

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 661**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2011 E 11004152 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2524963**

54 Título: **Métodos para la fabricación de polipéptidos proteolíticamente procesados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.04.2019**

73 Titular/es:

**IPSEN BIOINNOVATION LIMITED (100.0%)  
102 Park Drive, Milton Park  
Abingdon, Oxfordshire OX14 4RY, GB**

72 Inventor/es:

**RUMMEL, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

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

**ES 2 708 661 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

Métodos para la fabricación de polipéptidos proteolíticamente procesados

La presente descripción se refiere a un nuevo polipéptido proteolíticamente activo y a diversos usos del polipéptido para búsquedas, y a métodos de fabricación.

5 *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani* producen neurotoxinas muy potentes, concretamente las neurotoxinas botulínicas (BoNT) y la neurotoxina del tétanos (TeNT), respectivamente. Estas neurotoxinas clostridiales (CNT) se unen específicamente a células neuronales y alteran la liberación de neurotransmisores. *Clostridium botulinum* segrega siete serotipos antigénicamente diferenciados denominados A a G de la neurotoxina botulínica (BoNT).  
 10 Todos los serotipos junto con la neurotoxina del tétanos (TeNT) relacionada segregados por *Clostridium tetani*, son Zn<sup>2+</sup>-endoproteasas que bloquean la exocitosis sináptica rompiendo las proteínas implicadas en la formación del complejo SNARE que controla la fusión de membranas celulares. Las CNT provocan la parálisis muscular flácida observada en el botulismo y el tétanos. Además se ha demostrado que la actividad de las CNT afecta a la secreción glandular. Estos efectos fisiológicos de las CNT sobre la actividad muscular y glandular cada vez se emplean más en diversas aplicaciones terapéuticas y cosméticas. La toxina botulínica de serotipo A (BoNT/A) fue aprobada para un uso humano en EE. UU. en 1989 para el tratamiento del estrabismo, el blefaroespasmos, y otros trastornos.  
 15 Es disponible en el mercado como una preparación de proteínas de la toxina botulínica A, por ejemplo, bajo el nombre comercial BOTOX (Allergan, Inc.) y bajo el nombre comercial DYSPORT (Ipsen Ltd). Para la aplicación terapéutica, un complejo que comprende la neurotoxina y otras proteínas bacterianas se inyecta directamente en el músculo que se va a tratar. A pH fisiológico, la toxina se libera del complejo de proteínas (Eisele *et al.*, 2011, *Toxicon*, 57(4):555-565) 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 o Bocouture (Merz Pharmaceuticals GmbH, Fráncfort/Alemania). El efecto de BoNT solo es temporal, lo cual constituye la razón de que normalmente sea necesaria una administración repetida de BoNT para mantener un efecto terapéutico.

25 Cada CNT se sintetiza inicialmente como un polipéptido monocatenario inactivo. En el caso de la BoNT, el polipéptido de neurotoxina tiene un peso molecular de aproximadamente 150 kDa. El procesamiento postraducciona de este polipéptido monocatenario implica una proteólisis limitada en una región expuesta denominada bucle (véase la tabla 1) y la formación de un puente disulfuro cercano. La neurotoxina bicatenaria activa consiste en dos productos de la ruptura que surgen de la hidrólisis proteolítica del polipéptido precursor monocatenario: 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) (cf. Krieglstein, 1990, *Eur. J. Biochem.*, 188:39; Krieglstein, 1991, *Eur. J. Biochem.*, 202:41; Krieglstein, 1994, *J. Protein Chem.*, 13:49; Lacy *et al.*, 1998, *Nat. Struct. Biol.*, 5(10):898-902). Dependiendo del número de sitios de ruptura presentes en la cadena sencilla entre los restos aminoácidos que forman el dominio catalítico y los restos aminoácidos que forman el dominio de translocación, la actividad endopeptidasa puede producir dos productos de la ruptura grandes, concretamente la cadena ligera y pesada y, además, unos péptidos cortos característicos que representan la anterior región de bucle, que en la cadena sencilla de la neurotoxina actúan como puente para lo que serán la cadena ligera y pesada (cf. tabla 1, a continuación).

35 La purificación de las CNT a partir de la disolución de fermentación es un reto importante, puesto que las neurotoxinas se encuentran como una mezcla de polipéptidos no procesados, parcialmente procesados y totalmente procesados que tienen propiedades bioquímicas y físicas muy similares. Se generan neurotoxinas parcialmente procesadas generalmente si la actividad endoproteolítica ha hidrolizado el enlace peptídico entre la cadena ligera y el bucle, mientras que el enlace peptídico entre el bucle y la región N-terminal de la cadena pesada permanece intacto. Además, también pueden crearse neurotoxinas parcialmente procesadas si la actividad endoproteolítica ha liberado el péptido del bucle de la cadena pesada, mientras que el enlace peptídico entre el péptido del bucle y la región C-terminal de la cadena ligera aún no ha sido hidrolizado. Dependiendo de las condiciones de fermentación y del tipo de neurotoxina, el polipéptido totalmente procesado que no contiene el péptido del bucle puede verse significativamente contaminado con entre 5% al 90% de polipéptido parcialmente procesado o no procesado. No obstante, en algunos casos, la neurotoxina está principalmente sin procesar y, antes del uso terapéutico, debe tratarse con una endopeptidasa para convertirse en biológicamente activa.  
 40  
 45  
 50

La técnica anterior describe diversos intentos para tratar neurotoxinas clostridiales con proteasas heterólogas para reducir la cantidad de proteína precursora no procesada o parcialmente procesada. La proteasa que más se emplea para la activación de las neurotoxinas clostridiales, la tripsina, aunque es útil para activar las neurotoxinas clostridiales de los serotipos B (BoNT/B) y E (BoNT/E) (DasGupta y Sugiyama, 1972, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48:108-112; Kozaki *et al.*, 1974, *Infect. Immun.*, 10:750-756), parece producir productos secundarios, probablemente por medio de una acción proteolítica cerca de la región C-terminal de la subunidad pesada de BoNT/A y, por tanto, parece destruir la unión de la toxina a su receptor celular (Shone *et al.*, 1985, *Eur. J. Biochem.*, 151:75-82). En teoría, se esperarían unos productos de la ruptura más específicos con proteasas endógenas aisladas del hospedante nativo, tal como *C. botulinum* que produce BoNT/A. Por consiguiente, se ha intentado aislar, a partir de la célula hospedante nativa, la proteasa endógena implicada en la activación proteolítica de las neurotoxinas clostridiales. Dekleva y DasGupta (Dekleva y DasGupta, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,

162:767-772) purificaron, a partir de cultivos de *C. botulinum* que producen BoNT/A, una fracción capaz de romper proteolíticamente la BoNT/A en una subunidad pesada y una subunidad ligera. Estudios posteriores realizados por los mismos autores han caracterizado más a fondo la proteasa endógena aislada a partir de *C. botulinum* (Dekleva y DasGupta, 1990, J. Bact., 172:2498-2503) y han revelado una proteína de 62 kDa, compuesta de un polipéptido de 15,5 kDa y un polipéptido de 48 kDa. Sin embargo, la observación de una fragmentación considerable de las CNT después de una exposición limitada a la proteína de 62 kDa de Dekleva y DasGupta sugiere que la proteasa aislada puede no ser la enzima proteolítica no identificada responsable de la activación de las CNT en cultivos celulares clostridiales y durante la infección. De hecho, otros autores han sugerido recientemente que la clostripaína, también denominada clostridiopeptidasa B (Mitchel y Harrington, 1968, JBC, 243:4683-4692), puede estar implicada en la activación específica de las CNT (Sebahia *et al.*, 2007, Genome Res., 17(7):1082-1092; documento WO2009/014854). De modo interesante, la estructura y la especificidad de sustrato de esta enzima se parecen a las de la alfa-clostripaína segregada de *Clostridium histolyticum* (Dargatz *et al.*, 1993), un homólogo (74% de identidad de aminoácidos) que está presente en *C. botulinum* (CBO1920). La alfa-clostripaína de *C. histolyticum* es una cisteína endopeptidasa con especificidad estricta por el enlace arginilo. Se sintetiza como una prepro-enzima inactiva que sufre una ruptura autocatalítica para generar polipéptidos de 15,4 y 43 kDa que se asocian para formar una enzima heterodimérica activa (Dargatz *et al.*, 1993). Tanto la alfa-clostripaína de *C. histolyticum* como la proteasa de 62 kDa de *C. botulinum* necesitan un agente reductor y calcio para lograr la actividad completa, y son susceptibles a los mismos inhibidores de proteasas. Estos datos sugieren con gran fuerza que el ortólogo de alfa-clostripaína de *C. botulinum* (CBO1920) es la proteasa endógena responsable de la melladura proteolítica de la neurotoxina de *C. botulinum*. También está presente un gen que codifica la clostripaína (CPE0846) en *C. perfringens*, y se ha descubierto que es regulado positivamente por el sistema de dos componentes VirR/VirS (Shimizu *et al.*, 2002b).

Sin embargo, hasta la fecha, no han aparecido más pruebas experimentales concluyentes, y en la técnica aún no está disponible una proteasa capaz de convertir, de modo eficaz, el precursor monocatenario de las CNT en los productos de la ruptura maduros auténticos, es decir, la neurotoxina bicatenaria.

Serían 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. Así, un problema técnico que subyace a la presente descripción 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 documento WO 2009/014854 describe métodos para activar toxinas clostridiales. La invención se define por medio de las reivindicaciones. Los aspectos/casos de la presente descripción que constituyen la invención son definidos por las reivindicaciones.

En la presente se describe un polipéptido proteolíticamente activo que comprende una secuencia polipeptídica que presenta al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO:1. En un aspecto, la presente descripción se refiere a un polipéptido proteolíticamente activo que consiste en una secuencia polipeptídica que presenta al menos 60% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1, en el que dicho polipéptido proteolíticamente activo es capaz de hidrolizar la neurotoxina botulínica o del tétanos para producir una neurotoxina botulínica bicatenaria o una toxina del tétanos bicatenaria. En otra realización, la presente descripción se refiere a un polipéptido proteolíticamente activo que consiste en una secuencia polipeptídica como se muestra en SEQ ID NO:1.

La expresión "polipéptido proteolíticamente activo", tal como se emplea en la presente, se refiere a la función catalítica del polipéptido de la presente descripción y significa que el polipéptido de la presente descripción es capaz de hidrolizar un enlace peptídico. En un aspecto, un "polipéptido proteolíticamente activo" se refiere a un polipéptido que es capaz de hidrolizar un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:4 a 25. La expresión "polipéptido proteolíticamente inactivo", tal como se emplea en la presente, se refiere a la función catalítica del polipéptido de la presente descripción y significa que el polipéptido de la presente descripción es incapaz de hidrolizar un enlace peptídico.

Los expertos en la técnica pueden determinar si un polipéptido según la definición de secuencia mencionada en la presente es un polipéptido según la presente descripción ensayando la actividad proteolítica de dicho polipéptido. Un ensayo o un sistema de ensayo para determinar la actividad proteolítica comprende poner en contacto un polipéptido que consiste en una secuencia polipeptídica que presenta al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO:1, en el que dicho polipéptido proteolíticamente activo es capaz de hidrolizar la neurotoxina botulínica o del tétanos para producir una neurotoxina botulínica bicatenaria o del tétanos bicatenaria con un sustrato de ensayo. Un sustrato de ensayo generalmente es un polipéptido del cual se sabe que puede ser roto por el polipéptido de la presente descripción. Preferiblemente, el sustrato de ensayo es una CNT, tal como BoNT o uno de sus fragmentos. El sustrato de ensayo puede ser, por ejemplo, BoNT no rota/no procesada, denominada en la presente "scBoNT", que puede ser, por ejemplo, del serotipo A, B, Cl, D, E, F o G (por ejemplo, "scBoNT/A", "scBoNT/B", etc.) o el sustrato de ensayo puede ser la neurotoxina del tétanos. Como alternativa, el sustrato de ensayo puede ser un fragmento de una neurotoxina clostridial, y dicho fragmento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO:4 a 25. El fragmento puede ser un polipéptido de 50 o más restos aminoácidos o un péptido de hasta 49 restos aminoácidos. Tal como se emplea a través de la presente memoria descriptiva, el término "polipéptido" se refiere a moléculas con 50 o más restos aminoácidos, mientras que el término "péptido" se refiere a moléculas con 2 a 49 restos aminoácidos. En un aspecto, el sustrato de ensayo es

un fragmento de neurotoxina soluble denominado LH<sub>N</sub>, que comprende el polipéptido de cadena ligera, la región del péptido del bucle expuesta y la mitad N-terminal del polipéptido de cadena pesada, el dominio de translocación H<sub>N</sub>. En otro aspecto, el sustrato de ensayo es o comprende un péptido seleccionado de cualquiera de SEQ ID NO:4 a 25 (cf. tabla 1). En otra realización, el sustrato de ensayo es una neurotoxina quimérica que comprende restos aminoácidos derivados de dos o más serotipos.

Un ensayo para determinar la actividad proteolítica comprendería generalmente una etapa de determinar el grado de conversión del sustrato de ensayo en su producto o productos de la ruptura. La observación de uno o más productos de ruptura generados después de poner en contacto el polipéptido con el sustrato de ensayo, o la observación de un aumento en la cantidad de producto o productos de la ruptura es indicativa de la actividad proteolítica del polipéptido. Dicha etapa de determinación puede implicar comparar el sustrato y el producto o productos de la ruptura. Dicha comparación puede implicar determinar la cantidad de sustrato y/o la cantidad de uno o más productos de la ruptura y también puede implicar calcular la proporción de sustrato y producto o productos de la ruptura. Además, el ensayo para determinar la actividad proteolítica puede comprender una etapa de comparar una muestra de ensayo con una muestra de referencia, en la que la muestra de referencia generalmente comprende (a) un polipéptido que consiste en una secuencia polipeptídica que presenta al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1 y que se sabe que es proteolíticamente activo, y (b) un sustrato de ensayo del cual se sabe que puede ser roto por el polipéptido de (a). En un aspecto, el ensayo para determinar la actividad proteolítica comprende separar el sustrato y el producto o productos de la ruptura mediante electroforesis o mediante cromatografía en columna y, opcionalmente, un análisis espectrométrico. Puede resultar conveniente marcar el sustrato de ensayo con uno o más marcadores para detectar con más facilidad la disminución del sustrato de ensayo y/o el aumento en el producto o productos. El término "marcador", tal como se emplea en la presente, significa un marcador detectable e incluye, preferiblemente, un marcador radiactivo, un anticuerpo, un marcador fluorescente. La cantidad de sustrato de ensayo y/o producto de la ruptura puede determinarse, por ejemplo, mediante métodos de autorradiografía o espectrometría, que incluyen métodos basados en la transferencia de energía de resonancia entre al menos dos marcadores. Como alternativa, pueden emplearse métodos inmunológicos, tales como un análisis de la transferencia Western o ELISA, para la detección. Un ensayo preferido para determinar la actividad proteolítica del polipéptido de la presente descripción se describe en la presente a continuación en los ejemplos que ilustran la descripción. En un caso particularmente preferido de la presente descripción, un polipéptido es proteolíticamente activo si más del 20%, preferiblemente más del 95% del sustrato de ensayo se convierte en los productos de la ruptura, tales como la cadena ligera y la cadena pesada en 120 min a 37 °C utilizando un tampón seleccionado de Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, o PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150, pH 7,4). Se aplican las mismas condiciones si el sustrato de ensayo no es una neurotoxina de longitud completa, sino que es, por ejemplo, un fragmento de la neurotoxina de longitud completa o un derivado de la neurotoxina. Es evidente que, en este caso, los productos de la ruptura serán diferentes. Sin embargo, los expertos en la técnica pueden cuantificar los correspondientes productos de la ruptura. En otro aspecto, en el ensayo se emplean generalmente 100 ng del polipéptido proteolíticamente activo y una proporción molar de 1:100 con respecto al sustrato. En otro aspecto, puede tomarse una muestra a intervalos para seguir la actividad catalítica a lo largo del tiempo. El ensayo puede modificarse, por ejemplo, empleando múltiples cantidades del polipéptido proteolíticamente activo.

La SEQ ID NO:2 muestra la secuencia polipeptídica de un polipéptido proteolíticamente inactivo derivado de *Clostridium botulinum*, cepa ATCC 3502, n.º de registro de GenBank: "CAL82988.1", que tiene un longitud de 581 restos aminoácidos. La SEQ ID NO:1 muestra un derivado proteolíticamente activo de SEQ ID NO:2 que carece de los restos aminoácidos 1 a 248 de SEQ ID NO:2.

