distinguirse basándose en sus grupos funcionales e incluyen resinas muy ácidas (grupos ácido sulfónico, por ejemplo, sulfonato de poliestireno sodio o poliAMPS), resinas muy básicas (grupos amino cuaternario, por ejemplo, grupos trimetilamonio, por ejemplo, poliAPTAC), resinas débilmente ácidas (en su mayor parte, grupos ácidos carboxílicos), resinas débilmente básicas (grupos amino primario, secundario y/o ternario, por ejemplo, polietilenamina). También existen tipos especializados de resinas que incluyen las resinas quelantes (ácido iminodiacético, tiourea).

En una cromatografía de intercambio catiónico, tal como se emplea en la presente, la carga superficial de los solutos (proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, endotoxinas) que se van a unir será una carga neta positiva, por tanto para que una proteína específica se una, se debe lograr un pl cercano o menor que el pl de esa proteína. Las resinas de intercambio catiónico que se emplean habitualmente son S-resinas, derivados de sulfato; y resinas CM, iones derivados de carboxilato.

En un aspecto del método de la invención, dicha cromatografía de intercambio iónico se realiza antes y/o después de la cromatografía de afinidad. En otro aspecto del método de la invención, dicha cromatografía de intercambio iónico, tal como se usa en la presente, se realiza antes de la cromatografía de afinidad de la presente invención.

Debido a esta medida, el riesgo de reactividad cruzada potencial o de que se produzca una unión no específica durante la cromatografía de afinidad puede evitarse y reducirse aún más.

El método de la presente invención permite la fabricación de neurotoxina BoNT/A procesada activa exenta del precursor del polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado o parcialmente procesado y, así, se obtienen cantidades mayores del polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado activo.

La presente invención se refiere, en principio, al uso del anticuerpo de la presente invención para separar la neurotoxina BoNT/A procesada activa de su precursor del polipéptido de BoNT/A no procesado o parcialmente procesado. En un aspecto, el anticuerpo de la presente invención se usa para la separación del precursor del polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado o parcialmente procesado del polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado activo, en una disolución que contiene una mezcla de dichos polipéptidos, y así obtener el polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado activo exento del precursor del polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado o parcialmente procesado, tal como se describe en detalle en otro punto en la presente.

La presente invención también se refiere a un método para la fabricación de un medicamento que comprende las etapas del método mencionado anteriormente y la etapa adicional de formular el polipéptido de neurotoxina BoNT/A proteolíticamente procesado como un medicamento.

El término "medicamento", tal como se emplea en la presente, se refiere, en un aspecto, a una composición farmacéutica que contiene el polipéptido de neurotoxina BoNT/A biológicamente activo (proteolíticamente procesado) como compuesto activo farmacéutico, en la que la composición farmacéutica puede usarse para la terapia humana o no humana de diversas enfermedades o trastornos en una dosis terapéuticamente eficaz.

Una composición farmacéutica, tal como se usa en la presente, comprende el polipéptido de neurotoxina BoNT/A biológicamente activo (proteolíticamente procesado) preparado mediante el método de la presente invención y, en un aspecto, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. La neurotoxina BoNT/A activa puede estar presente en forma líquida o liofilizada. En un aspecto, dicho compuesto puede estar presente junto con glicerol, estabilizantes de proteínas (por ejemplo, albúmina de suero humana (HAS)) o estabilizantes que no son proteínas.

La composición farmacéutica, en un aspecto, se administra por vía tópica. La administración de fármacos que se emplea de modo convencional es la administración intramuscular, subcutánea (cerca de glándulas). Sin embargo, dependiendo de la naturaleza y del modo de acción de un compuesto, la composición farmacéutica puede administrarse también por otras vías.

El compuesto, es decir, el polipéptido de neurotoxina BoNT/A biológicamente activo (proteolíticamente procesado) es el ingrediente activo de la composición y, en un aspecto, se administra en formas de dosificación convencionales preparadas combinando el fármaco con vehículos farmacéuticos convencionales según procedimientos convencionales. Estos procedimientos pueden implicar mezclar, granular y comprimir, o disolver los ingredientes según sea apropiado para la preparación deseada. Se apreciará que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable vienen dictados por la cantidad de ingrediente activo que se va a combinar, por la vía de administración y por otras variables muy conocidas.

El vehículo o vehículos deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor de esta. El vehículo farmacéutico empleado puede incluir un sólido, un gel, o un líquido. Los ejemplos de vehículos sólidos son lactosa, sulfato de calcio dihidratado, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábica, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Los ejemplos de vehículos líquidos son disolución salina tamponada con fosfato, jarabe, aceite, agua, emulsiones, diversos tipos de agentes humectantes y similares. De forma similar, el vehículo o diluyente puede incluir un material de retraso en el tiempo muy conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, por sí solo o con una cera. Los vehículos adecuados comprenden los mencionados anteriormente y otros muy conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania.

El diluyente o diluyentes se seleccionan para que no afecten a la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, disolución salina fisiológica, disoluciones de Ringer, disolución de dextrosa y disolución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad del compuesto que se va a usar en una composición farmacéutica de la presente invención que previene, mejora o trata los síntomas que acompañan a una enfermedad o un trastorno indicado en esta memoria descriptiva. La eficacia terapéutica y la toxicidad del compuesto pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población) y DL50 (la dosis letal para 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la proporción DL50/DE50.

El régimen de dosificación será determinado por el médico encargado y por otros factores clínicos. Tal como se conoce en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente concreto dependen de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, la superficie específica del cuerpo, la edad, el compuesto concreto que se va a administrar, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se estén administrando al mismo tiempo. El avance puede controlarse mediante una evaluación periódica.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas mencionadas en la presente se administran al menos una vez para tratar o mejorar o prevenir una enfermedad o un trastorno indicado en esta memoria descriptiva. Sin embargo, dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse más de una vez.

Las composiciones farmacéuticas específicas se preparan de una manera conocida en la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo mencionado anteriormente en la presente, mezclado o asociado de otro modo con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable. Para fabricar estas composiciones farmacéuticas, el compuesto o compuestos activos habitualmente se mezclarán con un vehículo o con el diluyente. Las formulaciones resultantes deben adaptarse al modo de administración. Las recomendaciones de dosificación serán indicadas en las instrucciones del prescriptor o usuario para prever los ajustes de la dosis dependiendo del receptor considerado.

El medicamento puede comprender, en otro aspecto de la invención, otros fármacos además del polipéptido de neurotoxina BoNT/A biológicamente activo (proteolíticamente procesado) que se añaden a la composición farmacéutica durante su formulación. Por último, debe entenderse que la formulación de una composición farmacéutica se realiza bajo condiciones convencionales de GMP o similares para asegurar la calidad, la seguridad farmacéutica y la eficacia del medicamento.

Se describe una composición que comprende un polipéptido de neurotoxina BoNT/A proteolíticamente procesado que puede obtenerse mediante el método de la presente invención.

El término "composición" se refiere a cualquier composición formulada en forma sólida, líquida, en aerosol (o gaseosa). Dicha composición comprende el compuesto opcionalmente junto con compuestos auxiliares adecuados, tales como diluyentes o vehículos u otros ingredientes. En este contexto, en la presente invención se distingue entre compuestos auxiliares, es decir, compuestos que no contribuyen a los efectos suscitados por el compuesto tras la aplicación de la composición para su objetivo deseado, y otros ingredientes, concretamente compuestos que contribuyen con otro efecto o que modulan el efecto del compuesto. Los diluyentes y/o vehículos adecuados dependen del objetivo para el cual se va a usar la composición y los otros ingredientes. Los expertos en la técnica pueden determinar sin más dichos diluyentes y/o vehículos adecuados. Los ejemplos de vehículos y/o diluyentes adecuados se describen en otro punto en la presente.

La composición mencionada anteriormente es un medicamento, tal como se especifica con más detalle en otro punto de la descripción. En un aspecto, dicho medicamento puede usarse para la prevención y/o el tratamiento de al menos una de las siguientes enfermedades y trastornos: trastornos de la fuerza de los músculos voluntarios, distonía focal, que incluye distonía cervical, craneal, y blefaroespasmo esencial benigno, espasmo hemifacial, y espasticidad focal, trastornos gastrointestinales, hiperhidrosis, y corrección de arrugas cosmética, en otro aspecto también el blefaroespasmo, distonía oromandibular, del tipo de apertura de mandíbula, del tipo de cierre de mandíbula, bruxismo, síndrome de Meig, distonía lingual, apraxia del párpado, distonía cervical de apertura, antecollis, retrocollis, laterocollis, torticolis, distonía faríngea, distonía laríngea, disfonía espasmódica/de tipo abductor, disnea espasmódica, distonía de extremidades, distonía del brazo, distonía específica de tareas, calambre del escritor, calambre del músico, calambre del golfista, distonía de pierna, abducción del muslo, abducción del muslo y flexión de la rodilla, extensión de la rodilla, flexión del tobillo, extensión del tobillo, equinovarus, distonía de deformidad del pie, dedo estriatal, flexión del dedo del pie, extensión del dedo del pie, distonía axial, síndrome de Pisa, distonía de la bailarina del vientre, distonía segmental, hemidistonía, distonía generalizada, distonía en el síndrome de Lubag, distonía en la degeneración corticobasal, distonía tardía, distonía en la ataxia espinocerebelar, distonía en la enfermedad de Parkinson, distonía en la enfermedad de Huntington, distonía en la enfermedad de Hallervorden-Spatz, disquinesias inducidas por DOPA/distonía inducida por DOPA, disquinesias tardías/distonía tardía, disquinesias/distonía paroxísmicas, mioclonus palatal inducido por la acción quinesiogénica no quinesiogénica, mioclonia mioquímica, rigidez, espasmos musculares benignos, temblor de la barbilla hereditario, actividad paradójica del músculo de la mandíbula, espasmos hemimasticatorios, miopatía branquial hipertrófica, hipertrofia maseterica, hipertrofia anterior tibial, nistagmo, oscilopsia, parálisis supranuclear progresiva, epilepsia, epilepsia partialis continua, planificación de una operación de torticolis espasmódica, parálisis de las cuerdas vocales abductoras, disfonía mutacional recalcitrante, disfunción del esfínter esofágico superior, granuloma de pliegue vocal, tartamudeo del síndrome de Gilles de la Tourette, mioclonus del oído medio, cierre protector de la laringe, postlaringectomía, fallos del habla, ptosis protectora, entropión de disfunción del esfínter de Oddi, pseudoacalasia, no acalsia, trastornos motores esofágicos, vaginismo, temblor de inmovilización postoperatorio, disfunción de la vejiga, disinergría del esfínter detrusor, espasmo del esfínter y vejiga, espasmo hemifacial, disquinesias de reinervación, uso cosmético para las patas de gallo, asimetrías faciales de fruncimiento de ceño, barbilla rocosa, síndrome de la persona rígida, hiperplasia de próstata por tétanos, adipositas, tratamiento del estrabismo por parálisis cerebral infantil, paralítico mixto concomitante, después de cirugía de desprendimiento de retina, después de cirugía de cataratas, en estrabismo miosítico por afaquia, estrabismo miopático, desviación vertical disociada, como adjunto a la cirugía por estrabismo, esotropía, exotropía, acalasia, fisuras anales, hiperactividad de las glándulas exocrinas, síndrome de Frey, síndrome de las lágrimas de cocodrilo, hiperhidrosis, rinorrea plantar, palmar y axilar, hipersalivación relativa en el ictus, en la enfermedad de Parkinson, en la esclerosis amiotrófica lateral, trastornos espásticos, en procesos autoinmunológicos de la encefalitis y mielitis, esclerosis múltiple, mielitis transversal, síndrome de Devic, infecciones víricas, infecciones bacterianas, infecciones parasitarias, infecciones fúngicas, en la paraparesis espástica hereditaria, síndrome postapoplético, infarto hemisférico, infarto del tronco cerebral, infarto de la médula espinal, en traumatismos del sistema nervioso central, lesiones hemisféricas, lesiones del tronco cerebral, lesiones de la médula espinal, en hemorragias del sistema nervioso central, hemorragia intracerebral, hemorragia subaracnoidea, hemorragia subdural, hemorragia intraespinal, en neoplasias, tumores hemisféricos, tumores del tronco cerebral, y tumores de la médula espinal. Para los detalles y los síntomas, véase, por ejemplo, Jost, 2007, *Drugs*, 67(5), 669, o Dressier, 2000, en *Botulinum Toxin Therapy*, Thieme Verlag, Stuttgart, Nueva York.

Se indica que la composición es una composición cosmética que puede formularse como se ha descrito anteriormente para una composición farmacéutica. De forma similar, para una composición cosmética se contempla que el compuesto, en un aspecto, se use en forma sustancialmente pura. Las composiciones cosméticas, en otro aspecto, se aplicarán por vía intramuscular. En otro aspecto, las composiciones cosméticas que comprenden la neurotoxina BoNT/A pueden formularse como una disolución antiarrugas.

Las figuras muestran:

Figura 1: Esquema de la purificación cromatográfica convencional del polipéptido de neurotoxina.

Figura 2: Esquema de la purificación cromatográfica del polipéptido de neurotoxina biológicamente activo (proteolíticamente procesado) y la separación de su precursor de polipéptido parcialmente procesado o no procesado según la presente invención.

Figura 3: Transferencia Western que emplea un anticuerpo que reconoce específicamente a SEQ ID NO:25 y que se ha obtenido mediante el método de la presente invención. El tamaño de las bandas se indica en kDa. Los carriles individuales se explican en los ejemplos.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben considerarse, de ninguna manera, limitantes de su alcance.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de inmunógenos y anticuerpos

Generación de inmunógenos

1. Péptido conector-inmunógeno I: El péptido con la secuencia NH₂-TKSLDKGYNK-C-COOH fue generado por un suministrador externo y después se acopló a través del conector GMBS a la proteína vehículo KLH.

2. Péptido conector-inmunógeno II: a) Activación de la ovoalbúmina: 2,18 mg de sulfo-smcc (sulfosuccinimidil-4(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato) se disolvieron en 50 µl de DMSO. Después, se añadieron 2,5 ml de disolución de ovoalbúmina que contenía ovoalbúmina 7,5 mg/ml (tampón: fosfato de sodio 5 mM, NaCl al 0,9%) y la disolución se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con rotación. Se realizó un cambio de tampón empleando columnas PD10, y la ovoalbúmina activada se eluyó en 3,5 ml de tampón que contenía fosfato de sodio 10 mM, NaCl al 0,9%. b) Acoplamiento del péptido a la ovoalbúmina: se disolvieron 8 mg del péptido Ac-DKGYNK-OH en 250 µl de H₂O y 2,5 µl de TCEP HCl 500 mM (HCl de tris[2-carboxietil]fosfina) y posteriormente se neutralizó con NaOH 1 mM. Por último, se añadió ovoalbúmina activada y la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 4,4 h con rotación. Mediante la adición de una disolución de cisteína 10 mM se bloquearon los restos reactivos remanentes mediante una incubación durante 1 h con rotación. Se realizó una diálisis empleando fosfato de sodio 10 mM, NaCl al 0,9%.

Inmunización

Se obtuvieron antisueros mediante inmunización.

1.) Suero de antipéptido conector de scBoNT/A I: Como inmunógeno se empleó el inmunógeno de péptido conector I que se acopló a través del conector GMBS a la proteína vehículo KLH. Se inmunizaron por vía subcutánea dos cabras simultáneamente, primero cada una con 300 µg de inmunógeno de decapeptido en adyuvante de Freud y, por último, se inmunizaron cuatro veces a un ritmo de 2 semanas con 100 µg del inmunógeno en adyuvante de Freud incompleto. Después de 49, 63, 77 y 84 días se recogió el antisero. Se realizó una cromatografía de afinidad empleando el suero recogido del último sangrado en el día 84.

2.) Suero de antipéptido conector de scBoNT/A II: Como inmunógeno se empleó el inmunógeno de péptido conector II que se acopló a través del conector SMCC a la proteína vehículo ovoalbúmina. Se inmunizaron por vía intradérmica dos conejos, primero cada uno con 300 µg de inmunógeno de péptido conector II en adyuvante de Freud y, por último, se inmunizaron cinco veces a un ritmo de 2 semanas con 150 µg de inmunógeno de péptido conector II en Montanide ISA 206. Se realizó una cromatografía de afinidad empleando el suero recogido del sangrado en el día 60 o 110, respectivamente.

Cromatografía de afinidad en dos etapas del suero

1. Generación de la matriz: Para la cromatografía de afinidad en dos etapas se generaron dos matrices de yodoacetilo de ultraunión diferentes que contenían péptidos diferentes.

Por una parte, los péptidos de reactividad cruzada SLD, LDK e YNK se presentaron en forma de los siguientes péptidos: Ac-ELDKYN-C-COOH (SEQ ID NO:26), NH₂-NISLDL-C-COOH (SEQ ID NO:27) y NH₂-YYNKF-C-COOH (SEQ ID NO:28) y se acoplaron a la matriz empleando la descripción general indicada a continuación. Por otra parte, el péptido conector (SEQ ID NO:25) se acopló a la matriz empleando la descripción general indicada a continuación en forma del siguiente derivado: Ac-TKSLDKGYNKA-C-COOH.

Descripción general:

Tampón de acoplamiento - Tris 50 mM, EDTA-Na 5 mM, pH 8,5. Preparar un volumen de tampón igual a 20 veces el volumen del gel de yodoacilo UltraLink® que se va a emplear. L-cisteína HCl; disolución de lavado: cloruro de sodio (NaCl) 1 mM. Se emplea una columna de flujo por gravedad o de rotación vacía que pueda cerrarse por arriba y por abajo.

Preparar la muestra de péptido o proteína.

Disolver el péptido con tampón de acoplamiento.

Acoplar al gel de yodoacilo UltraLink®:

1. Tras haber colocado un tapón en la parte inferior de una columna de flujo por gravedad, añadir la cantidad deseada de suspensión de gel de yodoacilo UltraLink® y dejar que el gel se asiente durante 15 minutos.

2. Drenar el líquido de la columna cargada y lavar/equilibrar el gel de yodoacilo UltraLink® con 5 volúmenes de lecho del gel de tampón de acoplamiento añadiendo el tampón por la parte de arriba del lecho del gel y dejando que drene a través de la columna. No dejar que el lecho del gel se seque.

3. Volver a colocar el tapón en la parte inferior y añadir la muestra que contiene sulfhidrilo preparada. Puede aplicarse aproximadamente 1 ml de disolución de muestra por ml de gel de yodoacilo UltraLink®.

4. Volver a colocar el tapón en la parte superior y mezclar la columna a temperatura ambiente durante 15 minutos.

5. Dejar la columna en posición erguida e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos sin mezclar.

6. Retirar secuencialmente los tapones de la parte superior e inferior de la columna y dejar que la disolución drene.

7. Lavar la columna con tres volúmenes de lecho del gel de tampón de acoplamiento.

Bloquear los sitios de unión no específica en el gel.

1. Volver a colocar el tapón en la parte inferior de la columna.

2. Preparar una disolución de L-cisteína HCl 50 mM en tampón de acoplamiento y añadir 1 de esta disolución a la columna por cada mililitro de gel.

3. Volver a colocar el tapón en la parte superior y mezclar durante 15 minutos a temperatura ambiente, después incubar la reacción sin mezclar durante 30 minutos más a temperatura ambiente.

2. Cromatografía de afinidad en dos etapas:

El suero que se va a purificar primero se separa de la sangre.

El suero bruto se introduce en la primera columna que contiene los tripéptidos de reactividad cruzada. Los anticuerpos de reactividad cruzada se unen a los tripéptidos y se separan del suero bruto. El filtrado de esta primera columna se introduce en la segunda columna que contiene el péptido conector unido. Los anticuerpos específicos del péptido conector se unen al péptido conector. Los anticuerpos antipéptido conector de scBoNT/A de baja afinidad se retiran de la columna mediante un lavado de alta rigurosidad con tampón PBS (NaCl 0,5 M). Después, los anticuerpos antipéptido conector de scBoNT/A de alta afinidad unidos se eluyen y se concentran. Este concentrado se corresponde con el suero de antipéptido conector de scBoNT/A usado.