La expresión "un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que presenta al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1" se refiere un polipéptido que presenta al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1. Además, la expresión se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que presenta al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO:1. Dicho polipéptido puede presentar aminoácidos adicionales, por ejemplo, en una posición interna o N- o C-terminal a la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1, o en una posición interna o N- o C-terminal a una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO:1, en el que una metionina puede estar presente en la región N-terminal del polipéptido. Además, la expresión se refiere a un polipéptido que carece de uno o más restos aminoácidos, por ejemplo, en una posición interna o en la región N- o C-terminal de la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1, o en una posición interna o en la región N- o C-terminal de una secuencia que es al menos 50% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO:1.

La expresión "identidad de secuencia", tal como se emplea en la presente, se refiere a la determinación de la identidad entre una secuencia de aminoácidos de referencia y una secuencia problema, 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, en una realización, se calculan a lo largo de la secuencia de aminoácidos completa. En otra realización, la identidad de secuencia se calcula a lo largo de una longitud de secuencia de hasta 50 restos aa, hasta 100 aa, hasta 150 aa, hasta 250 aa, 300 aa, 350 aa, 400 aa, 450 aa, 500 aa, o 550 restos aa. En otra realización, la identidad de secuencia se calcula a lo largo de al menos 50 restos aa, al menos 100 aa, al menos 150 aa o al menos 250 restos aa. En casos preferidos, la identidad de secuencia se determina a lo largo de la longitud completa de SEQ ID NO:1 o 2, concretamente, a lo largo de una

- longitud de 333 aa o 581 aa, respectivamente. 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 Smith y Waterman producen resultados particularmente fiables. Para realizar los alineamientos de secuencia y calcular los valores de identidad de secuencia indicados en la presente, se empleó el programa disponible en el mercado DNASTAR Lasergene MegAlign versión 7.1.0 basado en el algoritmo Clustal W a lo largo de la región de secuencia completa con los siguientes ajustes: parámetros de alineamiento apareado: penalización de hueco: 10,00, penalización de longitud de hueco: 0,10, matriz de peso de proteína Gonnet 250, que, a menos que se indique lo contrario, se emplearán siempre como ajustes patrón para los alineamientos de secuencia.
- 5
- 10 La expresión "al menos 50% de identidad de secuencia", tal como se emplea en la presente, significa al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o 100%.
- El polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción puede tener el mismo número de aminoácidos que la secuencia polipeptídica de referencia mostrada en SEQ ID NO:1. En la presente descripción también se incluyen polipéptidos que tienen más o menos restos aminoácidos. En una realización, el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción es o comprende un mutante de truncamiento de SEQ ID NO:1 o 2 o de un polipéptido que presente al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1. En la presente se indica un mutante de truncamiento de SEQ ID NO:2, por ejemplo, que carece de uno o más restos aminoácidos N-terminales a la posición de aminoácido 249. Un mutante de truncamiento puede ser un mutante de truncamiento N- o C-terminal y/o un mutante de truncamiento interno que es proteolíticamente activo. En una realización, dicho mutante de truncamiento de SEQ ID NO:2 carece de los aminoácidos en las posiciones 1 a 248 de SEQ ID NO:2, y el mutante de truncamiento de SEQ ID NO:2 es un mutante de truncamiento C-terminal. El mutante de truncamiento indicado en la presente carece de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 100, 150 o hasta 170 restos aminoácidos consecutivos. En otra realización, el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción tiene una longitud de aminoácidos de al menos 200 restos aa, de al menos 250 restos aa, de al menos 300 restos aa o de al menos 333 restos aa. En otra realización, el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción tiene hasta 333 restos aa o hasta 350 restos aa. En la presente también se indica un polipéptido proteolíticamente activo que tiene hasta 573 restos aminoácidos, hasta 581 restos aa, hasta 592 restos aa, hasta 600 restos aa o hasta 617 restos aa.
- 15
- 20
- 25
- 30 En otra realización, el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción incluye un polipéptido que comprende restos aminoácidos adicionales en el N- o C-terminal y/o en una posición interna de la cadena polipeptídica de SEQ ID NO:1, o una secuencia polipeptídica que presenta al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1. Estos restos aminoácidos adicionales pueden comprender hasta 5, hasta 10 o incluso hasta 200, 300 o hasta 400 restos aminoácidos consecutivos. En una realización, los restos aminoácidos adicionales actúan como un inhibidor de la actividad proteolítica. En otra realización, los restos aminoácidos adicionales pueden ser retirados por una proteasa. En otra realización, los restos adicionales que inhiben la actividad proteolítica del polipéptido de la presente descripción son excluidos. Los restos aminoácidos adicionales pueden estar flanqueados por uno o más sitios de ruptura de proteasa. En otra realización, los restos aminoácidos adicionales actúan como un marcador detectable y/o permiten la unión a un soporte sólido.
- 35
- 40 En otra realización, la cadena polipeptídica de SEQ ID NO:1 o una secuencia polipeptídica que presenta al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO:1 es modificada intercambiando uno o más restos aminoácidos. El término "intercambio", tal como se emplea en la presente, significa reemplazar un aminoácido por otro aminoácido diferente. Por ejemplo, pueden ser reemplazados hasta 1 aa, 2 aa, 3 aa, 4 aa, 5 aa, 6 aa, 7 aa, 8 aa, 9 aa, 10 aa, 15 aa, 20 aa o hasta 50 aa dentro de la secuencia polipeptídica. Los intercambios pueden implicar cambios conservativos o no conservativos de aminoácidos dirigidos, por ejemplo, a aumentar o disminuir la unión al sustrato o la actividad proteolítica del polipéptido de la presente descripción.
- 45
- En una realización, el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción incluye un polipéptido que es capaz de hidrolizar un sustrato en dos o más productos de la ruptura nativos. En otra realización, el polipéptido de la presente descripción hidroliza el sustrato en dos o más productos de la ruptura que se diferencian de los productos de la ruptura nativos. La expresión "productos de la ruptura nativos" o "productos nativos", tal como se emplea en la presente, se refiere a productos que son idénticos en la secuencia de aminoácidos cuando se comparan con productos generados a partir del mismo sustrato en cultivos celulares de tipo salvaje, a partir de los cuales se origina el sustrato. En una realización, el producto de la ruptura es la neurotoxina bicatenaria de una neurotoxina botulínica o de una neurotoxina del tétanos, y en otro aspecto, la neurotoxina bicatenaria es una neurotoxina aislada a partir de *C. botulinum* de serotipo A, B, C1, D, E, F o G. En otra realización, dicha neurotoxina bicatenaria es una neurotoxina bicatenaria nativa.
- 50
- 55

## ES 2 708 661 T3

Tabla 1 - muestra el precursor, la neurotoxina bicatenaria nativa de TeNT y BoNT/A-G, e identifica el bucle expuesto que comprende la secuencia de aminoácidos rota por el polipéptido de la presente descripción.

Toxina	Bucle expuesto	LC	H <sub>N</sub>	H <sub>CN</sub>	H <sub>CC</sub>
BoNT/A1	SEQ ID NO:4	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A2	SEQ ID NO:5	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A3	SEQ ID NO:6	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A3	SEQ ID NO:7	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A4	SEQ ID NO:8	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A5	SEQ ID NO:9	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A6	SEQ ID NO:5	M1-K438	A449-N872	I873-S1093	N1094-L1297
BoNT/A7	SEQ ID NO:10	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/B1	SEQ ID NO:11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B2	SEQ ID NO:12	M1-R441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B3	SEQ ID NO:12	M1-R441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B4bv	SEQ ID NO:11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B5nP	SEQ ID NO:13	M1-K441	V442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B6	SEQ ID NO:11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/C1	SEQ ID NO:14	M1-R444	T450-I868	N869-L1092	Q1093-E1291
BoNT/CD	SEQ ID NO:14	M1-R444	T450-I868	N869-Q1083	I1084-E1280
BoNT/D	SEQ ID NO:15	M1-K442	D446-I864	N865-Q1079	I1080-E1276
BoNT/DC	SEQ ID NO:16	M1-R442	D446-I864	N865-L1088	Q1089-E1285
BoNT/E1-E5	SEQ ID NO:17	M1-K419	S424-I847	K848-P1067	N1068-K1252
BoNT/E6	SEQ ID NO:18	M1-K419	S424-I847	K848-P1067	N1068-K1252
BoNT/F1	SEQ ID NO:19	M1-R435	A440-I866	K867-P1085	D1086-N1278
BoNT/F2	SEQ ID NO:20	M1-R435	Q440-I866	K867-P1088	D1089-E1280
BoNT/F3	SEQ ID NO:20	M1-R435	Q440-I866	K867-P1088	D1089-E1279
BoNT/F4	SEQ ID NO:21	M1-R435	A440-I866	K867-P1085	D1086-E1277
BoNT/F5	SEQ ID NO:22	M1-K434	P440-I863 5	K864-P108	D1086-E1277
BoNT/F6	SEQ ID NO:19	M1-R435	A440-I866	K867-P1088	D1089-E1275
BoNT/F7	SEQ ID NO:23	M1-K427	N432-I857	I858-P1076	D1077-E1268
BoNT/G	SEQ ID NO:24	M1-K442	S447-I865	S866-S1086	S1087-E1297
TeNT	SEQ ID NO:25	M1-R449	T456-K883	S884-L1109	S1110-D1315

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

El polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción es adecuado para diversas aplicaciones. Una

aplicación importante desde el punto de vista comercial es su uso en la producción de neurotoxinas terapéuticas, tales como las aisladas a partir de *C. botulinum*. En la actualidad, los cultivos celulares de *C. botulinum* empleados para la preparación de preparaciones disponibles en el mercado de la neurotoxina botulínica están contaminados con cantidades significativas de neurotoxinas parcialmente procesadas y/o no procesadas, y ambas alteran negativamente, en concreto reducen la actividad específica, estas composiciones farmacéuticas. Empleando el polipéptido proteolíticamente activo o activado de la presente descripción, por ejemplo, después de la lisis de *C. botulinum*, ahora es posible tratar composiciones que comprenden neurotoxinas parcialmente procesadas y/o no procesadas y, por tanto, convertir estos contaminantes en neurotoxinas totalmente procesadas. En consecuencia, se puede proporcionar a los productos comerciales una mayor actividad específica de la neurotoxina, por lo cual puede reducirse la cantidad total de proteína bacteriana, reduciendo aún más el riesgo de que los pacientes formen anticuerpos.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente descripción y, opcionalmente, elementos reguladores. La expresión "elementos reguladores", tal como se emplea en la presente, se refiere a elementos reguladores de la expresión génica, incluyendo la transcripción y la traducción, e incluye elementos tales como la caja tata, un promotor, potenciador, sitio de unión a ribosomas, secuencia de Shine-Dalgarno, región IRES, señal de poliadenilación, estructura de cierre de cadena terminal y similares. Dicho elemento regulador puede comprender uno o más elementos reguladores heterólogos, o uno o más elementos reguladores homólogos. Un "elemento regulador homólogo" es un elemento regulador de una célula de tipo salvaje, a partir de la cual se deriva la molécula de ácido nucleico de la presente descripción, que está implicado en la regulación de la expresión génica de la molécula de ácido nucleico o del polipéptido en dicha célula de tipo salvaje. La presente descripción también incluye moléculas de ácidos nucleicos que comprenden elementos reguladores heterólogos. La expresión "elemento regulador heterólogo" es un elemento regulador que no está implicado en la regulación de la expresión génica de la molécula de ácido nucleico o del polipéptido en dicha célula de tipo salvaje. También se incluyen elementos reguladores para la expresión inducible, tales como promotores inducibles. La molécula de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ARNhn, ARNm, ARN, ADN, ANP, ANL y/o moléculas de ácidos nucleicos modificadas. La molécula de ácido nucleico puede ser circular, lineal, puede estar integrada en un genoma o puede ser episómica. También se incluyen concatámeros que codifican proteínas de fusión que comprenden tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez polipéptidos de la presente descripción. Además, la molécula de ácido nucleico puede contener secuencias que codifican secuencias señal para el transporte intracelular, tales como señales para el transporte hacia el interior de un compartimento intracelular o para el transporte a través de la membrana celular.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la molécula de ácido nucleico de la presente descripción. Un vector puede ser adecuado para la expresión *in vitro* y/o *in vivo* del polipéptido de la presente descripción. El vector puede ser un vector para la expresión de genes transitoria y/o estable. En un caso, el vector comprende además elementos reguladores y/o marcadores de selección. Dicho vector, en un caso, es de origen vírico, en otro caso es de origen de fago y en otro caso es de origen bacteriano.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una célula que comprende la molécula de ácido nucleico o el vector de la presente descripción. El término "célula", tal como se emplea en la presente, incluye células procariotas y/o eucariotas adecuadas para expresar dicha molécula de ácido nucleico o dicho vector y, en particular, el polipéptido de la descripción. Dicha célula puede ser una célula hospedante que no expresa el polipéptido de la presente descripción o un homólogo de este. El término "homólogo", tal como se emplea en la presente, se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que presenta al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO:1. Sin embargo, la presente descripción también incluye células, en particular células de tipo salvaje, que expresan el polipéptido de la presente descripción o un homólogo de este. En una realización concreta, la célula de la presente descripción se selecciona de *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* y *C. tetani*. En una realización preferida, la célula es *C. botulinum* de serotipo A, B o F. En otra realización, dicha célula es la cepa Hall (ATCC 3502) de *C. botulinum*. En otra realización, dicha célula es la cepa ATCC 19397 productora de BoNT/A, también conocida como NCTC 4587 y NCTC 7272, de *C. botulinum*. En otra realización, dicha célula es la cepa NCTC 2916 productora de BoNT/A de *C. botulinum*. En otra realización, dicha célula son las cepas Kyoto-F y Mauritius/NCTC 9837 productoras de BoNT/A2 de *C. botulinum*. En otra realización, dicha célula es la cepa A254 Loch Maree/NCTC 2012 productora de BoNT/A3 de *C. botulinum*. En otra realización, dicha célula es la cepa CDC657 productora de BoNT/A4 y B de *C. botulinum*. En otra realización, dicha célula es la cepa H04402 065 productora de BoNT/A5 y B3' de *C. botulinum*. En otra realización, dicha célula es la cepa Okra/NCTC 7273 productora de BoNT/B1 de *C. botulinum*. En otra realización, dicha célula es la cepa CDC4013/NCTC 12265 productora de BoNT/B y F de *C. botulinum*. En otra realización, dicha célula es la cepa Langeland/NCTC 10281 productora de BoNT/F1 de *C. botulinum*. En otra realización, dicha célula es *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium acetobutylicum*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoidis*, *B. thermoproteolyticus*, *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli*, o una célula de levadura. En una realización, el polipéptido de la presente descripción se modifica dentro de la célula (es decir, se glicosila, fosforila, es procesado por proteasas, etc.). La modificación también incluye la adición de cofactores no proteicos que incluyen iones metálicos. Las células que comprenden el polipéptido proteolíticamente inactivo descrito anteriormente, cualquier producto de polipéptido intermedio, así como el polipéptido proteolíticamente activo final descrito en la presente se incluyen en esta

descripción. La presente descripción también incluye células que comprenden un inductor de la expresión del polipéptido de la presente descripción. Dicho inductor de la expresión puede ser una molécula de ácido nucleico o un polipéptido o una entidad química, que incluye una entidad química pequeña, que tenga el efecto de aumentar la cantidad o la actividad del polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción en cultivos celulares o lisados de estos. El inductor de la expresión, por ejemplo, puede aumentar la transcripción o la traducción de una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente descripción. Como alternativa, un inductor de la expresión indicado en la presente puede ser un compuesto capaz de activar el polipéptido proteolíticamente activo de SEQ ID NO:2 o un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que presenta al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO:2. En una realización, dicha célula comprende un inductor que es un polipéptido proteolíticamente activo capaz de retirar restos aminoácidos inhibidores de la región N-terminal de dicho polipéptido. El inductor, por ejemplo, puede ser expresado por medios recombinantes conocidos por los expertos en la técnica. Como alternativa, el inductor puede aislarse de una célula, por ejemplo, una célula clostridial.

La presente descripción también se refiere al uso de la molécula de ácido nucleico de la presente descripción para la fabricación del polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción.

En un aspecto relacionado, la presente descripción se refiere a un método para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente activo, que comprende las etapas de: (a) sintetizar de modo químico o traducir a partir de una secuencia de nucleótidos un polipéptido, que consiste en una secuencia polipeptídica que presenta al menos 60% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1, en el que dicho polipéptido proteolíticamente activo es capaz de hidrolizar la neurotoxina botulínica o del tétanos para producir una neurotoxina botulínica bicatenaria o una toxina del tétanos bicatenaria; y (b) purificar el polipéptido de la etapa (a).