Ejemplo 2: Ensayo y verificación de la especificidad del anticuerpo

Reactivos de ELISA:

Tampón de revestimiento - Tris 0,005 M-1 M, NaCl al 0,9% NaCl, preferiblemente Tris 0,01 M-0,2 M, NaCl al 0,9%, pH = 8,5.

Anticuerpo de captura - suero de antipéptido conector de scBoNT/A.

Tampón de bloqueo y diluyente del anticuerpo - BSA al 0,5%-5% en fosfato de sodio 0,01 M, NaCl al 0,9%, pH = 7,4.

Tampón de muestras - BSA al 0,5%-5% en fosfato de sodio 0,005 M-1 M, NaCl 0,1-0,5 M, Tween 20 al 0,01%-1%, preferiblemente BSA al 1%-3% en fosfato de sodio 0,005-0,1 M, NaCl 0,15 M-0,4 M, Tween 20 al 0,05%-0,5%, pH = 7,4.

Tampón de lavado - fosfato de sodio 0,01 M, NaCl al 0,9%, Tween 20 al 0,05%, pH = 7,4.

Anticuerpo de detección - anticuerpo monoclonal contra BoNT/A.

Anticuerpo secundario - un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón (H&L) conjugado con peroxidasa.

Sustrato - TMB, disponible en el mercado.

2. Reactivos de la transferencia Western:

Tampón de muestras desnaturizante - disponible en el mercado.

Gel de SDS - disponible en el mercado.

Tampón de ejecución de MES (SDS-PAGE) - disponible en el mercado.

Membrana de PVDF - disponible en el mercado.

Tampón de transferencia (Western) - disponible en el mercado.

Muestra - neurotoxina botulínica A con BoNT/A dicatenaria y scBoNT/A (monocatenaria).

Anticuerpo primario - suero de antipéptido conector de scBoNT/A.

Anticuerpo secundario - anticuerpo policlonal de burro anti-IgG de cabra (H&L) conjugado con fosfatasa alcalina.

Tampón de bloqueo y diluyente del anticuerpo - BSA al 0,5%-5% en Tris 0,01 M-0,1 M, NaCl al 0,9%, Tween 20 al 0,05%-5%, pH = 7,4.

Tampón de lavado - Tris 0,01 M-0,1 M, NaCl al 0,9%, Tween 20 al 0,05%-5%, pH = 7,4.

5 Tampón Tris - Tris 0,025 M, pH = 8,0.

Sustrato - BCIP/NBT, disponible en el mercado.

a) Especificidad del antisuero con respecto a BoNT/B y BoNT/E: Para determinar la especificidad de los antisueros con respecto a BoNT/B y BoNT/E se analizó la tasa de recuperación de sustancias en un ELISA. Se incuban placas de microtitulación con 100 µl/pocillo de tampón de revestimiento que contenía 0,5 µg de suero de antipéptido conector de scBoNT/A/ml durante 16 h a temperatura ambiente y después se lava tres veces con tampón de lavado. Se añade disolución de bloqueo 200 µl/pocillo a las placas de microtitulación y se incuban durante 1 h a temperatura ambiente. Se emplea el antígeno scBoNT/A (dilución en serie en tampón de muestras; concentración pg/ml) como patrón de calibración y las placas de microtitulación se incuban con patrón de calibración 100 µl/pocillo. Se diluyen BoNT/B o BoNT/E, respectivamente, en tampón de muestras y se aplican a la placa de microtitulación a un volumen de 100 µl/pocillo. Ambas sustancias se aplican en exceso y se emplea una dilución de 200 ng/ml. Las muestras y los patrones se incuban durante 2 h a 37 °C. Las placas de microtitulación se lavan tres veces con tampón de lavado. Se añaden 100 µl de tampón de detección/pocillo y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente. Después las placas de microtitulación se lavan tres veces con tampón de lavado. Posteriormente, se realiza la incubación con 100 µl/pocillo del anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente. Después las placas de microtitulación se lavan tres veces con tampón de lavado. La reacción de detección se inicia añadiendo 100 µl de sustrato/pocillo. Después de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detiene añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 2 M/pocillo y se determina la absorbancia a 450 nm. Para la determinación de la especificidad, se calculan las concentraciones de BoNT/b y BoNT/E mediante estandarización. Mediante el cálculo de la tasa de recuperación, puede determinarse la especificidad de los antipéptidos conectores scBoNT/A por los serotipos B y E. Cuanto más baja sea la tasa de recuperación, menor es la reactividad cruzada y mejor es la especificidad del suero con respecto a scBoNT/A.

b) Especificidad del antipéptido conector de scBoNT/A con respecto a BoNT/A bicatenaria: Para la determinación de la especificidad del antisuero con respecto a BoNT/A bicatenaria activada se realiza una detección inmunohistológica mediante transferencia Western. Una muestra de NT (scBoNT/A al menos 50 ng, la BoNT/A bicatenaria depende de la muestra usada) se separa bajo condiciones reductoras mediante SDS-PAGE según su peso molecular en scBoNT/A, LC y HC (BoNT/A bicatenaria). Las proteínas después se transfirieron sobre una membrana de PVDF. La membrana se bloquea con 20 ml de tampón de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. El tampón de bloqueo se retira y se añaden 20 ml de disolución del anticuerpo primario que contiene suero de antipéptido conector de scBoNT/A 0,005 µg/ml. El anticuerpo primario se incuba durante la noche a 4 °C. La disolución que contiene anticuerpo se retira y la membrana se lava tres veces durante 30 minutos con 20 ml de tampón de lavado a 37 °C. Después la membrana se incuba durante 3 h a temperatura ambiente con 20 ml del anticuerpo secundario a una concentración de 0,4 µg/ml. La disolución del anticuerpo secundario se retira y la membrana se lava tres veces durante 30 minutos con 20 ml de tampón de lavado a 37 °C. Además, la membrana se lava una vez con 20 ml de tampón TRIS 25 mM durante 5 minutos a temperatura ambiente.

La reacción de detección se realiza añadiendo el sustrato. El sustrato se incuba durante 15 minutos y la reacción de color se detiene añadiendo agua. La especificidad se determina mediante la tinción de la banda de scBoNT/A a 150 kDa. Se determina la especificidad del antipéptido conector cuando solo se detecta la banda específica de 150 kDa, pero no se detecta la banda específica de BoNT/A bicatenaria a 100 kDa (HC) y 50 kDa (LC). La figura 3 muestra, en el carril 3, la especificidad para la scBoNT/A de 150 kDa de una preparación de BoNT/A (muestra de NT, véase anteriormente). No se observan bandas a 100 kDa o 50 kDa, solo se reconoce la scBoNT/A. Para comparar, en el carril 4, se muestra una mezcla de scBoNT/A parcialmente procesada y no procesada, y el carril 5 muestra un control de scBoNT/A que no puede romperse. El tampón control se muestra en el carril 2.

Listado de secuencias

50 <110> Merz Pharma GmbH & Co. KGaA

<120> Medios y métodos para fabricar una neurotoxina altamente pura

<130> MP65985PC

55 <160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum
 5 <400> 1
 Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum
 <400> 2
 Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys
 1 5 10
 15 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum
 20 <400> 3
 Ser Leu Tyr Asn Lys
 1 5
 <210> 4
 25 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum
 <400> 4
 Asn Ser Arg
 30 1
 <210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 35 <213> Clostridium botulinum
 <400> 5
 Gly Ile Arg
 1
 40 <210> 6
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum
 45 <400> 6
 Lys Gly Thr Lys
 1
 <210> 7
 <211> 4
 50 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum
 <400> 7
 Asn Gly Thr Lys
 1
 55 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Clostridium tetani
 60

<400> 8
 Glu Asn Leu Tyr Asn Arg
 1 5

5
 <210> 9
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum

<400> 9
 Lys Leu Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu
 1 5 10 15

10
 Asp Lys Gly Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val
 20 25 30

15
 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum

<400> 10
 Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys Ile Asp Val
 1 5 10 15

20
 <210> 11
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> clostridium botulinum

25
 <400> 11
 Thr Lys Phe Cys His Lys Ala Ile Asp Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Lys
 1 5 10 15

Thr Leu Asp Cys Arg Glu Leu Leu Val
 20 25

30
 <210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum

35
 <400> 12
 Thr Lys Val Cys Leu Arg Leu Thr Lys Asn Ser Arg Asp Asp Ser Thr
 1 5 10 15

Cys Ile Lys Val
 20

40
 <210> 13
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum

<400> 13
 Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser
 1 5 10 15

45
 Ile Cys Ile Glu Ile
 20

<210> 14
 <211> 23
 <212> PRT

ES 2 705 485 T3

<213> Clostridium botulinum

<400> 14

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

Pro Arg Leu Cys Ile Arg Val
20

5

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

10

<400> 15

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

Gln Cys Ile Ile Val
20

15

<210> 16

<211> 35

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 16

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

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

20

Ile Lys Ile
35

<210> 17

<211> 1296

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

25

<400> 17

ES 2 705 485 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
 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

ES 2 705 485 T3

195	200	205
Gly Ala 210	Gly Lys Phe Ala Thr 215	Asp Pro Ala Val Thr 220
Leu 225	Ile His Ala Gly His 230	Arg Leu Tyr Gly Ile 235
	Ala Ile Asn Pro Asn 240	
Arg Val Phe Lys 245	Val Asn Thr Asn Ala Tyr 250	Tyr Glu Met Ser Gly 255
Glu Val Ser Phe 260	Glu Glu Leu Arg Thr 265	Phe Gly Gly His Asp 270
	Ala Lys	
Phe Ile Asp 275	Ser Leu Gln Glu Asn 280	Glu Phe Arg Leu Tyr 285
	Tyr Tyr Asn	
Lys Phe 290	Lys Asp Ile Ala Ser 295	Thr Leu Asn Lys Ala 300
	Lys Ser Ile Val	
Gly Thr 305	Thr Ala Ser Leu 310	Gln Tyr Met Lys Asn 315
	Val Phe Lys Glu Lys 320	
Tyr Leu Leu Ser 325	Glu Asp Thr Ser Gly Lys 330	Phe Ser Val Asp Lys 335
	Leu	
Lys Phe Asp 340	Lys Leu Tyr Lys Met Leu 345	Thr Glu Ile Tyr Thr 350
	Glu Asp	
Asn Phe Val 355	Lys Phe Phe Lys Val 360	Leu Asn Arg Lys Thr 365
	Tyr Leu Asn	
Phe Asp 370	Lys Ala Val Phe Lys 375	Ile Asn Ile Val Pro 380
	Lys Val Asn Tyr	
Thr Ile Tyr Asp Gly 385	Phe Asn Leu Arg Asn 390	Thr Asn Leu Ala Ala Asn 400
Phe Asn Gly Gln 405	Asn Thr Glu Ile Asn 410	Met Asn Phe Thr Lys 415
	Leu	
Lys Asn Phe Thr 420	Gly Leu Phe Glu Phe 425	Tyr Lys Leu Leu Cys 430
	Val Arg	
Gly Ile 435	Ile Thr Ser Lys Thr Lys 440	Ser Leu Asp Lys Gly 445
	Tyr Asn Lys	
Ala Leu 450	Asn Asp Leu Cys Ile 455	Lys Val Asn Asn Trp 460
	Asp Leu Phe Phe	
Ser Pro Ser Glu Asp 465	Asn Phe Thr Asn Asp Leu 475	Asn Lys Gly Glu Glu 480

ES 2 705 485 T3

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
 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

ES 2 705 485 T3

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
 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

ES 2 705 485 T3

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
 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

5 <210> 18
 <211> 1291
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum

ES 2 705 485 T3

<400> 18

```

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

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

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

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

Ile Phe Asn Arg Asp Val Cys Glu Tyr Tyr Asp Pro Asp Tyr Leu Asn
65     70     75     80

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

```

ES 2 705 485 T3

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
 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

ES 2 705 485 T3

Leu Ile Ser Lys Ile Glu Leu Pro Ser Glu Asn Thr Glu Ser Leu Thr
 500 505 510
 Asp Phe Asn Val Asp Val Pro Val Tyr Glu Lys Gln Pro Ala Ile Lys
 515 520 525
 Lys Ile Phe Thr Asp Glu Asn Thr Ile Phe Gln Tyr Leu Tyr Ser Gln
 530 535 540
 Thr Phe Pro Leu Asp Ile Arg Asp Ile Ser Leu Thr Ser Ser Phe Asp
 545 550 555 560
 Asp Ala Leu Leu Phe Ser Asn Lys Val Tyr Ser Phe Phe Ser Met Asp
 565 570 575
 Tyr Ile Lys Thr Ala Asn Lys Val Val Glu Ala Gly Leu Phe Ala Gly
 580 585 590
 Trp Val Lys Gln Ile Val Asn Asp Phe Val Ile Glu Ala Asn Lys Ser
 595 600 605
 Asn Thr Met Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr Ile
 610 615 620
 Gly Leu Ala Leu Asn Val Gly Asn Glu Thr Ala Lys Gly Asn Phe Glu
 625 630 635 640
 Asn Ala Phe Glu Ile Ala Gly Ala Ser Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro
 645 650 655
 Glu Leu Leu Ile Pro Val Val Gly Ala Phe Leu Leu Glu Ser Tyr Ile
 660 665 670
 Asp Asn Lys Asn Lys Ile Ile Lys Thr Ile Asp Asn Ala Leu Thr Lys
 675 680 685
 Arg Asn Glu Lys Trp Ser Asp Met Tyr Gly Leu Ile Val Ala Gln Trp
 690 695 700
 Leu Ser Thr Val Asn Thr Gln Phe Tyr Thr Ile Lys Glu Gly Met Tyr
 705 710 715 720
 Lys Ala Leu Asn Tyr Gln Ala Gln Ala Leu Glu Glu Ile Ile Lys Tyr
 725 730 735
 Arg Tyr Asn Ile Tyr Ser Glu Lys Glu Lys Ser Asn Ile Asn Ile Asp
 740 745 750
 Phe Asn Asp Ile Asn Ser Lys Leu Asn Glu Gly Ile Asn Gln Ala Ile
 755 760 765
 Asp Asn Ile Asn Asn Phe Ile Asn Gly Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met

ES 2 705 485 T3

770	775	780
Lys 785	Lys Met Ile Pro Leu 790	Ala Val Glu Lys Leu 795
	Leu Asp Phe Asp Asn 800	
Thr	Leu Lys Lys Asn 805	Leu Leu Asn Tyr Ile 810
	Asp Glu Asn Lys Leu 815	
Leu	Ile Gly Ser Ala Glu Tyr Glu 825	Lys Ser Lys Val Asn Lys 830
	Tyr Leu	
Lys Thr	Ile 835	Met Pro Phe Asp Leu 840
	Ser Ile Tyr Thr Asn 845	Asp Thr Ile
Leu	Ile Glu Met Phe Asn Lys 855	Tyr Asn Ser Glu Ile 860
	Leu Asn Asn Ile	
Ile 865	Leu Asn Leu Arg Tyr 870	Lys Asp Asn Asn Leu 875
	Ile Asp Leu Ser Gly 880	
Tyr Gly Ala Lys	Val 885	Glu Val Tyr Asp Gly 890
	Val Glu Leu Asn Asp Lys 895	
Asn Gln Phe	Lys 900	Leu Thr Ser Ser Ala 905
	Asn Ser Lys Ile Arg 910	Val Thr
Gln Asn Gln Asn Ile Ile Phe	Asn 920	Ser Val Phe Leu Asp 925
	Phe Ser Val	
Ser Phe Trp Ile Arg Ile	Pro 935	Lys Tyr Lys Asn Asp 940
	Gly Ile Gln Asn	
Tyr 945	Ile His Asn Glu Tyr 950	Thr Ile Ile Asn Cys 955
	Met Lys Asn Asn Ser 960	
Gly Trp Lys Ile	Ser 965	Ile Arg Gly Asn Arg 970
	Ile Ile Trp Thr Leu Ile 975	
Asp Ile Asn Gly	Lys 980	Thr Lys Ser Val Phe 985
	Phe Glu Tyr Asn 990	Ile Arg
Glu Asp Ile Ser Glu Tyr Ile	Asn 1000	Arg Trp Phe Phe Val 1005
	Thr Ile Thr	
Asn Asn Leu Asn Asn Ala Lys	Ile 1015	Tyr Ile Asn Gly 1020
	Lys Leu Glu	
Ser Asn Thr Asp Ile Lys Asp	Ile 1030	Arg Glu Val Ile 1035
	Ala Asn Gly	
Glu Ile Ile Phe Lys Leu Asp	Gly 1045	Asp Ile Asp Arg 1050
	Thr Gln Phe	

ES 2 705 485 T3

Ile Trp Met Lys Tyr Phe Ser Ile Phe Asn Thr Glu Leu Ser Gln
1055 1060 1065

Ser Asn Ile Glu Glu Arg Tyr Lys Ile Gln Ser Tyr Ser Glu Tyr
1070 1075 1080

Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Met Tyr Asn Lys Glu Tyr
1085 1090 1095

Tyr Met Phe Asn Ala Gly Asn Lys Asn Ser Tyr Ile Lys Leu Lys
1100 1105 1110

Lys Asp Ser Pro Val Gly Glu Ile Leu Thr Arg Ser Lys Tyr Asn
1115 1120 1125

Gln Asn Ser Lys Tyr Ile Asn Tyr Arg Asp Leu Tyr Ile Gly Glu
1130 1135 1140

Lys Phe Ile Ile Arg Arg Lys Ser Asn Ser Gln Ser Ile Asn Asp
1145 1150 1155

Asp Ile Val Arg Lys Glu Asp Tyr Ile Tyr Leu Asp Phe Phe Asn
1160 1165 1170

Leu Asn Gln Glu Trp Arg Val Tyr Thr Tyr Lys Tyr Phe Lys Lys
1175 1180 1185

Glu Glu Glu Lys Leu Phe Leu Ala Pro Ile Ser Asp Ser Asp Glu
1190 1195 1200

Phe Tyr Asn Thr Ile Gln Ile Lys Glu Tyr Asp Glu Gln Pro Thr
1205 1210 1215

Tyr Ser Cys Gln Leu Leu Phe Lys Lys Asp Glu Glu Ser Thr Asp
1220 1225 1230

Glu Ile Gly Leu Ile Gly Ile His Arg Phe Tyr Glu Ser Gly Ile
1235 1240 1245

Val Phe Glu Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr
1250 1255 1260

Leu Lys Glu Val Lys Arg Lys Pro Tyr Asn Leu Lys Leu Gly Cys
1265 1270 1275

Asn Trp Gln Phe Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Thr Glu
1280 1285 1290

<210> 19
<211> 1280
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum
<400> 19

ES 2 705 485 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 Ile Gly Asn Ile Trp Val Ile Pro Asp
 35 40 45
 Arg Phe Ser Arg Asp Ser Asn Pro Asn Leu Asn Lys Pro Pro Arg Val
 50 55 60
 Thr Ser Pro Lys Ser Gly Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
 65 70 75 80
 Ser Glu Lys Asp Thr Phe Leu Lys Glu Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg
 85 90 95
 Ile Asn Ser Arg Glu Ile Gly Glu Glu Leu Ile Tyr Arg Leu Ala Thr
 100 105 110
 Asp Ile Pro Phe Pro Gly Asn Asn Asn Thr Pro Ile Asn Thr Phe Asp
 115 120 125
 Phe Asp Val Asp Phe Asn Ser Val Asp Val Lys Thr Arg Gln Gly Asn
 130 135 140
 Asn Trp Val Lys Thr Gly Ser Ile Asn Pro Ser Val Ile Ile Thr Gly
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Asn Ile Ile Asp Pro Glu Thr Ser Thr Phe Lys Leu Thr
 165 170 175
 Asn Asn Thr Phe Ala Ala Gln Glu Gly Phe Gly Ala Leu Ser Ile Ile
 180 185 190
 Ser Ile Ser Pro Arg Phe Met Leu Thr Tyr Ser Asn Ala Thr Asn Asn
 195 200 205
 Val Gly Glu Gly Arg Phe Ser Lys Ser Glu Phe Cys Met Asp Pro Ile
 210 215 220
 Leu Ile Leu Met His Glu Leu Asn His Ala Met His Asn Leu Tyr Gly
 225 230 235 240
 Ile Ala Ile Pro Asn Asp Gln Arg Ile Ser Ser Val Thr Ser Asn Ile
 245 250 255
 Phe Tyr Ser Gln Tyr Lys Val Lys Leu Glu Tyr Ala Glu Ile Tyr Ala