La expresión "sintetizar de modo químico" significa sintetizar polipéptidos por medios químicos. Estos métodos se reseñan, por ejemplo, en Nilsson *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2005, 34:91-118. La expresión "purificar el polipéptido" significa retirarlo de una mezcla que comprende el polipéptido de la presente descripción y otros compuestos distintos de dicho polipéptido. La expresión también significa retirar el polipéptido de la presente descripción de una mezcla que comprende otros compuestos distintos de dicho polipéptido. En una realización concreta, la expresión significa separar el polipéptido proteolíticamente activo de su precursor proteolíticamente inactivo.

El ácido nucleico puede traducirse en una célula o en un sistema sin células. Están disponibles para los expertos en la técnica diversos sistemas para la traducción sin la presencia de células. La presente descripción incluye, por ejemplo, la traducción en un sistema de traducción de proteínas sin células que comprende un lisado de reticulocitos de conejo, lisado de germen de trigo, lisado de *E. coli*, u otros lisados celulares, por ejemplo, lisados generados a partir de *C. botulinum* y similares. También se incluye la traducción del polipéptido de la presente descripción desde la secuencia de nucleótidos de la presente descripción o el vector de la presente descripción. La transcripción puede ser regulada o controlada por uno o más elementos reguladores heterólogos o por elementos reguladores homólogos. En este aspecto de la presente descripción también se incluye la traducción en una célula de tipo salvaje, es decir, una célula aislada de la naturaleza, tales como cualquier aislado conocido de *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii*, y *C. tetani*. En una realización particular, dicha célula es *C. botulinum* de la cepa Hall (ATCC 3502). Están disponibles para los expertos en la técnica diversos medios y métodos convencionales para introducir una molécula de ácido nucleico o un vector en la célula y para expresar el polipéptido de la presente descripción como una proteína recombinante en una célula. Además, los expertos en la técnica conocen muchas técnicas convencionales para aislar polipéptidos a partir de células o lisados de células o a partir de sistemas de expresión exentos de células (por ejemplo, Recombinant DNA Principles and Methodologies, J. Green, Marcel Dekker Inc., 1998; The Condensed Protocols: From Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 2006; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 2000). Cualquiera de estos medios y métodos pueden usarse en los métodos de la presente descripción.

El primer polipéptido de la presente descripción puede traducirse a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido proteolíticamente activo. La SEQ ID NO:26 es un ejemplo de dicha molécula de ácido nucleico. Como alternativa, dicha molécula de ácido nucleico puede codificar un polipéptido precursor que es proteolíticamente inactivo pero que puede convertirse en el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción. La SEQ ID NO:27 es un ejemplo de dicha molécula de ácido nucleico. El precursor proteolíticamente inactivo también se denomina "BoNTHidrolasa inactiva", abreviada como iBH. Este precursor proteolíticamente inactivo puede activarse, por ejemplo, durante o después de la traducción o poniendo en contacto, por ejemplo, dicho polipéptido proteolíticamente inactivo con una proteasa capaz de retirar restos aminoácidos inactivantes en la región N-terminal del polipéptido proteolíticamente inactivo. Un ejemplo de un polipéptido proteolíticamente inactivo es el polipéptido representado por SEQ ID NO:2. Otro ejemplo es un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que presenta al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO:2. La expresión "restos aminoácidos inactivantes en la región N-terminal" se refiere, en un aspecto, a los primeros 248 restos aa de dicho polipéptido. En otro aspecto, esta expresión se refiere a un fragmento de hasta 10 restos aa, 50 aa, 100 aa, 150 aa, 200 aa, 250 aa de dicho polipéptido. Cualquiera de estos polipéptidos es útil en el método de la presente descripción para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente activo. En una realización, la proteasa capaz de retirar restos aminoácidos inactivantes de la región N-terminal de este polipéptido se aísla, por ejemplo, de *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium baratii*, y *Clostridium tetani*. En otra realización, la proteasa

capaz de retirar dichos restos aminoácidos inactivantes se proporciona proporcionando un lisado fraccionado o no fraccionado de dichas células. Los restos aminoácidos inactivantes pueden retirarse poniendo en contacto el polipéptido proteolíticamente inactivo con dicho lisado e incubando hasta que el polipéptido proteolíticamente inactivo se transforma en el polipéptido proteolíticamente activo.

- 5 En otra realización del método de la presente descripción, el polipéptido se traduce en una célula. La célula puede ser una célula procariota o eucariota. En una realización, la célula se selecciona de *E. coli*, *B. subtilis* o levadura. La presente descripción también incluye la traducción del polipéptido de la presente descripción en una célula de tipo salvaje, es decir, una célula aislada de la naturaleza, tal como cualquier aislado conocido de *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium baratii*, y *Clostridium tetani*. En una realización concreta, dicha célula es *C. botulinum* de la cepa Hall (ATCC 3502). En otra realización concreta, dicha célula es la célula de la presente descripción descrita en la presente anteriormente.

10 Los productos de la traducción obtenidos mediante el método de la presente descripción pueden purificarse mediante diversos medios, todos los cuales son conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, Recombinant DNA Principles and Methodologies, J. Green, Marcel Dekker Inc., 1998; The Condensed Protocols: From Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 2006; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 2000). Los métodos típicos para purificar el polipéptido de la presente descripción pueden implicar la centrifugación de un lisado de células, la precipitación con sulfato de amonio de proteínas, la resuspensión de proteínas, la centrifugación de proteínas resuspendidas, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de exclusión molecular, la cromatografía de interacción hidrófoba y similares. Pueden ser útiles varias combinaciones de dichas etapas, en diferente orden, para purificar el polipéptido de la presente descripción. Un método preferido para purificar el polipéptido de la presente descripción se describe en los ejemplos que ilustran la descripción.

15 En una realización, la etapa de purificación comprende unir el polipéptido de la presente descripción a un soporte sólido. El término "soporte sólido" se refiere a una matriz que incluye, por ejemplo, gel de sílice, dextrano reticulado, poli(acrilamida reticulada o agarosa reticulada y similares. También se incluyen, en concreto, polipéptidos, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, polietilenglicol (PEG), dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificada, poli(acrilamidas, gabros, y magnetita. Un soporte sólido, en una realización de la descripción, es una matriz de polisacáridos seleccionada del grupo que consiste en Sepharose, Sephadex, agarosa, Sephacell, microcelulosa, y esferas de alginato. En otra realización, dicho soporte sólido puede consistir en esferas de vidrio y/o matrices polipeptídicas.

20 En una realización, el soporte sólido está unido al anticuerpo de la presente descripción. El término "unido" significa, en un aspecto, unido de modo estable o asociado de modo estable. En otro aspecto, unido incluye interacciones, tales como enlaces indirectos o directos, no reversibles o reversibles, físicos y químicos, electrostáticos y/o covalentes. El anticuerpo indicado en la presente está covalentemente unido, directamente o a través de una molécula conectora, al soporte sólido. El anticuerpo puede unirse a dicho soporte sólido a través de un conector, que incluye compuestos de molécula pequeña, moléculas de conectores peptídicos (o polipeptídicos). El soporte sólido 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 o el soporte sólido puede ser esférico, tal como sucede en una esfera, o cilíndrico, 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 o una tira de ensayo.

25 Dicho anticuerpo unido al soporte sólido puede usarse, por ejemplo, en el método de fabricación de la presente descripción o en un método de diagnóstico. En una realización, dicho método de fabricación puede comprender una etapa de cromatografía de afinidad, en la que dicha cromatografía de afinidad se basa en un anticuerpo unido a un soporte sólido. En un caso, dicho anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción. En otro caso, dicho anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido proteolíticamente inactivo de la presente descripción.

30 En otra realización, el método para fabricar el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción comprende purificar el polipéptido de la presente descripción a partir de una mezcla que contiene componentes adicionales. La purificación puede basarse, por ejemplo, en la polaridad, la carga eléctrica y el tamaño. Por tanto, en una realización, el método puede comprender una o más etapas de separación seleccionadas del grupo que consiste en HPLC en fase normal, HPLC en fase inversa, cromatografía de interacción hidrófila ("hydrophilic-interaction chromatography", HILIC), cromatografía de interacción hidrófoba ("hydrophobic-interaction chromatography", HIC), cromatografía de intercambio iónico ("ion-exchange chromatography", IEC) que incluye la cromatografía de intercambio aniónico y la cromatografía de intercambio catiónico, la cromatografía de exclusión molecular ("size-exclusion chromatography", SEC), la cromatografía de permeación en gel ("gel-permeation chromatography", GPC).

35 En otra realización, dicha purificación comprende las etapas de: (a) una separación mediante cromatografía de intercambio aniónico; (b) una separación mediante cromatografía de exclusión molecular; (c) una separación mediante una cromatografía de interacción hidrófoba; y (d) una separación mediante cromatografía de exclusión molecular.

Una o más fracciones recogidas de una columna de cromatografía pueden concentrarse, por ejemplo, mediante precipitación o ultrafiltración.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una composición que comprende el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción. Utilizando el método descrito en la presente es posible fabricar el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción que esté sustancialmente exento del polipéptido proteolíticamente inactivo. En otras palabras, el método de la presente descripción proporciona un polipéptido proteolíticamente activo y una composición que no comprende contaminación sustancial por la proteína precursora inactiva del polipéptido de la presente descripción. Se considera que una composición no contiene contaminación sustancial o que está sustancialmente exenta de polipéptido precursor proteolíticamente inactiva si cuando se emplea un método de detección basado en la transferencia Western, puede detectarse menos del 5% del precursor proteolíticamente inactivo, refiriéndose dicho 5% a la cantidad de precursor proteolíticamente inactivo con relación a la suma de polipéptido proteolíticamente activo e inactivo. En otra realización, dicha composición es sustancialmente pura y comprende al menos 50% de polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción, refiriéndose dicho 50% a la cantidad de precursor proteolíticamente activo con relación a la cantidad total de proteína contenida en la composición. En otra realización, dicha composición sustancialmente pura comprende al menos 75%, 80%, 90% o al menos 98% de polipéptido proteolíticamente activo.

En otra realización, la presente descripción se refiere además a un polipéptido que puede obtenerse con el método para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente activo, según se describió anteriormente en la presente y tal como se ilustra en los ejemplos. Dicho polipéptido proteolíticamente activo es, en una realización, un polipéptido proteolíticamente activo con la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:1. En otro aspecto, el polipéptido proteolíticamente activo es un polipéptido que presenta al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO:1. En otra realización, el polipéptido proteolíticamente activo es un polipéptido que consiste en una secuencia polipeptídica que presenta al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO:1. La expresión "un polipéptido que puede obtenerse", tal como se emplea en la presente, se refiere, en un aspecto, a un polipéptido que se traduce a partir del ácido nucleico de la presente descripción. El polipéptido después puede sufrir una modificación postraduccional, tal como una acilación, alquilación, amidación, adición de aminoácidos, deleción de aminoácidos, glicosilación, oxidación, S-glutacionilación, fosforilación, sulfatación, procesamiento proteolítico y similares. Además, el polipéptido puede unirse a un ion metálico, tal como  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ . Preferiblemente, dicho ion metálico es  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$ .

También se describe un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la presente descripción. 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  $\text{F}(\text{ab}')_2$ ,  $\text{F}(\text{ab})$ ,  $\text{Fv}$  o  $\text{scFv}$ , o derivados química o enzimáticamente modificados de cualquiera de estos fragmentos.

En algunas descripciones, el anticuerpo de la presente descripción se unirá específicamente al polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción o su precursor proteolíticamente inactivo. En otra descripción, el anticuerpo que es específico del polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción presenta reactividad cruzada con el polipéptido proteolíticamente inactivo descrito en la presente. En otra descripción, el anticuerpo es capaz de discriminar entre el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción y su precursor inactivo. En otra descripción, el epitopo para el cual dicho anticuerpo es específico se localiza en una región de aminoácidos que está presente en el polipéptido proteolíticamente inactivo, pero no en el polipéptido proteolíticamente activo. Por ejemplo, dicho epitopo puede ser un epitopo de una región del polipéptido que consiste en los restos aminoácidos 1 a 248 de un polipéptido que comprende la secuencia polipeptídica que presenta al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO:2.

En otra indicación, el epitopo está formado por restos aminoácidos localizados en una posición N-terminal con respecto al aminoácido 249 de un polipéptido que comprende la secuencia polipeptídica que presenta al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO:2. En otra descripción, dicho epitopo se retira del polipéptido proteolíticamente inactivo descrito en la presente mediante procesamiento proteolítico.

En otra descripción, el epitopo para el cual el anticuerpo de la presente descripción es específico es un epitopo localizado en la región N-terminal de un polipéptido que comprende la secuencia polipeptídica que presenta al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO:1. La expresión "región N-terminal", tal como se emplea en este aspecto de la descripción, se refiere a una región del polipéptido que comprende los 50 restos aminoácidos N-terminales de dicha secuencia polipeptídica, preferiblemente, los 25 restos N-terminales de dicha secuencia polipeptídica. En una descripción concreta, la expresión se refiere a los 14 restos aminoácidos N-terminales. El término "epitopo", tal como se emplea en la presente, se refiere al determinante antigénico que es reconocido por el anticuerpo de la presente descripción. En una descripción, el epitopo es un epitopo lineal, y en otro aspecto el epitopo es un epitopo conformacional. En una descripción particular, el determinante antigénico consiste en un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal del polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción, en el que dicho péptido puede tener una longitud de aminoácidos de 7 a 14, 25

preferiblemente de 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 restos aminoácidos.

La expresión "se une específicamente", en un aspecto, significa que el anticuerpo de la presente descripción no presenta reacción cruzada en un grado significativo con otros epitopos sobre el polipéptido de la presente invención ni sobre otros polipéptidos en general. La especificidad de epitopo es una característica importante del anticuerpo de la presente descripción. La especificidad del anticuerpo con respecto al polipéptido proteolíticamente activo frente al polipéptido proteolíticamente inactivo 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% del epitopo incluido 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 descripción pueden determinarse, en principio, mediante estudios de unión empleando un antígeno inmovilizado (el ligado) 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, fundamentalmente pueden subdividirse 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 contenga el 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 ( $K_D$ ). El anticuerpo de la presente descripción tiene una  $K_D$  menor que 0,5  $\mu\text{M}$ , en otro 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 descripción puede fabricarse empleando métodos descritos, por ejemplo, en Harlow y Lane, 1988 (Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988). Pueden prepararse anticuerpos monoclonales mediante las técnicas descritas originariamente en Kohler y Milstein, 1975 (Kohler y Milstein, 1975, Nature, 256:495) y Galfre y Milstein, 1981 (Galfre y Milstein, 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 epitopo mencionado anteriormente dentro del polipéptido de la presente descripción (cf. Schier *et al.*, 1996, Human Antibodies Hybridomas, 7:97; Malmberg *et al.*, 1995, J. Immunol. Methods, 183:7).

El anticuerpo de la descripción se produce usando un péptido que comprende o que consiste en el epitopo mencionado anteriormente. El péptido puede producirse de modo sintético o mediante expresión recombinante. Como alternativa, el anticuerpo de la descripción puede producirse aplicando un polipéptido proteolíticamente activo natural o un polipéptido proteolíticamente inactivo de la presente descripción. En este último caso, debe entenderse que los anticuerpos resultantes se ensayarán posteriormente para determinar su especificidad con respecto al polipéptido de la presente descripción. En otra descripción, un anticuerpo monoclonal de la descripción se produce empleando un polipéptido de la presente descripción que puede tratarse con un detergente para hacer que el epitopo esté inmunológicamente disponible. Sin embargo, se entenderá que, en el caso en que el anticuerpo se dirija contra un epitopo conformacional, no debe realizarse este tratamiento con detergente. En otra descripción, también pueden aplicarse agentes de inmunoestimulación, tales como hemocianina de lapa ("keyhole limpet hemocyanin", KLH), en dicho proceso, en especial cuando se usa un péptido sintético

El anticuerpo de la presente descripción puede utilizarse, por ejemplo, para una cromatografía de afinidad, para la inmunoprecipitación, y la inmunolocalización del polipéptido de la presente descripción, así como para controlar la presencia de dicho polipéptido en muestras o en organismos recombinantes. Además, el anticuerpo de la presente descripción puede usarse en un método de detección o en un método de diagnóstico. En un aspecto particular, el anticuerpo de la presente descripción se emplea en una transferencia Western o un ELISA. Además, el anticuerpo de la presente descripción puede usarse en aplicaciones terapéuticas. En particular, el anticuerpo puede usarse para inhibir la actividad del polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción. Por tanto, el anticuerpo

de la presente descripción también tiene las diversas aplicaciones terapéuticas descritas en la presente a continuación.