ES 2 705 485 T3

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

ES 2 705 485 T3

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 Thr Ser Ile Glu Glu Ala Leu Asp Asn Ser Gly
 565 570 575
 Lys Val Tyr Thr Tyr Phe Pro Lys Leu Ala Asp Lys Val Asn Thr 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 Gln 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 Ile Gly Thr Trp Leu Ser Arg Ile Thr Thr Gln Phe
 705 710 715 720
 Asn Asn Ile Ser Tyr Gln Met Tyr Asp Ser Leu Asn Tyr Gln Ala Asp
 725 730 735
 Ala Ile Lys Asp 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
 755 760 765
 Asp Ile 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 Lys Phe Asp Leu Lys Thr Lys Thr Glu Leu Ile Asn
 805 810 815

ES 2 705 485 T3

Leu Ile Asp Ser His Asn Ile Ile Leu Val Gly Glu Val Asp Arg Leu
 820 825 830
 Lys Ala Lys Val Asn Glu Ser Phe Glu Asn Thr Ile Pro Phe Asn Ile
 835 840 845
 Phe Ser Tyr Thr Asn Asn Ser Leu Leu Lys Asp Ile Ile Asn Glu Tyr
 850 855 860
 Phe Asn Ser Ile Asn Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Lys Lys
 865 870 875 880
 Asn Ala Leu Val Asp Thr Ser Gly Tyr Asn Ala Glu Val Arg Leu Glu
 885 890 895
 Gly Asp Val Gln Val Asn Thr Ile Tyr Thr Asn Asp Phe Lys Leu Ser
 900 905 910
 Ser Ser Gly Asp Lys Ile Ile Val Asn Leu Asn Asn Asn Ile Leu Tyr
 915 920 925
 Ser Ala Ile Tyr Glu Asn Ser Ser Val Ser Phe Trp Ile Lys Ile Ser
 930 935 940
 Lys Asp Leu Thr Asn Ser His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Ser Ile
 945 950 955 960
 Lys Gln Asn Ser Gly Trp Lys Leu Cys Ile Arg Asn Gly Asn Ile Glu
 965 970 975
 Trp Ile Leu Gln Asp Ile Asn Arg Lys Tyr Lys Ser Leu Ile Phe Asp
 980 985 990
 Tyr Ser Glu Ser Leu Ser His Thr Gly Tyr Thr Asn Lys Trp Phe Phe
 995 1000 1005
 Val Thr Ile Thr Asn Asn Ile Met Gly Tyr Met Lys Leu Tyr Ile
 1010 1015 1020
 Asn Gly Glu Leu Lys Gln Ser Glu Arg Ile Glu Asp Leu Asn Glu
 1025 1030 1035
 Val Lys Leu Asp Lys Thr Ile Val Phe Gly Ile Asp Glu Asn Ile
 1040 1045 1050
 Asp Glu Asn Gln Met Leu Trp Ile Arg Asp Phe Asn Ile Phe Ser
 1055 1060 1065
 Lys Glu Leu Ser Asn Glu Asp Ile Asn Ile Val Tyr Glu Gly Gln
 1070 1075 1080

ES 2 705 485 T3

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

<210> 20
 <211> 1285
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum

<400> 20
 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

ES 2 705 485 T3

Pro Val Lys Ala Phe Met Ile Thr Gln Asn Ile Trp Val Ile Pro Glu
 35 40 45
 Arg Phe Ser Ser Asp Thr Asn Pro Ser Leu Ser Lys Pro Pro Arg Pro
 50 55 60
 Thr Ser Lys Tyr Gln Ser Tyr Tyr Asp Pro Ser Tyr Leu Ser Thr Asp
 65 70 75 80
 Glu Gln Lys Asp Thr Phe Leu Lys Gly Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg
 85 90 95
 Ile Asn Glu Arg Asp Ile Gly Lys Lys Leu Ile Asn Tyr Leu Val Val
 100 105 110
 Gly Ser Pro Phe Met Gly Asp Ser Ser Thr Pro Glu Asp Thr Phe Asp
 115 120 125
 Phe Thr Arg His Thr Thr Asn Ile Ala Val Glu Lys Phe Glu Asn Gly
 130 135 140
 Ser Trp Lys Val Thr Asn Ile Ile Thr Pro Ser Val Leu Ile Phe Gly
 145 150 155 160
 Pro Leu Pro Asn Ile Leu Asp Tyr Thr Ala Ser Leu Thr Leu Gln Gly
 165 170 175
 Gln Gln Ser Asn Pro Ser Phe Glu Gly Phe Gly Thr Leu Ser Ile Leu
 180 185 190
 Lys Val Ala Pro Glu Phe Leu Leu Thr Phe Ser Asp Val Thr Ser Asn
 195 200 205
 Gln Ser Ser Ala Val Leu Gly Lys Ser Ile Phe Cys Met Asp Pro Val
 210 215 220
 Ile Ala Leu Met His Glu Leu Thr His Ser Leu His Gln Leu Tyr Gly
 225 230 235 240
 Ile Asn Ile Pro Ser Asp Lys Arg Ile Arg Pro Gln Val Ser Glu Gly
 245 250 255
 Phe Phe Ser Gln Asp Gly Pro Asn Val Gln Phe Glu Glu Leu Tyr Thr
 260 265 270
 Phe Gly Gly Ser Asp Val Glu Ile Ile Pro Gln Ile Glu Arg Leu Gln
 275 280 285
 Leu Arg Glu Lys Ala Leu Gly His Tyr Lys Asp Ile Ala Lys Arg Leu
 290 295 300

ES 2 705 485 T3

Asn Asn Ile Asn Lys Thr Ile Pro Ser Ser Trp Ser Ser Asn Ile Asp
 305 310 315 320
 Lys Tyr Lys Lys Ile Phe Ser Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Lys Asp Asn
 325 330 335
 Thr Gly Asn Phe Val Val Asn Ile Asp Lys Phe Asn Ser Leu Tyr Ser
 340 345 350
 Asp Leu Thr Asn Val Met Ser Glu Val Val Tyr Ser Ser Gln Tyr Asn
 355 360 365
 Val Lys Asn Arg Thr His Tyr Phe Ser Lys His Tyr Leu Pro Val Phe
 370 375 380
 Ala Asn Ile Leu Asp Asp Asn Ile Tyr Thr Ile Ile Asn Gly Phe Asn
 385 390 395 400
 Leu Thr Thr Lys Gly Phe Asn Ile Glu Asn Ser Gly Gln Asn Ile Glu
 405 410 415
 Arg Asn Pro Ala Leu Gln Lys Leu Ser Ser Glu Ser Val Val Asp Leu
 420 425 430
 Phe Thr Lys Val Cys Leu Arg Leu Thr Arg Asn Ser Arg Asp Asp Ser
 435 440 445
 Thr Cys Ile Gln Val Lys Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Val Ala Asp Lys
 450 455 460
 Asp Ser Ile Ser Gln Glu Ile Phe Glu Ser Gln Ile Ile Thr Asp Glu
 465 470 475 480
 Thr Asn Val Glu Asn Tyr Ser Asp Asn Phe Ser Leu Asp Glu Ser Ile
 485 490 495
 Leu Asp Ala Lys Val Pro Thr Asn Pro Glu Ala Val Asp Pro Leu Leu
 500 505 510
 Pro Asn Val Asn Met Glu Pro Leu Asn Val Pro Gly Glu Glu Glu Val
 515 520 525
 Phe Tyr Asp Asp Ile Thr Lys Asp Val Asp Tyr Leu Asn Ser Tyr Tyr
 530 535 540
 Tyr Leu Glu Ala Gln Lys Leu Ser Asn Asn Val Glu Asn Ile Thr Leu
 545 550 555 560
 Thr Thr Ser Val Glu Glu Ala Leu Gly Tyr Ser Asn Lys Ile Tyr Thr
 565 570 575

ES 2 705 485 T3

Phe Leu Pro Ser Leu Ala Glu Lys Val Asn Lys Gly Val Gln Ala Gly
 580 585 590
 Leu Phe Leu Asn Trp Ala Asn Glu Val Val Glu Asp Phe Thr Thr Asn
 595 600 605
 Ile Met Lys Lys Asp Thr Leu Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Ala Ile
 610 615 620
 Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Ser Ala Leu Arg
 625 630 635 640
 Gly Asn Phe Lys Gln Ala Phe Ala Thr Ala Gly Val Ala Phe Leu Leu
 645 650 655
 Glu Gly Phe Pro Glu Phe Thr Ile Pro Ala Leu Gly Val Phe Thr Phe
 660 665 670
 Tyr Ser Ser Ile Gln Glu Arg Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile Glu Asn
 675 680 685
 Cys Leu Glu Gln Arg Val Lys Arg Trp Lys Asp Ser Tyr Gln Trp Met
 690 695 700
 Val Ser Asn Trp Leu Ser Arg Ile Thr Thr Arg Phe Asn His Ile Ser
 705 710 715 720
 Tyr Gln Met Tyr Asp Ser Leu Ser Tyr Gln Ala Asp Ala Ile Lys Ala
 725 730 735
 Lys Ile Asp Leu Glu Tyr Lys Lys Tyr Ser Gly Ser Asp Lys Glu Asn
 740 745 750
 Ile Lys Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Asn Ser Leu Asp Val Lys Ile
 755 760 765
 Ser Glu Ala Met Asn Asn Ile Asn Lys Phe Ile Arg Glu Cys Ser Val
 770 775 780
 Thr Tyr Leu Phe Lys Asn Met Leu Pro Lys Val Ile Asp Glu Leu Asn
 785 790 795 800
 Lys Phe Asp Leu Lys Thr Lys Thr Glu Leu Ile Asn Leu Ile Asp Ser
 805 810 815
 His Asn Ile Ile Leu Val Gly Glu Val Asp Arg Leu Lys Ala Lys Val
 820 825 830
 Asn Glu Ser Phe Glu Asn Thr Ile Pro Phe Asn Ile Phe Ser Tyr Thr
 835 840 845
 Asn Asn Ser Leu Leu Lys Asp Met Ile Asn Glu Tyr Phe Asn Ser Ile

ES 2 705 485 T3

850	855	860
Asn 865	Asp Ser Lys Ile Leu 870	Ser Leu Gln Asn Lys 875 Lys Asn Thr Leu Met 880
Asp Thr Ser Gly Tyr 885	Asn Ala Glu Val Arg 890	Val Glu Gly Asn Val Gln 895
Leu Asn Pro Ile 900	Phe Pro Phe Asp Phe 905	Lys Leu Gly Ser Ser Gly Asp 910
Asp Arg Gly 915	Lys Val Ile Val Thr 920	Gln Asn Glu Asn Ile Val Tyr Asn 925
Ala Met Tyr Glu Ser Phe 930	Ser Ile Ser Phe Trp 935	Ile Arg Ile Asn Lys 940
Trp 945	Val Ser Asn Leu Pro 950	Gly Tyr Thr Ile Ile Asp Ser Val Lys Asn 960
Asn Ser Gly Trp 965	Ser Ile Gly Ile Ile Ser 970	Asn Phe Leu Val Phe Thr 975
Leu Lys Gln 980	Asn Glu Asn Ser Glu Gln 985	Asp Ile Asn Phe Ser Tyr Asp 990
Ile Ser Lys 995	Asn Ala Ala Gly Tyr 1000	Asn Lys Trp Phe Phe Val Thr Ile 1005
Thr Thr 1010	Asn Met Met Gly Asn 1015	Met Met Ile Tyr Ile Asn Gly Lys 1020
Leu Ile 1025	Asp Thr Ile Lys Val 1030	Lys Glu Leu Thr Gly Ile Asn Phe 1035
Ser Lys 1040	Thr Ile Thr Phe Gln 1045	Met Asn Lys Ile Pro Asn Thr Gly 1050
Leu Ile 1055	Thr Ser Asp Ser Asp 1060	Asn Ile Asn Met Trp Ile Arg Asp 1065
Phe Tyr 1070	Ile Phe Ala Lys Glu 1075	Leu Asp Asp Lys Asp Ile Asn Ile 1080
Leu Phe 1085	Asn Ser Leu Gln Tyr 1090	Thr Asn Val Val Lys Asp Tyr Trp 1095
Gly Asn 1100	Asp Leu Arg Tyr Asp 1105	Lys Glu Tyr Tyr Met Ile Asn Val 1110
Asn Tyr 1115	Met Asn Arg Tyr Met 1120	Ser Lys Lys Gly Asn Gly Ile Val 1125

ES 2 705 485 T3

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

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

<400> 21
 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

ES 2 705 485 T3

Asp Ser Ser Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Gln Ser Asp Glu Glu Lys
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Leu Lys Ile Val Thr Lys Ile Phe Asn Arg Ile Asn Asn
 85 90 95
 Asn Leu Ser Gly Gly Ile Leu Leu Glu Glu Leu Ser Lys Ala Asn Pro
 100 105 110
 Tyr Leu Gly Asn Asp Asn Thr Pro Asp Asn Gln Phe His Ile Gly Asp
 115 120 125
 Ala Ser Ala Val Glu Ile Lys Phe Ser Asn Gly Ser Gln Asp Ile Leu
 130 135 140
 Leu Pro Asn Val Ile Ile Met Gly Ala Glu Pro Asp Leu Phe Glu Thr
 145 150 155 160
 Asn Ser Ser Asn Ile Ser Leu Arg Asn Asn Tyr Met Pro Ser Asn His
 165 170 175
 Arg Phe Gly Ser Ile Ala Ile Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Ser Phe
 180 185 190
 Arg Phe Asn Asp Asn Cys Met Asn Glu Phe Ile Gln Asp Pro Ala Leu
 195 200 205
 Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Ser Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala
 210 215 220
 Lys Gly Ile Thr Thr Lys Tyr Thr Ile Thr Gln Lys Gln Asn Pro Leu
 225 230 235 240
 Ile Thr Asn Ile Arg Gly Thr Asn Ile Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly
 245 250 255
 Gly Thr Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Gln Ser Asn Asp Ile Tyr
 260 265 270
 Thr Asn Leu Leu Ala Asp Tyr Lys Lys Ile Ala Ser Lys Leu Ser Lys
 275 280 285
 Val Gln Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu
 290 295 300
 Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn
 305 310 315 320
 Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu
 325 330 335
 Phe Asp Leu Arg Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile

ES 2 705 485 T3

340										345										350																																			
Gly	Gln	Tyr	Lys	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ser	Asn	Leu	Leu	Asn	Asp	Ser	Ile																																								
		355					360					365																																											
Tyr	Asn	Ile	Ser	Glu	Gly	Tyr	Asn	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Val	Asn	Phe																																								
	370					375					380																																												
Arg	Gly	Gln	Asn	Ala	Asn	Leu	Asn	Pro	Arg	Ile	Ile	Thr	Pro	Ile	Thr																																								
	385				390					395																																													
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 2 705 485 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 Ile Ile Asn Glu Val Lys Ile Asn Lys Leu Arg Glu
 770 775 780
 Tyr Asp Glu Asn Val Lys Thr Tyr Leu Leu Asn Tyr Ile Ile Gln His
 785 790 795 800
 Gly Ser Ile Leu Gly Glu Ser Gln Gln Glu Leu Asn Ser Met Val Thr
 805 810 815
 Asp Thr Leu Asn Asn Ser Ile Pro Phe Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Asp
 820 825 830
 Asp Lys Ile Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Lys Phe Phe Lys Arg Ile Lys
 835 840 845
 Ser Ser Ser Val Leu Asn Met Arg Tyr Lys Asn Asp Lys Tyr Val Asp
 850 855 860
 Thr Ser Gly Tyr Asp Ser Asn Ile Asn Ile Asn Gly Asp Val Tyr Lys
 865 870 875 880
 Tyr Pro Thr Asn Lys Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Asp Lys Leu Ser
 885 890 895

ES 2 705 485 T3

Glu Val Asn Ile Ser Gln Asn Asp Tyr Ile Ile Tyr Asp Asn Lys Tyr
 900 905 910
 Lys Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Asn Tyr Asp Asn
 915 920 925
 Lys Ile Val Asn Val Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Arg
 930 935 940
 Asp Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn His Asn Glu Ile Ile
 945 950 955 960
 Trp Thr Phe Glu Asp Asn Arg Gly Ile Asn Gln Lys Leu Ala Phe Asn
 965 970 975
 Tyr Gly Asn Ala Asn Gly Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe
 980 985 990
 Val Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Asn
 995 1000 1005
 Gly Asn Leu Ile Asp Gln Lys Ser Ile Leu Asn Leu Gly Asn Ile
 1010 1015 1020
 His Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Asn Cys Ser Tyr
 1025 1030 1035
 Thr Arg Tyr Ile Gly Ile Arg Tyr Phe Asn Ile Phe Asp Lys Glu
 1040 1045 1050
 Leu Asp Glu Thr Glu Ile Gln Thr Leu Tyr Ser Asn Glu Pro Asn
 1055 1060 1065
 Thr Asn Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asp
 1070 1075 1080
 Lys Glu Tyr Tyr Leu Leu Asn Val Leu Lys Pro Asn Asn Phe Ile
 1085 1090 1095
 Asp Arg Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ile Asn Asn Ile Arg Ser
 1100 1105 1110
 Thr Ile Leu Leu Ala Asn Arg Leu Tyr Ser Gly Ile Lys Val Lys
 1115 1120 1125
 Ile Gln Arg Val Asn Asn Ser Ser Thr Asn Asp Asn Leu Val Arg
 1130 1135 1140
 Lys Asn Asp Gln Val Tyr Ile Asn Phe Val Ala Ser Lys Thr His
 1145 1150 1155

ES 2 705 485 T3

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

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

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

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

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

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

Gln Glu Lys
1250

<210> 22

<211> 1280

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

10

ES 2 705 485 T3

Val Glu Ser Ser Ile Ile Ser Asn Leu Leu Val Leu Gly Ala Gly Pro
 145 150 155 160
 Asp Ile Phe Lys Ala Tyr Cys Thr Pro Leu Val Arg Phe Asn Lys Ser
 165 170 175
 Asp Lys Leu Ile Glu Pro Ser Asn His Gly Phe Gly Ser Ile Asn Ile
 180 185 190
 Leu Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Glu His Ile Phe Asn Asp Ile Ser Gly
 195 200 205
 Gly Asn His Asn Ser Thr Glu Ser Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ile Ser
 210 215 220
 Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala Lys
 225 230 235 240
 Ala Val Thr His Lys Glu Ser Leu Val Ala Glu Arg Gly Pro Leu Met
 245 250 255
 Ile Ala Glu Lys Pro Ile Arg Leu Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly Gly
 260 265 270
 Glu Asp Leu Asn Ile Ile Pro Ser Ala Met Lys Glu Lys Ile Tyr Asn
 275 280 285
 Asp Leu Leu Ala Asn Tyr Glu Lys Ile Ala Thr Arg Leu Arg Glu Val
 290 295 300
 Asn Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Asp Ile Asn Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe
 305 310 315 320
 Gln Trp Lys Tyr Gly Leu Asp Arg Asn Ala Asp Gly Ser Tyr Thr Val
 325 330 335
 Asn Arg Asn Lys Phe Asn Glu Ile Tyr Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr
 340 345 350
 Glu Ile Asp Leu Ala Asn Lys Phe Lys Val Lys Cys Arg Asn Thr Tyr
 355 360 365
 Phe Ile Lys Tyr Gly Phe Val Lys Val Pro Asn Leu Leu Asp Asp Asp
 370 375 380
 Ile Tyr Thr Val Ser Glu Gly Phe Asn Ile Gly Asn Leu Ala Val Asn
 385 390 395 400
 Asn Arg Gly Gln Asn Ile Asn Leu Asn Pro Lys Ile Ile Asp Ser Ile
 405 410 415