La presente descripción también se refiere al uso del polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción en un método para procesar proteolíticamente un polipéptido. En un aspecto, la presente descripción se refiere a un método para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente procesado que comprende la etapa de poner en contacto: (a) un primer polipéptido, siendo dicho primer polipéptido el polipéptido de la presente descripción, con (b) un segundo polipéptido, siendo dicho segundo polipéptido susceptible a la proteólisis por dicho primer polipéptido, en el que dicho contacto provoca el procesamiento proteolítico de dicho segundo polipéptido para producir al menos dos productos de la ruptura.

La presente descripción también se refiere al uso de Lys-N y/o Lys-C y/o arginil endopeptidasa (endoproteinasa Arg-C, LeR) de *Lysobacter enzymogenes* (ATCC 29487) (Wright D.S., Graham L.D., Jennings P.A., Biochim. Biophys. Acta, 22 de diciembre de 1998, 1443(3):369-374). Además, también incluye el uso de plasmina y/o omptina (OmpT), una serina proteasa unida a membrana que provoca la ruptura en los motivos (Arg/Lys)-(Arg/Lys) (K. Sugimura y T. Nishihara, J. Bacteriol., 170 (1988), pp. 5625-5632) en un método para procesar proteolíticamente una CNT, tal como BoNT/A. En la presente se describe un método para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente procesado que comprende la etapa de poner en contacto: (a) un primer polipéptido, siendo dicho primer polipéptido Lys-C o Lys-N, con (b) un segundo polipéptido, siendo dicho segundo polipéptido susceptible a la proteólisis por dicho primer polipéptido, en el que dicho contacto provoca el procesamiento proteolítico de dicho segundo polipéptido para producir al menos dos productos de la ruptura, y en el que el segundo polipéptido es la cadena sencilla de BoNT/A descrita en la presente. La expresión "Lys-C" se refiere a la serina endoproteinasa Lys-C de 33 kDa de *Lysobacter enzymogenes* (lisil endopeptidasa, LeK, n.º de registro de Genbank Q7M135) que rompe específicamente los enlaces peptídicos en posición C-terminal con respecto a la lisina o uno de sus homólogos que tenga al menos 60% de identidad de secuencia. La expresión "Lys-N" se refiere a la metaloendopeptidasa Lys-N aislada a partir de *Grifola frondosa* y *Pleurotus ostreatus* (Nonaka T. et al., 1997, J. Biol. Chem., 272:30032-30039; Nonaka T. et al., 1998, J. Biochem., 1998, 124:157-162; Hod T. et al., 2001, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., 57:361-368). La expresión también incluye los homólogos de dicha proteasa que tienen al menos 60% de identidad de secuencia.

Este método puede usarse, por ejemplo, para fabricar una neurotoxina (CNT) o neurotoxina botulínica (BoNT) proteolíticamente procesada. El término "BoNT", tal como se emplea a través de esta descripción, significa la neurotoxina botulínica y se refiere a la neurotoxina que puede obtenerse a partir de *C. botulinum*, tal como BoNT de serotipo A, B, C1, D, E, F o G. En el término "CNT" y "BoNT" también se incluye una neurotoxina recombinante y modificada que comprende una o más modificaciones, que incluyen una modificación química o una modificación genética. La expresión "modificación genética" significa delección, sustitución o adición de uno o más restos aminoácidos. Empleando el método de la presente descripción, ahora es posible obtener composiciones de neurotoxinas con significativamente menos contaminación por neurotoxinas no procesadas o parcialmente procesadas, puesto que estos contaminantes se procesan con eficacia para producir la neurotoxina bicatenaria. En una realización, la neurotoxina bicatenaria es una neurotoxina bicatenaria nativa, en la que la región C-terminal de la cadena ligera y la región N-terminal de la cadena pesada son idénticas a la correspondiente neurotoxina bicatenaria totalmente procesada aislada a partir de clostridios de tipo salvaje.

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 descripción, dichos dos compuestos diferentes son, en una realización, el primer y el segundo polipéptido que están incluidos en la disolución. El contacto se realiza bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la interacción del primer y segundo polipéptido. La expresión "polipéptido proteolíticamente procesado", tal como se emplea en la presente, se refiere, en un aspecto, a un polipéptido cuya cadena polipeptídica ha sido hidrolizada o rota en uno o más enlaces peptídicos. En otra realización, la expresión se refiere a un polipéptido que ha sido proteolíticamente roto por una endoproteinasa o endopeptidasa. En otra realización, la expresión se refiere a un polipéptido que ha sido roto hasta un grado de al menos 50%. En otra realización, dicho polipéptido proteolíticamente procesado es el segundo polipéptido. En otra realización, al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% está proteolíticamente procesado.

La expresión "primer polipéptido", tal como se emplea en la presente, se refiere al polipéptido de la presente descripción, es decir, el polipéptido proteolíticamente activo o activado, también denominado "BoNTHidrolasa activa". Puesto que la BoNTHidrolasa activa puede obtenerse del sobrenadante de *C. botulinum*, en un principio se denominó BoNTHidrolasa nativa, abreviado como "nBH". Sin embargo, la expresión "primer polipéptido" y "nBH" también se refieren a BoNTHidrolasas que pueden obtenerse a partir de otras fuentes. La expresión "segundo polipéptido", tal como se emplea en la presente, se refiere al sustrato de dicho primer polipéptido. La expresión "es susceptible a la proteólisis" se refiere a una característica o requisito del segundo polipéptido y, en la presente, se emplea para indicar que el segundo polipéptido puede ser roto proteolíticamente por dicho primer polipéptido. En otras palabras, la expresión "es susceptible a la proteólisis" significa que el segundo polipéptido comprende un sitio de reconocimiento y ruptura de proteasa que le permite actuar como sustrato del primer polipéptido. El "segundo polipéptido" es un sustrato del primer polipéptido y es proteolíticamente procesado para producir dos o más productos de la ruptura. Empleando el ensayo descrito anteriormente en la presente, los expertos en la técnica

pueden determinar si un polipéptido concreto es un sustrato del primer polipéptido y, por tanto, un "segundo polipéptido" según la definición de la presente descripción. La expresión "al menos dos productos de la ruptura" incluye, por ejemplo, hasta dos, tres, cuatro, cinco y hasta seis productos de la ruptura.

5 Este método puede usarse, por ejemplo, para preparar una composición farmacéutica que comprende una neurotoxina clostridial o para generar fragmentos polipeptídicos usados en un método de espectrometría de masas. El primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden ponerse en contacto en diversas etapas en el proceso de fabricación del polipéptido proteolíticamente procesado. En un aspecto, la etapa de poner en contacto el primer polipéptido y el segundo polipéptido se realiza dentro de una célula. En una realización particular de este caso, el primer y el segundo polipéptido se expresan en dicha célula.

10 En otra realización, dicha etapa de contacto se realiza en un lisado de células o en un lisado de células purificado. Este aspecto incluye la adición del primer polipéptido al lisado o al lisado purificado. El primer polipéptido puede añadirse en diversas etapas durante la purificación del segundo polipéptido del lisado de células. Por ejemplo, el primer polipéptido puede añadirse antes o después de la precipitación de las proteínas, una cromatografía de intercambio iónico, una cromatografía de interacción hidrófoba y/o una cromatografía de exclusión molecular.

15 Además, también se incluye la adición del primer polipéptido a una composición farmacéutica. En esta realización, el polipéptido de la presente descripción se emplea, por ejemplo, para romper proteolíticamente el segundo polipéptido, por ejemplo, para activar un segundo polipéptido que es un agente terapéutico contenido en la composición farmacéutica. También se contempla la administración del primer polipéptido a un sujeto para procesar proteolíticamente un segundo polipéptido en el sujeto. La administración también incluye la coadministración del primer y segundo polipéptido. En este método también se incluye una etapa de incubación en condiciones y durante un tiempo suficiente para romper el segundo polipéptido. En una realización, las condiciones pueden comprender añadir un tampón seleccionado del grupo que consiste en Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, o PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Las condiciones preferidas de tampón incluyen Tris-HCl mM, pH 8,0. El "tiempo suficiente para lograr la ruptura" puede determinarse empleando el ensayo descrito anteriormente en la presente. En una realización, dicho "tiempo suficiente para lograr la ruptura" depende del grado de ruptura que debe tener el polipéptido proteolíticamente procesado o una composición que lo comprende. En una realización, el método comprende una etapa de incubar el primer y segundo polipéptido durante al menos 30 min, 60 min, 120 min o al menos 240 min. En otra realización, el primer y segundo polipéptido se incuban durante hasta 30 min, 60 min, 120 min, 240 min, 480 min o hasta 600 min. En otra realización, el método comprende una etapa de incubar el primer y segundo polipéptido a 4 °C o a 37 °C. En otra realización, el método comprende una etapa de incubar hasta 1 h, hasta 2 h, 4 h, 6 h, 10 h o hasta 16 h.

En una realización, la cadena polipeptídica de dicho segundo polipéptido comprende una secuencia seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO:4 a 25. En una realización más concreta, la cadena polipeptídica de dicho segundo polipéptido comprende una secuencia seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO:4 a 25, y en la que el segundo polipéptido es roto en una posición C-terminal con respecto a un resto aminoácido básico dentro de dicha secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:4 a 25. Dichas secuencias representan secuencias de aminoácidos de sustratos conocidos del polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción. Tal como se muestra en la presente, dichos sustratos son rotos en una posición C-terminal con respecto a un resto aminoácido básico contenido en la secuencia; compárese la tabla 1, columna LC y H<sub>N</sub>. En una realización preferida, dicho segundo polipéptido comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:4 a 10. En otra realización preferida, dicho segundo polipéptido es BoNT/A o uno de sus derivados, incluyendo, por ejemplo, el polipéptido de SEQ ID NO:3 y sus derivados. El término "derivado", tal como se emplea con respecto a este y otros aspectos de la descripción, comprende mutaciones de aminoácidos, tales como la adición, la sustitución, la delección o el truncamiento de uno o más restos aminoácidos.

45 En una realización, el segundo polipéptido comprende un derivado de cualquiera de SEQ ID NO:4 a 25, o de SEQ ID NO:3, en el que dicho derivado contiene una o más mutaciones puntuales y/o uno o más restos aminoácidos adicionales. En otra realización, dicho derivado tiene hasta 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, hasta 10, hasta 15 mutaciones puntuales. Empleando el ensayo de actividad para determinar la actividad proteasa, tal como se describe en la presente, los expertos en la técnica pueden determinar si un derivado concreto es procesado por el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción. En otra realización, el derivado contiene una mutación puntual que cambia un resto aminoácido básico por un resto aminoácido no básico. En otra realización, el derivado presenta al menos 50% de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:4 a 25. En otra realización, dicho derivado o un polipéptido que comprende el derivado es un sustrato del primer polipéptido y es roto proteolíticamente por el primer polipéptido. Un ejemplo típico es un derivado de SEQ ID NO:3 que comprende, por ejemplo, una o más mutaciones puntuales en la cadena ligera o pesada.

En otra realización, dicho segundo polipéptido comprende (a) una secuencia polipeptídica que presenta al menos 30% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO 3 [(BoNT/A de ATCC 3502, n.º de registro de Genbank, AAA23262)]; o (b) una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en la neurotoxina del tétanos, la proteína de la cascada de coagulación factor X o protrombina (factor II), enzimas digestivas del páncreas, tales como tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína. Al menos 30% significa al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 85%. En una realización concreta, la identidad de secuencia de dicho segundo polipéptido que presenta al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:3 se determina basándose

en las posiciones de los aminoácidos 420 a 466 de SEQ ID NO:3, y en otra realización, dicha identidad de secuencia se determina basándose en cualquiera de SEQ ID NO:4 a 25. En otras palabras, dicha realización se refiere a un segundo polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que presenta, por ejemplo, al menos 30% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica que se encuentra entre las posiciones de los aminoácidos 420 a 466 de SEQ ID NO:3 o al menos 30% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica de cualquiera de SEQ ID NO:4 a 25. Un polipéptido según esta definición puede obtenerse, por ejemplo, de *C. botulinum*, *C. tetani* o *C. sporogenes*. Dicho segundo polipéptido puede ser, por ejemplo, una neurotoxina natural, tal como BoNT/A, B, C, D, E, F o G o uno de sus derivados que comprende una o más mutaciones de aminoácidos, tales como una adición, una sustitución, una delección o un truncamiento de uno o más restos aminoácidos. Se incluyen, por ejemplo, derivados que carecen, por ejemplo, del dominio H<sub>C</sub> de neurotoxina nativo, o partes o derivados de este con otros restos aminoácidos que reemplazan al dominio H<sub>C</sub> de neurotoxina, así como derivados con una cadena ligera adicional u otra molécula de carga proteica condensada N-terminalmente con la cadena ligera de BoNT.

En otra realización, el segundo polipéptido puede contener restos aminoácidos adicionales en el N- o C-terminal o en una posición interna. Los restos aminoácidos adicionales pueden estar flanqueados por uno o más sitios de ruptura de proteasas. En otra realización, la secuencia de aminoácidos adicionales actúa como marcador detectable y/o permite la unión a un soporte sólido. Un ejemplo es un marcador his o un marcador GST. Otro ejemplo es la secuencia de aminoácidos VPPTGSAWHPQFEK que contiene el marcador Strep, preferiblemente añadida al C-terminal.

En una realización concreta, dicho segundo polipéptido es un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica como se muestra en GenBank n.º CBZ04958.1, YP\_002805603.1, ZP\_02994746.1, YP\_001788403.1, YP\_001782718.1, ZP\_02616437.1, ZP\_02614241.1, YP\_001392361.1, YP\_001255575.1 o uno de sus homólogos que tenga al menos 50% de identidad de secuencia.

En otra realización, la actividad biológica de dicho segundo polipéptido es modulada por la ruptura proteolítica. Los expertos en la técnica saben que la función de muchos polipéptidos puede ser modulada mediante el procesamiento proteolítico. "Modular", tal como se emplea en la presente, significa aumentado o disminuido, activado o inactivado. Por ejemplo, la actividad biológica de muchas neurotoxinas clostridiales aumenta o se activa mediante el procesamiento proteolítico de una neurotoxina monocatenaria para producir una neurotoxina bicatenaria, en la que la neurotoxina bicatenaria está compuesta de una cadena polipeptídica ligera y una cadena polipeptídica pesada que están unidas covalentemente a través de un puente disulfuro. La actividad biológica de la neurotoxina incluye al menos tres actividades distintas: la primera actividad es una "actividad proteolítica" que reside en la cadena ligera de la neurotoxina y es responsable de hidrolizar el enlace peptídico de uno o más polipéptidos implicados en la regulación de la fusión de membranas celulares. Una segunda actividad es una "actividad de translocación", que reside en el extremo N-terminal de la cadena pesada de la neurotoxina procesada y está implicada en el transporte de la cadena ligera a través de la membrana lisosómica y hacia el interior del citoplasma. Una tercera actividad es una "actividad de unión al receptor", que reside en el extremo C-terminal de la cadena pesada de la neurotoxina procesada y está implicada en la unión y captación de la neurotoxina por una célula diana. En un aspecto preferido, la expresión actividad biológica, tal como se emplea en la presente, significa una actividad proteolítica. En un aspecto más preferido, la expresión significa una mayor actividad proteolítica.

La actividad biológica de la neurotoxina clostridial puede medirse por medio de diversos ensayos, todos los cuales son conocidos por los expertos en la técnica. Estos ensayos permiten determinar una o más de las actividades mencionadas anteriormente. Por ejemplo, el ensayo de DL<sub>50</sub> (DL: dosis letal) de ratón o el ensayo de hemidiafragma del nervio frénico de ratón ("mouse phrenic nerve hemidiaphragm", MPN) *ex vivo*, según se describe en Pearce *et al.*, 1994 (Pearce *et al.*, 1994, MacCallum R.D. (1994), Toxicol. Appl. Pharmacol., 128: 69-77) y Habermann *et al.*, 1980 (Habermann E., Dreyer F., Bigalke H. (1980), Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 311:33-40) permiten determinar el efecto tóxico de un neurotóxico concreto en preparación para un organismo vivo o una preparación neuromuscular aislada. Para establecer el efecto tóxico en un ensayo de DL<sub>50</sub>, la neurotoxina debe ser biológicamente activa en cada una de dichas tres actividades mencionadas anteriormente. Además están disponibles diversos otros ensayos que permiten, por ejemplo, determinar si una neurotoxina o la cadena ligera de la neurotoxina es proteolíticamente activa. Dichos ensayos se basan, por ejemplo, en poner en contacto BoNT/A con SNAP-25. Como alternativa puede utilizarse un péptido que representa el sitio de unión de SNAP-25, en el que el péptido puede marcarse para facilitar la detección. En una realización preferida, la actividad biológica se determina usando el ensayo de MPN descrito anteriormente en la presente.