ES 2 705 485 T3

Pro Asp Lys Gly Leu Val Glu Lys Ile Ile Lys Phe Cys Lys Ser Ile
 420 425 430
 Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Gln Ser Pro Ser Leu Cys Ile Arg Val
 435 440 445
 Asn Asn Arg Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Ser Ser Tyr Asn Glu
 450 455 460
 Ser Asp Ile Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Thr Asn Leu Asn
 465 470 475 480
 Asn Asn Tyr Arg Asn Asn Leu Asp Glu Val Ile Leu Asp Tyr Asn Ser
 485 490 495
 Glu Thr Ile Pro Gln Ile Ser Asn Arg Thr Leu Asn Thr Leu Val Gln
 500 505 510
 Asp Asn Ser Tyr Val Pro Arg Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Glu Ile
 515 520 525
 Glu Glu Tyr Asp Val Val Asp Phe Asn Val Phe Phe Tyr Leu His Ala
 530 535 540
 Gln Lys Val Pro Glu Gly Glu Thr Asn Ile Ser Leu Thr Ser Ser Ile
 545 550 555 560
 Asp Thr Ala Leu Leu Glu Glu Ser Lys Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser
 565 570 575
 Glu Phe Ile Asp Thr Ile Asn Lys Pro Val Asn Ala Ala Leu Phe Ile
 580 585 590
 Asp Trp Ile Ser Lys Val Ile Arg Asp Phe Thr Thr Glu Ala Thr Gln
 595 600 605
 Lys Ser Thr Val Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr
 610 615 620
 Val Gly Leu Ala Leu Asn Ile Val Ile Glu Ala Glu Lys Gly Asn Phe
 625 630 635 640
 Glu Glu Ala Phe Glu Leu Leu Gly Ala Gly Ile Leu Leu Glu Phe Val
 645 650 655
 Pro Glu Leu Thr Ile Pro Val Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Tyr
 660 665 670
 Ile Asp Ser Tyr Glu Asn Lys Asn Lys Ala Ile Lys Ala Ile Asn Asn
 675 680 685

ES 2 705 485 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Tyr His Lys Leu Ile Leu Gly Glu Gln Thr Lys Glu Leu Ile Asp
820 825 830

Leu Val Thr Ser Thr Leu Asn Ser Ser Ile Pro Phe Glu Leu Ser Ser
835 840 845

Tyr Thr Asn Asp Lys Ile Leu Ile Ile Tyr Phe Asn Arg Leu Tyr Lys
850 855 860

Lys Ile Lys Asp Ser Ser Ile Leu Asp Met Arg Tyr Glu Asn Asn Lys
865 870 875 880

Phe Ile Asp Ile Ser Gly Tyr Gly Ser Asn Ile Ser Ile Asn Gly Asn
885 890 895

Val Tyr Ile Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Ser Gly
900 905 910

Arg Leu Ser Glu Val Asn Ile Ala Gln Asn Asn Asp Ile Ile Tyr Asn
915 920 925

Ser Arg Tyr Gln Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Thr Ile Pro Lys
930 935 940

His Tyr Arg Pro Met Asn Arg Asn Arg Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys
945 950 955 960

Met Gly Asn Asn Asn Ser Gly Trp Lys Ile Ser Leu Arg Thr Ile Arg

ES 2 705 485 T3

	965						970						975					
Asp	Cys	Glu	Ile 980	Ile	Trp	Thr	Leu	Gln 985	Asp	Thr	Ser	Gly	Asn 990	Lys	Glu			
Lys	Leu	Ile 995	Phe	Arg	Tyr	Glu	Glu 1000	Leu	Ala	Ser	Ile	Ser 1005	Asp	Tyr	Ile			
Asn	Lys 1010	Trp	Ile	Phe	Val	Thr 1015	Ile	Thr	Asn	Asn	Arg 1020	Leu	Gly	Asn				
Ser	Arg 1025	Ile	Tyr	Ile	Asn	Gly 1030	Asn	Leu	Ile	Val	Glu 1035	Lys	Ser	Ile				
Ser	Asn 1040	Leu	Gly	Asp	Ile	His 1045	Val	Ser	Asp	Asn	Ile 1050	Leu	Phe	Lys				
Ile	Val 1055	Gly	Cys	Asp	Asp	Glu 1060	Thr	Tyr	Val	Gly	Ile 1065	Arg	Tyr	Phe				
Lys	Val 1070	Phe	Asn	Thr	Glu	Leu 1075	Asp	Lys	Thr	Glu	Ile 1080	Glu	Thr	Leu				
Tyr	Ser 1085	Asn	Glu	Pro	Asp	Pro 1090	Ser	Ile	Leu	Lys	Asp 1095	Tyr	Trp	Gly				
Asn	Tyr 1100	Leu	Leu	Tyr	Asn	Lys 1105	Lys	Tyr	Tyr	Leu	Phe 1110	Asn	Leu	Leu				
Arg	Lys 1115	Asp	Lys	Tyr	Ile	Thr 1120	Arg	Asn	Ser	Gly	Ile 1125	Leu	Asn	Ile				
Asn	Gln 1130	Gln	Arg	Gly	Val	Thr 1135	Gly	Gly	Ile	Ser	Val 1140	Phe	Leu	Asn				
Tyr	Lys 1145	Leu	Tyr	Glu	Gly	Val 1150	Glu	Val	Ile	Ile	Arg 1155	Lys	Asn	Ala				
Pro	Ile 1160	Asp	Ile	Ser	Asn	Thr 1165	Asp	Asn	Phe	Val	Arg 1170	Lys	Asn	Asp				
Leu	Ala 1175	Tyr	Ile	Asn	Val	Val 1180	Asp	His	Gly	Val	Glu 1185	Tyr	Arg	Leu				
Tyr	Ala 1190	Asp	Ile	Ser	Ile	Thr 1195	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile 1200	Ile	Lys	Leu				
Ile	Arg 1205	Thr	Ser	Asn	Pro	Asn 1210	Asp	Ser	Leu	Gly	Gln 1215	Ile	Ile	Val				
Met	Asp 1220	Ser	Ile	Gly	Asn	Asn 1225	Cys	Thr	Met	Asn	Phe 1230	Gln	Asn	Asn				

ES 2 705 485 T3

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

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

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

Lys Glu
1280

<210> 23

<211> 1297

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<220>

<221> característica miscelanea

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier amino ácido que ocurre naturalmente

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

10

15

ES 2 705 485 T3

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

ES 2 705 485 T3

Ile Ala Met Cys Lys Pro Val Met Tyr Lys Asn Thr Gly Lys Ser Glu
 435 440 445
 Gln Cys Ile Ile Val Asn Asn Glu Asp Leu Phe Phe Ile Ala Asn Lys
 450 455 460
 Asp Ser Phe Ser Lys Asp Leu Ala Lys Ala Glu Thr Ile Ala Tyr Asn
 465 470 475 480
 Thr Gln Asn Asn Thr Ile Glu Asn Asn Phe Ser Ile Asp Gln Leu Ile
 485 490 495
 Leu Asp Asn Asp Leu Ser Ser Gly Ile Asp Leu Pro Asn Glu Asn Thr
 500 505 510
 Glu Pro Phe Thr Asn Phe Asp Asp Ile Asp Ile Pro Val Tyr Ile Lys
 515 520 525
 Gln Ser Ala Leu Lys Lys Ile Phe Val Asp Gly Asp Ser Leu Phe Glu
 530 535 540
 Tyr Leu His Ala Gln Thr Phe Pro Ser Asn Ile Glu Asn Leu Gln Leu
 545 550 555
 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

ES 2 705 485 T3

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

ES 2 705 485 T3

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				
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				

ES 2 705 485 T3

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

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

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

Gly Trp Thr Glu
1295

<210> 24

<211> 1315

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 24

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

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

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

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

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 2 705 485 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
 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

ES 2 705 485 T3

450	455	460
Glu 465	Leu Cys Ile Lys Ile 470	Lys Asn Glu Asp Leu 475
	Thr Phe Ile Ala Glu 480	
Lys Asn Ser Phe Ser 485	Glu Glu Pro Phe Gln 490	Asp Glu Ile Val Ser Tyr 495
Asn Thr Lys Asn 500	Lys Pro Leu Asn Phe 505	Asn Tyr Ser Leu Asp 510
	Lys Ile	
Ile Val Asp 515	Tyr Asn Leu Gln Ser 520	Lys Ile Thr Leu Pro 525
	Asn Asp Arg	
Thr Thr Pro Val Thr Lys Gly 535	Ile Pro Tyr Ala Pro 540	Glu Tyr Lys Ser
Asn Ala Ala Ser Thr Ile 550	Glu Ile His Asn Ile 555	Asp Asp Asn Thr Ile 560
Tyr Gln Tyr Leu Tyr 565	Ala Gln Lys Ser Pro 570	Thr Thr Leu Gln Arg Ile 575
Thr Met Thr Asn 580	Ser Val Asp Asp Ala 585	Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile 590
Tyr Ser Tyr Phe Pro Ser Val Ile 600	Ser Lys Val Asn Gln Gly Ala Gln 605	
Gly Ile 610	Leu Phe Leu Gln Trp 615	Val Arg Asp Ile Ile 620
	Asp Asp Phe Thr	
Asn Glu Ser Ser Gln Lys 630	Thr Thr Ile Asp Lys 635	Ile Ser Asp Val Ser 640
Thr Ile Val Pro Tyr 645	Ile Gly Pro Ala Leu 650	Asn Ile Val Lys Gln Gly 655
Tyr Glu Gly Asn Phe Ile Gly Ala Leu 665	Glu Thr Thr Gly Val Val Leu 670	
Leu Leu Glu Tyr Ile Pro Glu Ile 680	Thr Leu Pro Val Ile 685	Ala Ala Leu
Ser Ile Ala Glu Ser Ser Thr 695	Gln Lys Glu Lys Ile 700	Ile Lys Thr Ile
Asp Asn Phe Leu Glu Lys 710	Arg Tyr Glu Lys Trp 715	Ile Glu Val Tyr Lys 720
Leu Val Lys Ala Lys 725	Trp Leu Gly Thr Val 730	Asn Thr Gln Phe Gln Lys 735

ES 2 705 485 T3

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
 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

ES 2 705 485 T3

Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg Asp Leu Pro Asp Lys Phe
 1010 1015 1020
 Asn Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe Ile Thr Ile Thr Asn
 1025 1030 1035
 Asp Arg Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn Gly Val Leu Met
 1040 1045 1050
 Gly Ser Ala Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg Glu Asp Asn
 1055 1060 1065
 Asn Ile Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn Asn Gln Tyr
 1070 1075 1080
 Val Ser Ile Asp Lys Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn Pro
 1085 1090 1095
 Lys Glu Ile Glu Lys Leu Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr Phe
 1100 1105 1110
 Leu Arg Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr
 1115 1120 1125
 Tyr Leu Ile Pro Val Ala Ser Ser Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys
 1130 1135 1140
 Asn Ile Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr Asn Ala Pro Ser Tyr Thr
 1145 1150 1155
 Asn Gly Lys Leu Asn Ile Tyr Tyr Arg Arg Leu Tyr Asn Gly Leu
 1160 1165 1170
 Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn Glu Ile Asp Ser
 1175 1180 1185
 Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Asn
 1190 1195 1200
 Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr Pro Lys Asp Gly Asn Ala Phe
 1205 1210 1215
 Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly Tyr Asn Ala Pro Gly
 1220 1225 1230
 Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val Lys Leu Arg Asp Leu
 1235 1240 1245
 Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn Ala
 1250 1255 1260

ES 2 705 485 T3

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

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

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

Asp Glu Gly Trp Thr Asn Asp
1310 1315

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<400> 25
Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys Ala
1 5 10

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> Tripéptido para purificación por afinidad 1

<400> 26
Glu Leu Asp Lys Tyr Asn Cys
1 5

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> Tripéptido para purificación por afinidad 2

<400> 27
Asn Ile Ser Leu Asp Leu Cys
1 5

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> Tripéptido para purificación por afinidad 3

<400> 28
Tyr Tyr Asn Lys Phe Cys
1 5

REIVINDICACIONES

1.- Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo que consiste en un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:1.

2.- El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho epítipo está comprendido en un polipéptido de neurotoxina BoNT/A proteolíticamente no procesado o parcialmente procesado.

3.- Un método para la fabricación de un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado y/o parcialmente procesado, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto un antisuero policlonal procedente de un animal no humano que ha sido inmunizado empleando un inmunógeno de péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO:25, con un péptido que tiene SEQ ID NO:25, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo que comprende el péptido mencionado anteriormente y un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado o parcialmente procesado;

b) retirar el complejo formado en la etapa a) del antisuero; y

c) liberar el anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de neurotoxina BoNT/A no procesado o parcialmente procesado de dicho complejo,

en el que dicho método comprende además, antes de la etapa a), las etapas de:

i) poner en contacto dicho antisuero policlonal procedente de un animal no humano que ha sido inmunizado empleando un inmunógeno de péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO:25, con los siguientes péptidos de captura indicados en SEQ ID NO:26 a 28, bajo condiciones que permiten la formación de complejos de captura que comprenden los anticuerpos no específicos incluidos en el antisuero policlonal y los péptidos de captura; y

ii) retirar los complejos de captura del antisuero policlonal.

4.- El método de la reivindicación 3, en el que dicho inmunógeno comprende además KLH.

5.- El método de la reivindicación 4, en el que dicha KLH está unida al péptido que tiene SEQ ID NO:25 a través del conector N-[gamma-maleimidobutirilo]succinimida éster (GMBS).

6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que las etapas a) a c) se realizan por medio de una cromatografía de afinidad.

7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que las etapas i) y ii) se realizan por medio de una cromatografía de afinidad.

8.- Un anticuerpo que puede obtenerse mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7.

9.- El anticuerpo de la reivindicación 8 que es un anticuerpo policlonal.

10.- El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 8 o 9, en el que dicho anticuerpo está acoplado a un soporte sólido.

11.- El uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 8 a 10 para la retirada del polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado y/o no procesado del polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado.

12.- El uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 8 a 10 para detectar la BoNT/A parcialmente procesada y/o no procesada en una muestra.

13.- Un método para la fabricación de un polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una disolución que contiene una mezcla de polipéptidos de neurotoxina BoNT/A procesados, parcialmente procesados y/o no procesados, con un anticuerpo de las reivindicaciones 1, 2, 8 a 10, bajo condiciones que permiten la unión de dicho anticuerpo a los polipéptidos de neurotoxina BoNT/A no procesados y/o parcialmente procesados, por lo cual se forman complejos que comprenden dicho anticuerpo y el polipéptido de neurotoxina BoNT/A parcialmente procesado o no procesado, y

b) retirar dichos complejos formados en la etapa a), por lo cual se obtiene una disolución que contiene el polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado sin polipéptidos de neurotoxina BoNT/A no procesados y/o parcialmente procesados.

14.- Un método para la fabricación de un medicamento que comprende las etapas del método de la reivindicación 13 y la etapa adicional de formular dicha disolución que contiene el polipéptido de neurotoxina BoNT/A procesado sin polipéptidos de neurotoxina BoNT/A no procesados o parcialmente procesados como un medicamento.

Fig. 1

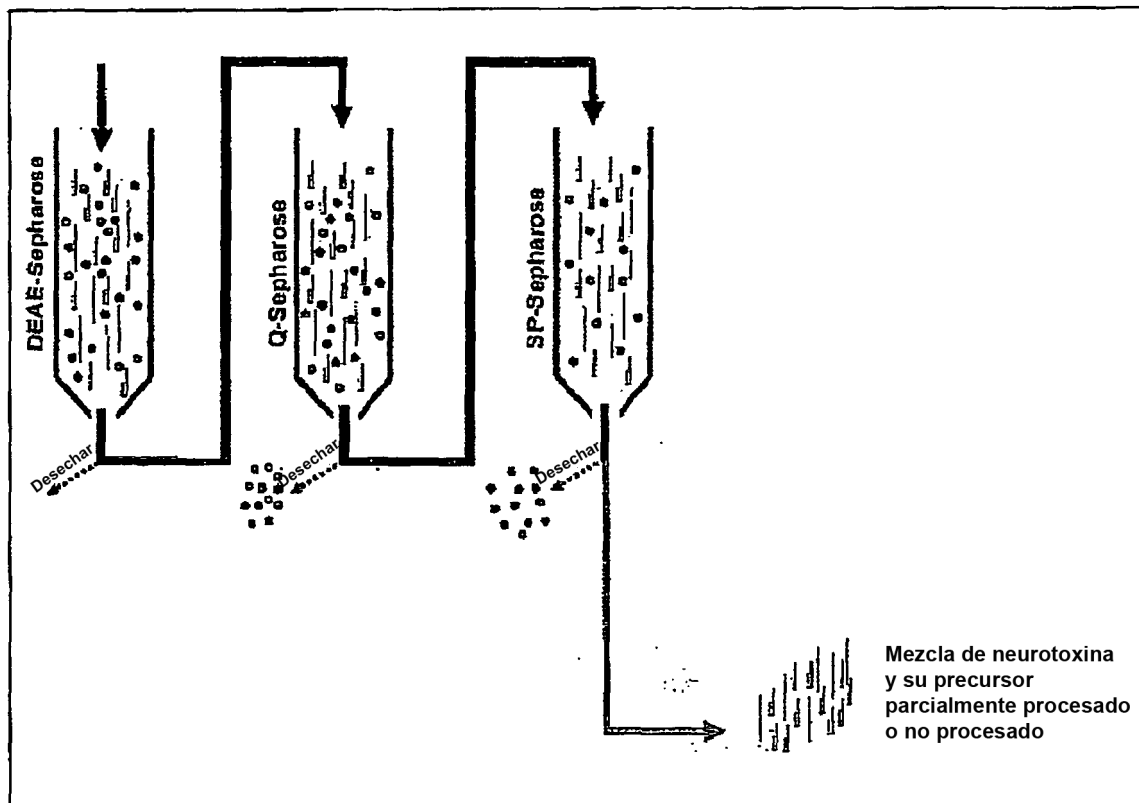


Fig. 2

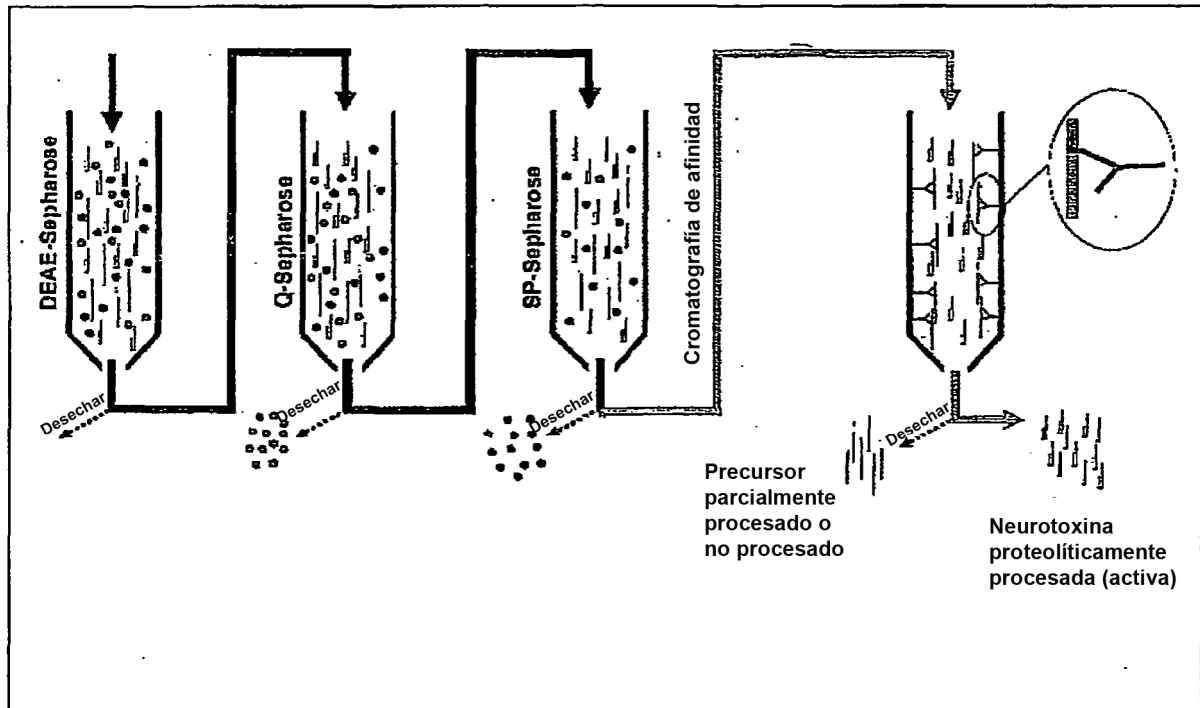


Fig. 3