En otra realización, dicho primer polipéptido es activado mediante el procesamiento proteolítico de un polipéptido precursor inactivo, y dicho polipéptido precursor inactivo comprende una secuencia polipeptídica que presenta al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO:2. Esta realización se basa en la observación de que un polipéptido que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:2 es proteolíticamente inactivo, mientras que sus truncamientos N-terminales son proteolíticamente activos. La presente descripción también contempla el uso del polipéptido proteolíticamente inactivo en los métodos descritos en la presente. El polipéptido proteolíticamente inactivo descrito en la presente puede activarse, por ejemplo, retirando un fragmento de la región N-terminal o la región N-terminal completa que comprende los restos aminoácidos 1 a 248 de SEQ ID NO:2. En una realización, la región N-terminal es retirada por una proteasa, y en otra realización, la región N-terminal es retirada por medio de autoproteólisis de SEQ ID NO:2. Un 60% de identidad de secuencia se refiere a un alineamiento de

secuencia con NT02CB1447 de longitud completa.

En otra realización, el método de la presente descripción para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente procesado comprende la etapa de purificar el segundo polipéptido proteolíticamente procesado o al menos uno o dos de sus productos de la ruptura. La purificación de BoNT/A expresada en *C. botulinum* puede realizarse, por ejemplo, como se describe fundamentalmente en la técnica anterior (DasGupta, 1984, *Toxicon*, 22, 415; Sathyamoorthy, 1985, *J. Biol. Chemistry.*, 260, 10461). En particular, la purificación de la neurotoxina puede comprender una o más etapas de precipitación y extracción, una o más etapas de concentración y otras etapas cromatográficas distintas. La BoNT/A monocatenaria recombinante y su purificación se describe en la técnica anterior (Rummel *et al.*, 2004, *Mol. Microbiol.*, 51:631-643).

10 En un caso preferido, la cepa de *Clostridium* es *C. botulinum*, por ejemplo, productora de BoNT/A, o uno de sus derivados. Para la fermentación, puede usarse el proceso descrito por DasGupta B. R. *et al.* en *Toxicon*, vol. 22, n.º 3, p. 414 a 424, 1984. Por tanto, se añade 0,5% de extracto de levadura y 0,6% de pasta de levadura sometida a autoclave a 2% del medio de N-Z-amina de tipo A, y se ajusta a un pH de 7,2 con la ayuda de NaOH 4 N, y el medio preparado de tal forma después se someterá a autoclave. A este medio puede añadirse por separado glucosa sometida a autoclave (al 20% en peso por volumen) para alcanzar una concentración final de glucosa de 0,5% en el medio. La incubación puede realizarse, por ejemplo, a 37 °C sin agitación, y la fermentación puede detenerse, por ejemplo, después de 96 horas. El alcance de la presente descripción incluye que, además de la fermentación discontinua descrita anteriormente, también pueda realizarse una fermentación semidiscontinua, una fermentación discontinua repetida o una fermentación continua.

20 Después de la fermentación real y de la separación del medio de fermentación de las células, el medio de fermentación puede sufrir una primera precipitación con el objetivo de retirar las proteínas grandes. La precipitación preferiblemente es una precipitación ácida. Las condiciones de reacción para dicha precipitación ácida son conocidas por los expertos en la técnica. Generalmente puede emplearse H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 M para acidificar el sobrenadante hasta un pH de 3,5. La centrifugación habitualmente se produce durante 20 minutos a 2400 x g a 4 °C. El sedimento obtenido a través de la centrifugación puede lavarse con agua, preferiblemente de modo repetido. Después, el sedimento puede extraerse con tampón citrato de trisodio-ácido cítrico 0,1 M, pH 5,5, por ejemplo durante una hora. Después, puede realizarse otra etapa de centrifugación, por ejemplo, a 9800 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sedimento obtenido de esta manera después opcionalmente puede extraerse de nuevo como se describió anteriormente. El sobrenadante de la extracción, y ambos sobrenadantes en el caso de repetición de la extracción, después puede someterse a una precipitación con sulfato de protamina. La precipitación puede continuar durante la noche, por ejemplo, a 8 °C. Después, el precipitado puede centrifugarse, por ejemplo, durante 20 minutos a 4 °C y a 12.000 x g. El sobrenadante de la centrifugación puede someterse a una precipitación, tal como una precipitación con sulfato de amonio, por la cual pueden retirarse otras proteínas más grandes. Después de la etapa de precipitación con sulfato de amonio puede añadirse otra etapa de centrifugación y, después, el sedimento obtenido de esta manera puede redisolverse y opcionalmente someterse a una diálisis. El extracto que preferiblemente se dializa y centrifuga de nuevo puede someterse a una sucesión de etapas de cromatografía con el objetivo de purificar la neurotoxina. Cada una de las etapas de cromatografía sirve para retirar contaminantes, tales como sulfato de protamina, ADN remanente, partes de proteínas más pequeñas y proteínas de tamaño intermedio, así como las hemaglutininas del complejo de proteínas de la neurotoxina botulínica. Para este fin, pueden usarse una o más etapas de cromatografía en un caso preferido. Opcionalmente, el eluato, por ejemplo, de la última etapa de cromatografía, puede filtrarse para reducir los gérmenes. Opcionalmente, el eluato puede diluirse antes de la filtración y pueden añadirse adyuvantes adecuados. Durante otras etapas puede realizarse otra filtración estéril después de la adición de los adyuvantes. En una realización, la filtración se realiza en recipientes de reacción que después pueden someterse a una etapa de liofilización.

45 La presente descripción también se refiere a una composición que puede obtenerse mediante el método de la presente descripción para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente procesado. En una realización, dicha composición comprende una mezcla del segundo polipéptido procesado y no procesado, en la que dicha mezcla puede contener menos del 5%, 4%, 3%, 2% o menos del 1% del segundo polipéptido no procesado. En una realización de dicha composición, dicho segundo polipéptido es BoNT o uno de sus derivados. La BoNT puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en BoNT de serotipo A, B, C, D, E, F y G, que incluye uno cualquiera de sus derivados. La composición puede ser, por ejemplo, una composición líquida o sólida y puede contener uno o más vehículos, adyuvantes y/o excipientes.

55 En otra realización, la presente descripción también se refiere a un método para la fabricación de un medicamento, concretamente, una composición farmacéutica, que comprende las etapas del método mencionado anteriormente y la etapa posterior de formular la neurotoxina bicatenaria purificada como un medicamento. En una realización, dicho medicamento comprende una mezcla del segundo polipéptido procesado y no procesado, en la que dicha mezcla contiene menos del 5% del segundo polipéptido no procesado. En casos preferidos, la mezcla contiene menos del 4%, 3%, 2% o menos del 1% del segundo polipéptido no procesado.

60 La presente descripción también se refiere a diversos usos médicos de los compuestos descritos en la presente. En una realización, la presente descripción se refiere a un polipéptido proteolíticamente activo según la presente descripción para su uso como medicamento o en una composición farmacéutica. En otra realización, la presente

descripción se refiere a una composición según la presente descripción para su uso como medicamento o en una composición farmacéutica. En otra realización, la presente descripción se refiere a un anticuerpo según la presente descripción para su uso como medicamento o en una composición farmacéutica. En otra realización, la presente descripción se refiere a un inhibidor según la presente descripción para su uso como medicamento o en una composición farmacéutica. En particular, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la presente descripción, el anticuerpo de la presente descripción, la composición de la presente descripción o el inhibidor de la presente descripción.

El término "composición", tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier composición formulada en forma sólida, líquida, en aerosol (o gaseosa) y similares. Dicha composición comprende, por ejemplo, un compuesto terapéuticamente activo de la descripción opcionalmente junto con compuestos auxiliares adecuados, tales como diluyentes o vehículos u otros ingredientes. En una realización, el compuesto terapéuticamente activo es el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción. En la presente se describe un compuesto terapéutico que es el segundo polipéptido proteolíticamente procesado, según se describe en la presente anteriormente, tal como la neurotoxina bicatenaria. En otra descripción, el compuesto terapéuticamente activo es el anticuerpo de la presente descripción. En otra realización, el compuesto terapéuticamente activo es el inhibidor del polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción.

En este contexto, en la presente descripción se distingue entre compuestos auxiliares, es decir, compuestos que no contribuyen a los efectos suscitados por el compuesto de la presente descripción 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 de la presente descripción. 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.

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 solos o con una cera. Dichos 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.

En una realización, una composición farmacéutica, tal como se usa en la presente, comprende la neurotoxina biológicamente activa que puede obtenerse mediante el método de la presente descripción, y opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. La neurotoxina activa puede estar presente en forma líquida o liofilizada. En una realización, dicho compuesto puede estar presente junto con glicerol, estabilizantes de proteínas (por ejemplo, albúmina de suero humana (HS)) o estabilizantes que no son proteínas, tales como polivinilpirrolidona o ácido hialurónico. La composición farmacéutica, en una realización, 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 polipéptido de neurotoxina bicatenario es el ingrediente activo de la composición y, en una realización, 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.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad del compuesto, la neurotoxina, que se va a usar en una composición farmacéutica de la presente descripción 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,  $DE_{50}$  (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población) y  $DL_{50}$  (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  $DL_{50}/DE_{50}$ .

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

5 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.

10 En otra realización de la descripción, la composición mencionada anteriormente es un medicamento o una composición cosmética. En una realización, dicho medicamento que comprende la neurotoxina biológicamente activa 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 blefaroespasma esencial benigno, espasmo hemifacial, y espasticidad focal, trastornos gastrointestinales, hiperhidrosis, y corrección de arrugas cosmética, en otro aspecto también el blefaroespasma, distonía oromandibular, del tipo de apertura de mandíbula, del tipo de cierre de mandíbula, bruxismo, síndrome de Meige, distonía lingual, apraxia del párpado, distonía cervical de apertura, antecollis, retrocollis, laterocollis, torticollis, 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, mioclonía mioquimia, rigidez, espasmos musculares benignos, temblor de la barbilla hereditario, actividad paradójica del músculo de la mandíbula, espasmos hemimasticatorios, miopatía branquial hipertrófica, hipertrofia masetérica, hipertrofia anterior tibial, nistagmo, oscilopsia, parálisis supranuclear progresiva, epilepsia, epilepsia partialis continua, planificación de una operación de torticollis 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 Odi, pseudoacalasia, no acalasia, trastornos motores esofágicos, vaginismo, temblor de inmovilización postoperatorio, disfunción de la vejiga, disinergia 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 postapopléctico, 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, tumores de la médula espinal, ronquidos (documento WO 2000/033863). Para los detalles y los síntomas, véase, por ejemplo, Jost, 2007, *Drugs*, 67(5), 669, o Dressler, 2000, en *Botulinum Toxin Therapy*, Thieme Verlag, Stuttgart, Nueva York.

50 En otra realización de la descripción, 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 de la presente descripción, en una realización, se use en forma sustancialmente pura. Las composiciones cosméticas, en otra realización, se aplicarán por vía intramuscular. En otra realización de la descripción, las composiciones cosméticas que comprenden la neurotoxina pueden formularse como una disolución antiarrugas.

55 En otra realización, la composición farmacéutica comprende el anticuerpo o el inhibidor de la presente descripción. Puesto que el polipéptido de la presente descripción es responsable de la activación de neurotoxinas clostridiales, el anticuerpo será útil para reducir el efecto tóxico observado durante la infección con clostridios. Por tanto, el anticuerpo de la presente descripción puede usarse, en un aspecto, para tratar una infección por clostridios, que incluyen *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* y *Clostridium oedematiens*. Además, el anticuerpo de la presente descripción puede usarse, en otra indicación, para el tratamiento de síntomas asociados con dicha infección. Además, dicho anticuerpo puede usarse en el tratamiento de un trastorno o un síntoma asociado con el trastorno, en el que el trastorno se selecciona de

botulismo, tétanos, colitis pseudomembranosa, gangrena, intoxicación alimentaria y similares.

En otro aspecto, la composición farmacéutica comprende el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción. Dicha composición farmacéutica puede usarse, en un aspecto, para romper proteolíticamente polipéptidos implicados en la coagulación, en particular para tratar pacientes con hipocoagulación. En otra realización, la composición farmacéutica puede usarse como fibrinolítico, en particular para tratar pacientes con infarto de miocardio, embolia pulmonar, tromboembolia venosa profunda, concretamente para retirar coágulos sanguíneos. También se contempla el uso de la composición farmacéutica para el tratamiento del ictus. Además, en otras realizaciones, la composición farmacéutica puede usarse en el tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina para reemplazar a la tripsina, la quimotripsina, la pepsina. Además, en otras realizaciones, la composición farmacéutica puede usarse en el tratamiento de pacientes afectados por reacciones inflamatorias, en el tratamiento de pacientes con cáncer, en particular para romper proteolíticamente antígenos tumorales expuestos sobre la superficie. Además, en otra realización, la composición farmacéutica puede usarse en el tratamiento del papiloma.

La presente descripción también se refiere a un método para seleccionar un inhibidor del polipéptido proteolíticamente activo de la invención, que comprende la etapa de (a) poner en contacto el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción con un sustrato conocido y, opcionalmente, con un inhibidor putativo; y (b) determinar el efecto del inhibidor putativo sobre la conversión del sustrato en el producto roto, en el que una reducción en la cantidad de producto roto es indicativa del efecto inhibitorio del inhibidor putativo. En una realización, el inhibidor putativo es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO:4 a 25, en la que al menos un aminoácido básico de dicha secuencia de aminoácidos está reemplazado por un aminoácido no básico. En otra realización, dicho péptido comprende una o más modificaciones químicas. En otra realización, el inhibidor es un peptidomimético de dicho péptido. En otra realización, el inhibidor putativo es parte de una micromatriz de compuestos químicos, es decir, una colección de compuestos químicos orgánicos. En otra realización, el inhibidor es el anticuerpo de la presente descripción. Este método es útil para identificar compuestos capaces de inhibir el polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción. Una selección inicial puede basarse, por ejemplo, en un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO:4 a 25. Los péptidos capaces de inhibir el polipéptido de la presente descripción pueden modificarse para aumentar la inhibición. Las modificaciones incluyen la sustitución de aminoácidos o modificaciones químicas. Generalmente, este método se realiza poniendo en contacto el polipéptido de la presente descripción con un sustrato conocido en presencia y ausencia de un inhibidor putativo (etapa (a) del método) y comparando el efecto del inhibidor putativo sobre la conversión del sustrato en el producto de la ruptura. Una reducción en la tasa de conversión en presencia del inhibidor putativo es indicativa de un efecto inhibitorio.

La presente descripción también se refiere a un inhibidor del polipéptido proteolíticamente activo de la presente descripción, en el que dicho inhibidor (a) es un inhibidor que comprende una secuencia de aminoácidos según se muestra en cualquiera de SEQ ID NO:4 a 25, en la que al menos un aminoácido básico contenido en ella está reemplazado por un aminoácido no básico; o (b) es el anticuerpo de la presente descripción.

Las figuras muestran:

Figura 1: Ensayo de la actividad de fracciones recolectadas de HiPrep 16/10 Q FF. Se analizaron 5 µl de fracciones recolectadas del ensayo de HiPrep 16/10 Q FF para la actividad enzimática incubando 2 µg de scBoNTA (carril 2) durante 1 h a 37 °C y después con SDS al 10%-PAGE. Carril 1: marcador de peso molecular bajo ("low molecular weight marker", LMW): 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa.

Figura 2: Análisis de las fracciones recolectadas de SEC (HiLoad 16/60 Superdex 75) con respecto al contenido en nBH con un peso molecular de aproximadamente 37,3 kDa mediante SDS al 12,5%-PAGE. Las fracciones 9 a 11 contiene la mayoría de nBH (carril 1: LMW: 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18,4 kDa, 14,4 kDa).

Figura 3: Análisis de SDS al 12,5%-PAGE para la determinación de la pureza y la concentración de proteínas de tres lotes de purificación de nBH. Carril 1, LMW (116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18,4 kDa, 14,4 kDa); carril 2, nBH lote TE311206 (192 ng/µl de NT02CB1446/CBO1444 madurado, aminoácidos 254-594 de n.º de registro de Genbank CAL82987.1, PM: 38,6 kDa); carril 3, nBH lote TIK301009 (130 ng/µl de NT02CB1447/CBO1445 madurado, SEQ ID NO:1, aminoácidos 249-581 de n.º de registro de Genbank CAL82988.1, PM: 37,3 kDa); carril 4, nBH lote TIK280509 (114 ng/µl de NT02CB1447/CBO1445 madurado, SEQ ID NO:1, aminoácidos 249-581 de n.º de registro de Genbank CAL82988.1, PM: 37,3 kDa).

Figura 4: Informe del análisis de espectros ESI-MS/MS. Se identificó la banda de proteínas de 38,6 kDa de nBH lote TE311206 como NT02CB1446/CBO1444 con una puntuación de Mascot de 725 y una cobertura de secuencia de MS/MS del péptido del 29,6% a lo largo del marco de lectura abierto ("open reading frame", ORF) entero. No se identificaron péptidos (recuadro gris, péptido identificado con MS; cuadrados rojos, y/-b-ión de aminoácido del péptido identificado después de la descomposición de MS/MS) derivados de los 253 aminoácidos N-terminales. El análisis de MS/MS del lote TE311206 mostró una cobertura de secuencia del 52% según los 254-594 aminoácidos C-terminales que forman la nBH.

Figura 5: Informe del análisis de espectros ESI-MS/MS. Se identificó la banda de proteínas de 37,3 kDa de nBH lote

TIK301009 como NT02CB1447/CBO1445 con una puntuación de Mascot de 555 y una cobertura de secuencia de MS/MS del 28,4% a lo largo del marco de lectura abierto (ORF) entero. Excepto uno, todos los péptidos identificados (recuadro gris, péptido identificado con MS; cuadrados rojos, y/-ión de aminoácido del péptido identificado después de la descomposición de MS/MS) se derivan de los 333 aminoácidos C-terminales. El análisis de MS/MS del lote TIK301009 mostró una cobertura de secuencia del 49,5% según los 249-581 aminoácidos C-terminales que forman la nBH.

Figura 6: Comparación de la actividad proteolítica dependiente de la concentración de la nBH derivada de tres lotes de purificación. A. SDS al 12,5%-PAGE del ensayo de actividad que analiza nBH derivado de los lotes TIK301009, TIK280509 y TE311206 usando las siguientes diluciones de la nBH concentrada: 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000. El ensayo se realizó incubando 1 µg de scBoNT/A y 2 µl de dH<sub>2</sub>O y 1 µl de la nBH diluido de modo correspondiente durante 60 min a 37 °C. Para el análisis de SDS-PAGE, se añadieron 3 µl de 4x tampón de SDS Laemmli reductor hasta un volumen final de 10 µl. La scBoNT/A de 150 kDa se rompió en una cadena pesada de 100 kDa y una cadena ligera de 50 kDa. B. Se cuantificó la densidad óptica de las bandas de proteínas de cadena pesada, cadena ligera y scBoNT/A, y la suma de las bandas de producto de cadena ligera y pesada se dividió entre la suma de las bandas de proteínas de LC, HC y scBoNT/A. Una mayor dilución del primer polipéptido disminuye la tasa de ruptura. La actividad proteolítica específica de los tres lotes diferentes es casi idéntica.

Figura 7: Ruptura dependiente del tiempo de scBoNT/A de tipo salvaje y mutantes que contienen un bucle modificado por nBH. A. Modificación de la secuencia de bucle. En scBoNTAS Throm se retiraron todos los restos lisina y se insertó la secuencia de reconocimiento de trombina LVPRGS, mientras que en scBoNT Res, el bucle carece de aminoácidos básicos. El acortamiento del bucle hasta ocho restos pequeños o cinco aminoácidos con cadenas laterales voluminosas produce scBoNTAS (GGSG)<sub>2</sub> y scBoNTAS FQWYI, respectivamente. En scBoNTAS CGS-C, el bucle completo se deletorea, y las cisteínas formadoras de puentes disulfuro se reemplazan por glicina y serina. B. Análisis de SDS-PAGE de la ruptura dependiente del tiempo de scBoNT/A de tipo salvaje y mutantes. C. La scBoNTAS de tipo salvaje es activada por nBH de una manera dependiente del tiempo para producir una cadena ligera y una cadena pesada dentro de 120 min. La falta de lisinas y la inserción de un único resto arginina prolonga la ruptura del bucle (scBoNTAS Throm). Un bucle que carece de restos básicos aún puede romperse (scBoNTAS Res). El acortamiento del bucle a un péptido 8-mero, la introducción de cinco aminoácidos con cadenas laterales voluminosas o la delección del bucle entero produce una scBoNT/A que no puede romperse.

Figura 8: Análisis de MS/MS de los productos de la ruptura de 50 kDa y 100 kDa tras la digestión de scBoNT/A con nBH. A. Análisis del producto de la ruptura de 50 kDa que se identificó como la cadena ligera de BoNT/A con una puntuación de Mascot de 1460. El péptido atribuido como el más C-terminal cubre los aminoácidos G433 a K438 que se corresponden con la región C-terminal fisiológicamente observada de BoNT/A LC. B. Análisis del producto de la ruptura de 100 kDa que se identificó como la cadena pesada de BoNT/A con una puntuación de Mascot de 96. El péptido atribuido como el más N-terminal cubre los aminoácidos A449 a K456 que se corresponden con la región N-terminal fisiológicamente observada de BoNT/A HC.

Figura 9: A. El contenido en proteínas (mg/ml) de anti-nBH-IgY de otros tres conjuntos se analizó mediante SDS al 12,5%-PAGE. B. ELISA: Se revistieron placas de microtitulación Nunc Maxisorp F96 con nBH de diversos lotes (500 ng/ml) en PBS durante la noche a 4 °C y después se bloquearon durante 1 h con tampón de bloqueo de PBS que contenía Tween-20 al 0,1% y leche desnatada al 2%. Después de lavar se añadió una dilución de IgY de cada conjunto (10 µg/ml en tampón de bloqueo) durante 1 h y se detectó usando anti-IgY de pollo de burro marcada con biotina y estreptavidina-peroxidasa de rábano (ambos de Dianova, Hamburgo, Alemania) y 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma).

Figura 10: A. Expresión recombinante y aislamiento de BH 1-581 inactivo (63 kDa) mediante Talon IMAC. Análisis de SDS al 10%-PAGE de fracciones de Talon IMAC (LMW: 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa; SS34, lisado transparente; TD, corriente; W, fracción de lavado; E1-E7, fracciones eluidas con imidazol 1 a 7). B. No se observa endoproteólisis de scBoNT/A para producir LC (50 kDa) y HC (100 kDa) con iBH recombinante (SEQ ID NO:2; "E"; 63 kDa) a 37 °C después de 1 h (carril 6) (LMW: 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa).

Figura 11: Uso de BoNTHidrolasa activa purificada (nBH) para obtener el polipéptido proteolíticamente procesado. A. Se incubaron 200 µg de scBoNT/A purificada recombinante con 350 ng de BoNTHidrolasa activa purificada durante 12 min a 37 °C. Para detener la reacción se retira la nBH mediante SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y la cantidad de ruptura se analiza mediante SDS al 10%-PAGE. B. La fracción 1 (1800 µl) que contiene aproximadamente 40% de BoNT/A procesada se incuba con 350 ng de BoNTHidrolasa activa purificada durante 15 min a 37 °C y se concentra hasta 300 µl mediante ultrafiltración. Para finalmente detener la reacción se retira la nBH mediante SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y la cantidad de ruptura se analiza mediante SDS al 10%-PAGE. C. Las fracciones 1 y 2 (1800 µl) que contienen aproximadamente 80% de BoNT/A procesada se combinan y se incuban con 120 ng de BoNTHidrolasa activa purificada durante 25 min a 37 °C y se concentran hasta 300 µl mediante ultrafiltración. Para finalmente detener la reacción se retira la nBH mediante SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y la cantidad de ruptura se analiza mediante

SDS al 10%-PAGE. Se obtiene >95% de BoNT/A procesada (SEQ ID NO:3).

El listado de secuencias muestra:

SEQ ID NO:1: Polipéptido proteolíticamente activo derivado de *Clostridium botulinum* cepa ATCC 3502, n.º de registro de GenBank: "CAL82988.1", que carece de los 248 restos aminoácidos N-terminales

- 5 SEQ ID NO:2: Polipéptido proteolíticamente inactivo derivado de *Clostridium botulinum* cepa ATCC 3502, n.º de registro de GenBank: "CAL82988.1"

SEQ ID NO:3: BoNT/A de ATCC 3502, n.º de registro de Genbank "AAA23262"

SEQ ID NO:4: Bucle de BoNT/A1

SEQ ID NO:5: Bucle de BoNT/A2/A6

- 10 SEQ ID NO:6: Bucle de BoNT/A3

SEQ ID NO:7: Bucle de BoNT/A3

SEQ ID NO:8: Bucle de BoNT/A4

SEQ ID NO:9: Bucle de BoNT/A5

SEQ ID NO:10: Bucle de BoNT/A7

- 15 SEQ ID NO:11: Bucle de BoNT/B1/B4bv/B6

SEQ ID NO:12: Bucle de BoNT/B2/B3

SEQ ID NO:13: Bucle de BoNT/B5np

SEQ ID NO:14: Bucle de BoNT/C/CD

SEQ ID NO:15: Bucle de BoNT/D

- 20 SEQ ID NO:16: Bucle de BoNT/DC

SEQ ID NO:17: Bucle de BoNT/E1-E5

SEQ ID NO:18: Bucle de BoNT/E6

SEQ ID NO:19: Bucle de BoNT/F1/F6

SEQ ID NO:20: Bucle de BoNT/F2/F3

- 25 SEQ ID NO:21: Bucle de BoNT/F4

SEQ ID NO:22: Bucle de BoNT/F5

SEQ ID NO:23: Bucle de BoNT/F7

SEQ ID NO:24: Bucle de BoNT/G

SEQ ID NO:25: Bucle de TeNT

- 30 SEQ ID NO:26: Secuencia de ácido nucleico que codifica SEQ ID NO:1

SEQ ID NO:27: Secuencia de ácido nucleico que codifica SEQ ID NO:2

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

### Ejemplos

- 35 Ejemplo 1: Purificación y caracterización de la BoNTHidrolasa nativa (nBH), que rompe específicamente la BoNT/A monocatenaria para producir su forma bicatenaria activa

(1) Sistema de lectura/ensayo de actividad: Para detectar específicamente y purificar una neurotoxina botulínica A hidrolizante con actividad enzimática (BoNT/A) en la cadena ligera de 50 kDa (LC) y la cadena pesada de 100 kDa (HC) en sobrenadantes de cultivo de *C. botulinum* y entre etapas cromatográficas, se expresó la BoNT/A de 150 kDa como un polipéptido monocatenario ("single chain", sc) en *E. coli*. La incubación de la scBoNT/A recombinante con la

40

actividad enzimática apropiada (nBH) debería producir una LC de 50 kDa y una HC de 100 kDa HC que se visualizan mediante SDS al 10-13%-PAGE reductora.

5 (2) Expresión de proteasa clostridial: Se inoculó una única colonia de *C. botulinum* cepa ATCC 3502 en 100 ml de medio de infusión de cerebro y corazón ("brain heart infusion", BHI) y el cultivo se incubó durante la noche a 37 °C bajo condiciones anaerobias. Se inocularon 10 ml del cultivo cultivado durante la noche en 1 l de medio BHI y se incubó de modo anaerobio durante 48-72 h.

10 (3) Precipitación con sulfato de amonio: El sobrenadante del cultivo de 1 l se recolectó mediante centrifugación (4°C, 6500 x g, 25 min). Se añadió sulfato de amonio hasta una concentración final del 85% (en este caso 575 g), la suspensión se agitó durante 6 horas a 4 °C y después se centrifugó (4 °C, 6500 x g, 30 min). El precipitado de sulfato de amonio sedimentado se disolvió en un volumen pequeño (en este caso 5 ml) de NaP 50 mM, pH 7,5, y se dializó contra NaP 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. Por último, el dializado se centrifugó (4 °C, 40000 x g, 60 min) y el sobrenadante se usó para la IEC.

15 (4) Cromatografía de intercambio iónico ("ion exchange chromatography", IEC, columna HiPrep 16/10 Q FF): El sobrenadante de (3) (figura 1, carril 3) se aplicó a una columna de intercambio aniónico HiPrep 16/10 Q FF equilibrada con un tampón que contenía NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM. El ensayo se realizó con un caudal de 1 ml/min. Se realizó un ensayo de actividad incubando 5 µl de cada fracción con 2 µg de scBoNTA durante 1 h a 37 °C y un posterior análisis con SDS-PAGE (figura 1). Las fracciones 6-24 se reunieron y su volumen se concentró hasta 3,5 ml usando ultrafiltración (Amicon-Ultra, valor de corte de peso molecular 10.000).

20 (5) Cromatografía de exclusión molecular ("size exclusion chromatography", SEC, HiLoad 16/60 Superdex 200): Después, la disolución de proteína concentrada de (4) se cargó sobre una columna HiLoad 16/60 Superdex 200, equilibrada con NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM. La separación se realizó con un caudal de 1 ml/min. Las fracciones con un volumen de retención entre 80 ml y 100 ml se analizaron empleando el ensayo de actividad (1) y se reunieron las fracciones apropiadas que contenían la actividad enzimática (nBH) (aproximadamente 10 ml) y se concentraron hasta 3 ml mediante ultrafiltración. Después se añadió sulfato de amonio hasta una concentración final del 12,5% = 500 mM (+ 0,2 g).

30 (6) Cromatografía de interacción hidrofoba ("hydrophobic interaction chromatography", HIC, HiTrap Phenyl Sepharose): La nBH se unió a Phenyl Sepharose en tampón A (NaP 50 mM, pH 7,5, sulfato de amonio 500 mM). La nBH unida eluyó reduciendo la cantidad de sulfato de amonio por medio de un gradiente lineal creciente con tampón B (NaP 50 mM, pH 7,5) a un caudal de 1 ml/min. Todas las fracciones que contenían proteínas se analizaron utilizando el ensayo de actividad (1) y las fracciones apropiadas se reunieron y se concentraron mediante ultrafiltración hasta 3,5 ml. El tampón de la disolución se ajustó a NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM.

35 (7) SEC (HiLoad 16/60 Superdex 75): Por último, la nBH se purificó mediante SEC usando la columna HiLoad 16/60 Superdex 75 a NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y un caudal de 1 ml/min. Las fracciones con un volumen de retención entre 70 ml y 80 ml se analizaron mediante SDS al 12,5%-PAGE (figura 2) y se reunieron las fracciones 8-12 que contenían la nBH que migra a aproximadamente 37,3 kDa (aproximadamente 10 ml) y se concentraron hasta 1 ml mediante ultrafiltración.

(8) La proteína más prominente que migra a aproximadamente 37,3 kDa (nBH) se analizó mediante secuenciación peptídica N-terminal según el protocolo de degradación de Edman. La secuencia del péptido identificado es V Q G Q S V K G V G y se corresponde con los primeros diez restos de SEQ ID NO:1.

40 (9) Se aislaron de modo reproducible dos lotes de nBH (NT02CB1447, 37,3 kDa, figura 3, carril 3: TIK301009, carril 4: TIK280509) según el procedimiento descrito anteriormente. Ciertas modificaciones del procedimiento de aislamiento producen la nBH de isoforma NT02CB1446 (38,6 kDa, figura 3, carril 2, lote TE311206): (i) crecimiento del cultivo de *C. botulinum* : durante 18 h en lugar de 48 a 72 h; (ii) variación de las etapas cromatográficas: IEC -> SEC Superdex 75 -> HIC Phenyl Sepharose en lugar de IEC-> SEC Superdex 200 -> HIC Phenyl Sepharose -> SEC Superdex 75.

45 Ejemplo 2: Identificación de la secuencia de nBH a partir de *C. botulinum* mediante espectrometría de masas (MS)

50 (1) Digestión triptica: Las bandas de proteínas que migran a aproximadamente 38 kDa (nBH) en SDS-PAGE se retiraron para la digestión triptica y se destiñeron mediante una agitación suave en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM, acetonitrilo al 50% durante 30 min a 37 °C. El desteñido se repitió hasta que las manchas de gel fueron transparentes. Se añadió acetonitrilo (al 100%) y se retiró después de 3 min. Posteriormente, las manchas se secaron en un sistema al vacío rápido (Eppendorf, Alemania). Se añadió tripsina (10 ng/µl) en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM y se incubó en hielo durante 1 h. Después se retiró el resto de la disolución de tripsina, se añadió un volumen pequeño de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM y se llevó a cabo la digestión a 37 °C durante la noche. El sobrenadante se recogió y los trozos de gel se extrajeron usando TFA al 5%, acetonitrilo al 10% dos veces. Todos los fluidos se reunieron, se secaron al vacío rápido y los péptidos extraídos se conservaron a 4 °C.

55 (2) MS de tiempo de vuelo de ionización de desorción de láser asistida por matriz ("matrix assisted laser desorption ionisation time of flight", MALDI-TOF/TOF): Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF (Ultraflexl Bruker Daltonik GmbH) en modo lineal con un voltaje de aceleración de 25 kV. Las masas se

detectaron desde 700 m/z hasta 4.500 m/z. Las muestras (2 µl) se cocristalizaron con 2 µl de disolución de ácido sinapínico que contenía acetonitrilo al 50% y ácido trifluoroacético (TFA) al 0,2% directamente sobre una placa diana de acero inoxidable MALDI. Se recogieron 500 disparos de láser para cada muestra.

5 (3) Separación de los péptidos mediante cromatografía en fase inversa: La separación de los péptidos se realizó mediante una cromatografía en fase inversa usando un sistema nano-HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) que consiste en un automuestreador y una bomba de gradiente. La muestra se disolvió en tampón A (acetonitrilo al 5%, ácido fórmico al 0,1%) y una parte alícuota de hasta 10 µl se inyectó en una columna C18 (Zorbax SB-C18, 5 µm, 300 Å, diámetro interno de 0,5 mm, longitud 15 cm) a un caudal de 5 µl/min. Después de cargar, la columna se lavó durante 15 min con tampón A y los péptidos eluyeron usando un gradiente de eluyente A y eluyente B (acetonitrilo al 70% (en v/v) en ácido fórmico al 0,1% (en v/v)) desde 0% al 100% de eluyente B durante 10 y 75 min.

15 (4) Interfase de ionización de electropulverización ("electrospray ionisation", ESI)-espectrometría de masas de trampa de iones: La salida de la HPLC se conectó directamente con la fuente de nanoESI de un espectrómetro de masas de trampa de iones y se empleó la pulverización de líquidos con envuelta coaxial Agilent (Agilent Technologies). La salida del capilar se sostenía por medio de una aguja de acero circundante y sobresalía de esta de 0,1 a 0,2 mm. El pulverizado se estabilizó mediante N<sub>2</sub> como un gas nebulizador (5 l/min). El voltaje de ionización se ajustó a 4.500 V y se aplicó gas seco a 34,47 kPa (5 psi) y 250 °C. Los espectros se recogieron con un espectrómetro de masas de trampa de iones Esquire3000+ (Bruker Daltonik) a una velocidad de barrido de 13.000 m/z por segundo. Empleando ESI en modo positivo, se adquirieron espectros de masas desde 50 a 1600 m/z en el modo de barrido y el cambio entre análisis de MS y MS/MS dependiente de los datos. Para aumentar la calidad de los espectros de MS/MS se seleccionaron solo dos iones precursores de un espectro para el análisis de MS/MS y la exclusión activa se ajustó a 2 min para excluir los iones precursores que ya habían sido medidos. 20

25 (4) Procesamiento de los datos: El procesamiento de los datos se realizó con los paquetes informáticos Data Analysis (versión 3.0) y BioTools (versión 3.0) (Bruker Daltonik). La identificación de las proteínas se realizó empleando el programa informático MASCOT (versión 2.1) y la base de datos MSDB (Matrix Science, Londres, Reino Unido).

(5) Resultados:

Tabla 2 - nBH identificada mediante MS

Carril	Lote de nBH	Concent. de proteínas	Nombre del ORF	n.º de registro de Genbank	aa del ORF	PM [kDa]	Puntuación de Mascot
2	TE311206	192 ng/µl	NT02CB 1446 CBO1444	CAL82987.1	254-594	38,6	725
3	TIK301009	130 ng/µl	NT02CB1447 CBO1445	CAL82988.1	249-581	37,3	555
4	TIK280509	114 ng/µl	NT02CB1447 CBO1445	CAL82988.1	249-581	37,3	609

30 La banda de proteínas de 38,6 kDa del carril 2 (nBH lote TE311206) se identificó como NT02CB1446/CBO1444 con una puntuación de Mascot de 725 y una cobertura de secuencia de MS/MS del péptido del 29,6% a lo largo del marco de lectura abierto (ORF) entero. No se identificaron péptidos derivados de los 253 aminoácidos N-terminales (figura 4). El análisis de MS/MS del lote TE311206 mostró una cobertura de secuencia del 52% según los 254-594 aminoácidos C-terminales que forman la nBH.

35 Las bandas de proteínas de 37,3 kDa del carril 3 (nBH lote TIK301009) y carril 4 (nBH lote TIK280509) se identificaron como NT02CB1447/CBO1445 con una puntuación de Mascot de 555 y 609, respectivamente. Excepto uno, todos los péptidos identificados se derivan de los 333 aminoácidos C-terminales (figura 5). El análisis de MS/MS del lote TIK301009 mostró una cobertura de secuencia del 49,5% según los 249-581 aminoácidos C-terminales que forman la nBH.

40 Ejemplo 3: Caracterización de la especificidad enzimática de nBH

(1) Se comparó la actividad proteolítica de nBH dependiente de la concentración derivada de tres lotes de purificación (figura 6). Un análisis de la actividad que analiza la nBH derivada de los lotes TIK301009, TIK280509 y TE311206 usando diversas diluciones de nBH demuestra que unas diluciones mayores disminuyen la tasa de ruptura. La actividad proteolítica de los tres lotes diferentes es casi idéntica, lo cual indica que la isoforma madurada NT02CB1446 (TE311206) muestra una actividad específica similar a la NT02CB1447 madurada (SEQ ID NO:1). 45

- (2) Se analizó la ruptura dependiente del tiempo de scBoNT/A de tipo salvaje y mutantes empleando el ensayo de actividad (figura 7). La scBoNTAS de tipo salvaje es activada por nBH de una manera dependiente del tiempo para producir la cadena ligera y la cadena pesada en 120 min en más del 95%. La secuencia del bucle se modificó para caracterizar el sitio de ruptura. En scBoNTAS Throm se retiraron todos los restos lisina y se inserta la secuencia de reconocimiento de trombina LVPRGS que prolonga la tasa de ruptura. En scBoNT Res, el bucle carece de aminoácidos básicos que retrasan drásticamente la hidrólisis completa, indicando una fuerte preferencia de reconocimiento de nBH por los restos básicos, tales como lisina y arginina, en el sitio de ruptura. Además, la accesibilidad de nBH al bucle se ve dificultada por el acortamiento del bucle hasta ocho restos pequeños o cinco aminoácidos con cadenas laterales voluminosas (scBoNTAS (GGSG)<sub>2</sub> y scBoNTAS FQWYI).
- (3) El análisis de MS/MS del producto de ruptura de 50 kDa tras la digestión de scBoNT/A con nBH demuestra que el péptido atribuido como el más C-terminal cubre los aminoácidos G433 a K438 que se corresponden con la región C-terminal fisiológicamente observada de BoNT/A LC (figura 8A). El análisis del producto de la ruptura de 100 kDa, que se identificó como la cadena pesada de BoNT/A, demuestra que el péptido atribuido como el más N-terminal cubre los aminoácidos A449 a K456 que se corresponden con la región N-terminal fisiológicamente observada de BoNT/A HC (figura 8B). Así, la nBH aislada produce BoNT/A fisiológicamente procesada e hidroliza preferentemente los enlaces peptídicos C-terminales con respecto a los restos lisina y arginina.

#### Ejemplo 4: Conservación evolutiva de BoNTHidrolasa y sus isoformas

- El análisis de la secuencia de proteínas de SEQ ID NO:2 (n.º de registro de Genbank CAL82988.1/YP\_001253958.1) reveló tres dominios conservados. Los restos 18-573 se corresponden con una metaloproteasa de cinc (elastasa) o LasB implicado en el transporte de aminoácidos y el metabolismo con una puntuación Blast de 738. Los restos 148-212 se corresponden con un propéptido de peptidasa y el dominio YPEB o PepSY (puntuación Blast de 97). Los restos 336-573 son parte de la familia de peptidasas M4 que incluyen termolisina, protealislina, aureolisina y proteasas neutras (puntuación de Blast de 803).

- La secuenciación del genoma de *C. botulinum* ATCC 3502 reveló la existencia de seis ORF que codifican isoformas de iBH (Sebahia *et al.*, 2007, Genome Res., 17(7):1082-1092). Otros datos del genoma están disponibles para 10 cepas del grupo I de *C. botulinum*, así como *C. sporogenes* que no segrega BoNT, conteniendo todas entre cinco y siete ORF que codifican iBH. La nBH (SEQ ID NO:1) comparte un mínimo del 64% de identidad de secuencia de aminoácidos con las otras 63 isoformas.

#### Ejemplo 5: Generación de anticuerpo específicos para la BoNTHidrolasa

- (1) Generación de IgY: Se mantuvieron gallinas de dieciséis semanas de edad [ISA Brown and Lohmann Selected Leghorn (LSL), Spreenhagener Vermehrungsbetrieb für Legehennen GmbH, Bestensee, Alemania] en jaulas individuales, exclusivamente construidas para el mantenimiento de gallinas (Ebeco, Castrop-Rauxel, Alemania). Se les proporcionó alimento (ssniff Legehühner-Zucht 1 y 2; ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Alemania) y agua sin límite y las gallinas comenzaron a poner huevos entre las 23 y las 25 semanas de edad. Los huevos se recogieron a diario, se marcaron y se conservaron a 4 °C hasta que fueron procesados después. El mantenimiento y los experimentos con los animales se realizaron según las directrices de las autoridades locales, Berlín (n.º H0069/03). Las gallinas se inmunizaron y recibieron una inmunización de refuerzo por vía intramuscular (músculo pectoral, lado izquierdo y derecho) un total de 10 veces a lo largo de un periodo de 1 año, con intervalos de entre 4 y 8 semanas. El intervalo usado se basó en trabajos previos que demostraban que no se producían células de memoria demostrables al menos hasta 3 semanas después de la inmunización (Pei y Collisson, 2005). La concentración de antígeno empleada fue de aproximadamente 20 µg por inyección (nBH). No se inyectaron más de 500 µl de disolución de antígeno por inmunización. Se empleó adyuvante completo de Freund para la primera inmunización, y se usó FIA para las posteriores inyecciones de refuerzo. El método para la purificación de IgY se adaptó de Polson *et al.* (1980). Brevemente, la yema de huevo se diluyó 1:2 con PBS estéril (pH 7,4, Roche, Mannheim, Alemania). Para la eliminación de los lípidos y lipoproteínas se añadió polietilenglicol 6000 (PEG) al 3,5% (en p/v) (Roth, Karlsruhe, Alemania). Después de una agitación suave, seguida de una centrifugación (10.000 x g durante 20 min a 4 °C), el sobrenadante se decantó y se añadió PEG 6000 sólido hasta una concentración final del 12% (en p/v). Esta mezcla después se centrifugó como se indicó anteriormente. El precipitado se disolvió en 10 ml de PBS, se añadió PEG hasta 12% (en p/vol), y la disolución se centrifugó. Por último, el precipitado se disolvió en 1,2 ml de PBS, se trasladó a un dispositivo de microdiálisis (QuixSep, Roth, Alemania) y se dializó contra PBS a 4 °C. El contenido en proteínas (mg/ml) se analizó mediante SDS al 12,5%-PAGE (figura 9A) y se midió fotométricamente a 280 nm y se calculó según la ley de Lambert-Beer con un coeficiente de extinción de 1,33 para IgY.
- (2) ELISA: Se revistieron placas de microtitulación Nunc Maxisorp F96 (VWR International GmbH, Darmstadt, Alemania) con nBH de diversos lotes (500 ng/ml) en PBS durante la noche a 4 °C y después se bloquearon durante 1 h con tampón de bloqueo de PBS que contenía Tween-20 al 0,1% y leche desnatada al 2% (Merck, Darmstadt, Alemania). Después de lavar se añadió una dilución de IgY (10 µg/ml en tampón de bloqueo) durante 1 h y se detectó usando anti-IgY de pollo de burro marcada con biotina y estreptavidina-peroxidasa de rábano (ambos de Dianova, Hamburgo, Alemania) y 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma). La nBH detectada se ilustra en la figura 9B.
- (3) Transferencia Western: La nBH se separó con SDS al 12,5%-PAGE, y se trasladó a una membrana de

poli(fluoruro de vinilideno) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) empleando técnicas de inmunotransferencia convencionales. La membrana se bloqueó durante la noche a 4 °C y se incubó con IgY (1:5.000 en tampón de bloqueo) durante 1 h. Después de lavar, la membrana se sondó con anti-IgY de pollo de burro marcada con biotina durante 30 min y se reveló empleando fosfatasa alcalina y CDP-Star (Perkin Elmer, Waltham, MA).

5 Ejemplo 6: Expresión recombinante de BoNTHidrolasa

(1) Construcciones de plásmidos: Las porciones génicas que codifican la BH nativa (SEQ ID NO:1) y su propéptido (SEQ ID NO:2) se amplificaron mediante PCR utilizando oligonucleótidos adecuados y ADN genómico de *C. botulinum* ATCC 3502, condensados con un oligonucleótido que codifica His6Tag e insertado en pQE3 (Qiagen) produciendo los plásmidos de expresión pQBH1445H6-249-581 y pQ-BH1445H6-1-581, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos se verificaron mediante secuenciación de ADN.

(2) Purificación de proteínas recombinantes: Se produjeron nBH e iBH, condensadas al His6Tag carboxilo-terminal, utilizando *E. coli* de la cepa M15pREP4 (Qiagen) durante diez horas de incubación a temperatura ambiente, y se purificaron con esferas de Talon-Sepharose (Clontech Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las fracciones que contienen las proteínas deseadas se reunieron, se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70 °C. La iBH se aisló como una proteína recombinante con un PM de 63 kDa (figura 10A). La inactividad de iBH se demostró usando el ensayo de actividad: después de 1 h a 37 °C la scBoNT/A wt no se hidrolizó para producir LC y HC (figura 10B).

Ejemplo 7: Inhibición de BoNTHidrolasa

(1) Selección de inhibidores peptídicos de BH: Se sintetizan péptidos basados en SEQ ID NO:4 a 25 que carecen de uno o más restos básicos. Cada péptido se añade a la mezcla según el ensayo de actividad. Un péptido que es capaz de disminuir la cantidad de scBoNT/A procesada, de prolongar la duración requerida para procesar completamente la scBoNT/A o de bloquear el procesamiento de scBoNT/A se considera un inhibidor de nBH.

(2) Selección de inhibidores basados en anticuerpos: Se incuban anticuerpos generados contra epitopos derivados de nBH, tal como IgY del ejemplo 5, con nBH y después se someten al ensayo de actividad. Un anticuerpo que es capaz de disminuir la cantidad de scBoNT/A procesada, de prolongar la duración requerida para procesar completamente la scBoNT/A o de bloquear el procesamiento de scBoNT/A se considera un inhibidor de nBH.

Ejemplo 8: Uso de BoNTHidrolasa activa purificada (nBH) para obtener el polipéptido proteolíticamente procesado

(1) Se incubaron 200 µg de scBoNT/A purificada recombinante con 350 ng de BoNTHidrolasa activa purificada durante 12 min a 37 °C. Para detener la reacción se retira la nBH mediante SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y la cantidad de ruptura se analiza mediante SDS al 10%-PAGE (figura 11A).

(2) La fracción 1 (1800 µl) que contiene aproximadamente 40% de BoNT/A procesada se incuba con 350 ng de BoNTHidrolasa activa purificada durante 15 min a 37 °C y se concentra hasta 300 µl mediante ultrafiltración. Para finalmente detener la reacción se retira la nBH mediante SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y la cantidad de ruptura se analiza mediante SDS al 10%-PAGE (figura 11B).

(2) Las fracciones 1 y 2 (1800 µl) que contienen aproximadamente 80% de BoNT/A procesada se combinan y se incuban con 120 ng de BoNTHidrolasa activa purificada durante 25 min a 37 °C y se concentran hasta 300 µl mediante ultrafiltración. Para finalmente detener la reacción se retira la nBH mediante SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y la cantidad de ruptura se analiza mediante SDS al 10%-PAGE (figura 11C). Se obtiene >95% de BoNT/A procesada (SEQ ID NO:3). Se obtiene el segundo polipéptido totalmente procesado idéntico (>95% de BoNT/A procesada) si el segundo polipéptido se procesa en una etapa durante 50 min a 37 °C (200 µg de scBoNT/A incubados con 350 ng de nBH). Después de un tiempo de incubación de 1 h a 37 °C, se procesa más del 97% de BoNT/A.

45 **Listado de secuencias**

<110> toxogen GmbH

<120> Métodos para la fabricación de polipéptidos proteolíticamente procesados.

<130> 757-1

<160> 27

50 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 333

ES 2 708 661 T3

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<400> 1

Val Gln Gly Gln Ser Val Lys Gly Val Gly Lys Thr Ser Leu Asp Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Val Asn Ile Asp Val Thr Tyr Gly Asn Gly Lys Tyr Tyr Leu Lys  
 20 25 30  
 Asp Ser Asn Lys Asn Ile Tyr Leu Tyr Asp Leu Lys Asn Gln Val Asp  
 35 40 45  
 Glu Tyr Asp Leu Tyr Asn Tyr Leu Ser Arg Pro Asn Tyr Lys Gln Ile  
 50 55 60  
 Leu Met Ser Lys Ser Glu Leu Ile Ser Asn Tyr Asn Asn Asn Phe Ile  
 65 70 75 80  
 Ala Asn Asn Gln Val Asn Ser Val Asp Ala Tyr Val Asn Thr Asn Lys  
 85 90 95  
 Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Asn Lys Leu Asn Arg Asn Ser Ile Asp Asn  
 100 105 110  
 Lys Gly Met Asn Ile Asn Gly Phe Val His Val Gly Arg Asn Tyr Gly  
 115 120 125  
 Asn Ala Phe Trp Tyr Gly Pro Tyr Asp Gly Met Phe Phe Gly Asp Gly  
 130 135 140  
 Asp Gly Ile Tyr Phe Ser Ser Leu Ala Lys Ser Leu Asp Val Val Gly  
 145 150 155 160  
 His Glu Leu Ser His Gly Val Thr Asn Lys Glu Ser Asn Leu Lys Tyr  
 165 170 175  
 Glu Asn Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ser Phe Ser Asp Ile Met Gly  
 180 185 190

ES 2 708 661 T3

Val Ala Val Glu Gly Lys Asn Phe Val Leu Gly Glu Asp Cys Trp Val  
195 200 205

Ala Gly Gly Val Met Arg Asp Met Glu Asn Pro Ser Arg Gly Gly Gln  
210 215 220

Pro Ala His Met Lys Asp Tyr Lys Tyr Lys Thr Met Asn Asp Asp Asn  
225 230 235 240

Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile Ile Asn His Ala Ala Tyr Leu  
245 250 255

Val Ala Asp Gly Ile Glu Lys Thr Gly Ala Lys Asn Ser Lys Asp Ile  
260 265 270

Met Gly Lys Ile Phe Tyr Thr Ala Asn Cys Tyr Lys Trp Asp Glu Thr  
275 280 285

Thr Asn Phe Ala Lys Cys Arg Asn Asp Val Val Gln Val Thr Lys Glu  
290 295 300

Leu Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Tyr Val Lys Ile Val Glu Lys Ala Phe  
305 310 315 320

Asp Gln Val Gly Ile Thr Ala Thr Pro Gln Leu Pro Leu  
325 330

<210> 2

<211> 581

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

5

<400> 2

Met Lys Ser Lys Lys Leu Leu Ala Thr Val Leu Ser Ala Val Ile Thr  
1 5 10 15

Phe Ser Thr Val Ser Ala Val Tyr Ala Ala Pro Val Gly Lys Glu Ser  
20 25 30

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

Asn Thr Lys Lys Ala Ala Thr Asp Ile Thr Glu Lys Lys Phe Asn Asn  
50 55 60

Ser Glu Glu Ile Thr Lys Phe Phe Glu Lys Asn Ile Ser Lys Phe Gly  
65 70 75 80

Val Gln Lys Gly Ser Leu Lys Asn Thr Lys Thr Val Lys Asp Glu Lys  
85 90 95

Gly Lys Thr Asn Tyr His Met Ile Tyr Glu Val Glu Gly Ile Pro Val

ES 2 708 661 T3

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



ES 2 708 661 T3

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  
 195 200 205  
 Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu  
 210 215 220  
 Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn  
 225 230 235 240  
 Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu  
 245 250 255  
 Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys  
 260 265 270  
 Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn  
 275 280 285  
 Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val  
 290 295 300

ES 2 708 661 T3

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

ES 2 708 661 T3

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

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

ES 2 708 661 T3

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

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

ES 2 708 661 T3

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

Arg Pro 1295 Leu

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

5 <213> Clostridium Botulinum

<220>

<221> Bucle BONT/A1

<222> (1)..(25)

<400> 4

10 Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly  
 1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys  
 20 25

<210> 5

<211> 25

15 <212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220>

<221> Bucle BONT/A2/A6

<222> (1)..(25)

ES 2 708 661 T3

<400> 5  
Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly  
1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys  
20 25

5 <210> 6  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Clostridium Botulinum

<220>  
<221> Bucle BoNT/A3  
<222> (1)..(25)

10 <400> 6  
Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly  
1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys  
20 25

15 <210> 7  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Clostridium Botulinum

<220>  
<221> Bucle BONT/A3  
<222> (1)..(25)

<400> 7  
Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly  
1 5 10 15

20 Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Tyr Leu Cys  
20 25

<210> 8  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Clostridium Botulinum

25 <220>  
<221> Bucle BONT/A4  
<222> (1)..(25)

<400> 8  
Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly  
1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Glu Leu Cys  
20 25

30 <210> 9  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Clostridium Botulinum

35 <220>  
<221> Bucle BONT/A5  
<222> (1)..(25)

ES 2 708 661 T3

<400> 9

Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly  
1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys  
20 25

<210> 10

<211> 25

5 <212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220>

<221> Bucle BONT/A7

<222> (1)..(25)

10 <400> 10

Trp Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Pro Lys Ser Leu Asp Glu Gly  
1 5 10 15

Ser Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys  
20 25

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Clostridium Botulinum

<220>

<221> Bucle BoNT/B1/B4bv/B6

<222> (1)..(10)

<400> 11

20 Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys  
1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

25 <220>

<221> Bucle BoNT/B2/B3

<222> (1)..(10)

<400> 12

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

30 <210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220>

35 <221> Bucle BoNT/B5np

<222> (1)..(10)

<400> 13

Cys Lys Ser Val Lys Val Pro Gly Ile Cys  
1 5 10

40 <210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

ES 2 708 661 T3

<220>  
 <221> Bucle BONT/C/CD  
 <222> (1)..(17)  
  
 <400> 14  
 Cys His Lys Ala Ile Asp Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Lys Thr Leu Asp  
 1 5 10 15  
  
 5 Cys  
 <210> 15  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium Botulinum  
  
 10 <220>  
 <221> Bucle BONT/D  
 <222> (1)..(14)  
  
 <400> 15  
 Cys Leu Arg Leu Thr Lys Asn Ser Arg Asp Asp Ser Thr Cys  
 1 5 10  
  
 15 <210> 16  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium Botulinum  
  
 20 <220>  
 <221> Bucle BONT/DC  
 <222> (1)..(14)  
  
 <400> 16  
 Cys Leu Arg Leu Thr Arg Asn Ser Arg Asp Asp Ser Thr Cys  
 1 5 10  
  
 25 <210> 17  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium Botulinum  
  
 30 <220>  
 <221> Bucle BONT/E1-E5  
 <222> (1)..(15)  
  
 <400> 17  
 Cys Lys Asn Ile Val Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys  
 1 5 10 15  
  
 35 <210> 18  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium Botulinum  
  
 <220>  
 <221> Bucle BONT/E6  
 <222> (1)..(15)  
  
 40 <400> 18  
 Cys Lys Asn Ile Val Phe Ser Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys  
 1 5 10 15  
  
 <210> 19  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 45 <213> Clostridium Botulinum

ES 2 708 661 T3

<220>  
 <221> Bucle BONT/F1/F6  
 <222> (1)..(17)

<400> 19  
 5 Cys Lys Ser Val Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Ala Pro Pro Arg Leu  
 1 5 10 15

Cys

<210> 20  
 <211> 17  
 10 <212> PRT  
 <213> Clostridium Botulinum

<220>  
 <221> Bucle BoNT/F2/F3  
 <222> (1)..(17)

15 <400> 20  
 Cys Lys Ser Ile Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Gln Ser Pro Ser Leu  
 1 5 10 15

Cys

<210> 21  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 20 <213> Clostridium Botulinum

<220>  
 <221> Bucle BONT/F4  
 <222> (1)..(17)

<400> 21  
 Cys Lys Ser Ile Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Ala Pro Pro Arg Leu  
 1 5 10 15

25 Cys

<210> 22  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium Botulinum

30 <220>  
 <221> Bucle BONT/F5  
 <222> (1)..(15)

<400> 22  
 Cys Leu Asn Ser Ser Phe Lys Lys Asn Thr Lys Lys Pro Leu Cys  
 1 5 10 15

35 <210> 23  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium Botulinum

<220>  
 40 <221> Bucle BoNT/F7  
 <222> (1)..(15)

<400> 23  
 Cys Lys Ser Ile Val Ser Lys Lys Gly Thr Lys Asn Ser Leu Cys  
 1 5 10 15

ES 2 708 661 T3

<210> 24  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium Botulinum

5 <220>  
 <221> Bucle BONT/G  
 <222> (1)..(15)

<400> 24  
 Cys Lys Pro Val Met Tyr Lys Asn Thr Gly Lys Ser Glu Gln Cys  
 1 5 10 15

10 <210> 25  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium Tetani

<220>  
 15 <221> Bucle TeNT  
 <222> (1)..(29)

<400> 25  
 Cys Lys Lys Ile Ile Pro Pro Thr Asn Ile Arg Glu Asn Leu Tyr Asn  
 1 5 10 15

Arg Thr Ala Ser Leu Thr Asp Leu Gly Gly Glu Leu Cys  
 20 25

20 <210> 26  
 <211> 1005  
 <212> ADN  
 <213> C. Botulinum

<400> 26  
 atggttcaag gtcaaagcgt taaaggagta ggaaaaacta gcttggatgg actagtaaat 60  
 attgatgtaa cttatggaaa tggaaaatac tatttaaaag atagcaacaa aatattttat 120  
 ctatatgact taaaaaatca agttgatgaa tatgatctat acaattatct tagtagacct 180  
 aactataaac aatattaat gagcaaatct gaattaatat ctaattacaa taataatfff 240  
 atagccaaca atcagggttaa ttctgtagat gcttatgtaa acacaaataa aacctatgat 300  
 tattataaaa acaaatataa tagaaacagt attgataata agggtatgaa tattaatggg 360  
 tttgttcatg taggtagaaa ttatggtaat gctttttggt acggtccata tgatgggatg 420  
 ttctttggcg atggcgacgg aatatacttc tcttccttg caaaatcttt agatgttgta 480  
 25 ggccacgaat taagtcatgg tgtaacaaat aaagagtcta atcttaata tgaaaatgaa 540  
 tctggtgcc taaatgaatc tttctcagat attatgggag tagctgttga gggtaaaaac 600  
 tttgtactag gtgaagattg ctgggttgct ggaggagtaa tgagagatat ggaaaatcca 660  
 tccagaggag gccaaccagc tcatatgaaa gattataaat acaaaactat gaatgacgat 720  
 aacggtggtg ttcatacaaa ttcaggtata ataaaccatg ctgctatfff agttgcagat 780  
 ggaatagaaa aaactggtgc aaaaaatagt aaagatatta tgggaaaaat attctataca 840  
 gctaattgct ataaatggga tgaacaaca aatfffctta agtgcagaaa tgatgtagtc 900  
 caagttacta aagaacttta tggcgaaaat agcaactatg taaaaattgt tgaaaaagct 960  
 tttgaccaag ttggaataac tgctacacct caattacat tataa 1005

<210> 27  
 <211> 1746

ES 2 708 661 T3

<212> ADN  
 <213> Clostridium Botulinum

<400> 27  
 atgaaaagta aaaaattatt agctacagtg ctaagtgccg tgatcacttt ttctactgtt 60  
 tctgcagttt atgctgcgcc tntaggaaaa gaaagtaaag ttgaaccaa aactacaaca 120  
 ataacttggg aaaaaaatga acaaaatact aaaaaagctg ctactgatat aactgaaaag 180  
 aaatttaaca attctgagga gataactaaa ttctttgaaa aaaatatac taaatttggt 240  
 gtacaaaaag gttctcttaa aaacaccaag actgtaaaag acgaaaaagg taaaactaac 300  
 tatcatatga tttatgaagt agaaggata cctgtatact atggaagaat tgtttttaca 360  
 actgaaaag actcctccat ggattctata aacggtagaa ttgatactgt ttttgaaaat 420  
 ggaattgga aaaacaaaat caaactatca aaagaagatg ctatagcaaa agctaaaaat 480  
 gatattaag atgaaaagc aactagtaaa aagaccgatt tatatctgta taattttgag 540  
 ggcaaacctt atgtagttta tttagtagat ctaattacag acaacgggag ttggacgggt 600  
 ttcgttaatg ctgaggatgg ttctatagta aataaattta ataatactcc tactttaatt 660  
 gatactaaag atcaaaaatt acccaatgct aaaaaatta aagatgaagc taaaaaagct 720  
 agtaatgcaa ataatgtaat tgatgttcaa ggtcaaagcg ttaaaggagt aggaaaaact 780  
 agcttgatg gactagtaaa tattgatgta acttatggaa atggaaaata ctatttaaaa 840  
 gatagcaaca aaaatattta tctatatgac ttaaaaaatc aagttgatga atatgatcta 900  
 tacaattatc ttagtagacc taactataaa caaatattaa tgagcaaatc tgaattaata 960  
 tctaattaca ataataatth tatagccaac aatcaggtta attctgtaga tgcttatgta 1020  
 aacacaaata aaacctatga ttattataaa aacaaattaa atagaaacag tattgataat 1080  
 aagggtatga atattaatgg gtttgttcat gtaggtagaa attatggtaa tgctttttgg 1140  
 tacggccat atgatgggat gttctttggc gatggcgacg gaatatactt ctcttcctt 1200  
 gcaaatctt tagatgttg aggccacgaa ttaagtcag gtgtaacaaa taaagagtct 1260  
 aatcttaaat atgaaaatga atctggtgcc ctaaatgaat ctttctcaga tattatggga 1320  
 5 gtagctgttg agggtaaaaa ctttgtacta ggtgaagatt gctgggttgc tggaggagta 1380  
 atgagagata tggaaaatcc atccagagga ggccaaccag ctcatatgaa agattataaa 1440  
 tacaanaacta tgaatgacga taacgggtgg gttcatacaa attcaggat aataaacat 1500  
 gctgcttatt tagttgcaga tggaatagaa aaaactggtg caaaaaatag taaagatatt 1560  
 atgggaaaaa tattctatac agctaattgc tataaatggg atgaaacaac aaattttgct 1620  
 aagtgacgaa atgatgtagt ccaagttact aaagaacttt atggcgaaaa tagcaactat 1680  
 gtaaaaattg ttgaaaagc ttttgaccaa gttggaataa ctgctacacc tcaattacca 1740  
 ttataa 1746

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un polipéptido proteolíticamente activo que consiste en una secuencia polipeptídica que presenta al menos 60% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1, en el que dicho polipéptido proteolíticamente activo es capaz de hidrolizar la neurotoxina botulínica o del tétanos para producir una neurotoxina botulínica bicatenaria o una toxina del tétanos bicatenaria.
- 2.- El polipéptido proteolíticamente activo según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido proteolíticamente activo consiste en SEQ ID NO:1.
- 3.- Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido proteolíticamente activo de cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 10 4.- Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 3 que comprende además elementos reguladores.
- 5.- Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 3 o 4.
- 6.- Una célula que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 3 o 4, o el vector según la reivindicación 5.
- 15 7.- Un método para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente activo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende las etapas de:
- (a.) sintetizar de modo químico o traducir a partir de una secuencia de nucleótidos un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2; y
- (b.) purificar el polipéptido de la etapa (a.).
- 20 8.- El uso de un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido proteolíticamente activo de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para una cromatografía de afinidad, para la inmunoprecipitación, para la inmunolocalización o para controlar la presencia del polipéptido proteolíticamente activo de cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 9.- Un método para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente procesado que comprende la etapa de poner en contacto:
- 25 (a) un primer polipéptido, comprendiendo dicho primer polipéptido el polipéptido proteolíticamente activo de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, con
- (b) un segundo polipéptido, siendo dicho segundo polipéptido susceptible a la proteólisis por dicho primer polipéptido;
- en el que dicho contacto provoca el procesamiento proteolítico de dicho segundo polipéptido para producir al menos dos productos de la ruptura.
- 30 10.- El método según la reivindicación 9, en el que el segundo polipéptido presenta al menos 50% de identidad de secuencia con una secuencia polipeptídica seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO:3 a 25, y en el que el segundo polipéptido es roto en una posición C-terminal con respecto a un resto aminoácido básico dentro de dicha secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:3 a 25.
- 35 11.- Un método para seleccionar un inhibidor del polipéptido proteolíticamente activo de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende la etapa de:
- (a) poner en contacto el polipéptido proteolíticamente activo de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 con un sustrato conocido y, opcionalmente, con un inhibidor putativo; y
- (b) determinar el efecto del inhibidor putativo sobre la conversión del sustrato en el producto roto,
- en el que una reducción en la cantidad de producto roto es indicativa del efecto inhibitorio del inhibidor putativo.
- 40 12.- El método según la reivindicación 11, en el que el inhibidor es un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido proteolíticamente activo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 13.- El uso del polipéptido proteolíticamente activo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en la producción de neurotoxinas terapéuticas.
- 45 14.- Una composición que comprende un polipéptido proteolíticamente activo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y un vehículo farmacéutico.

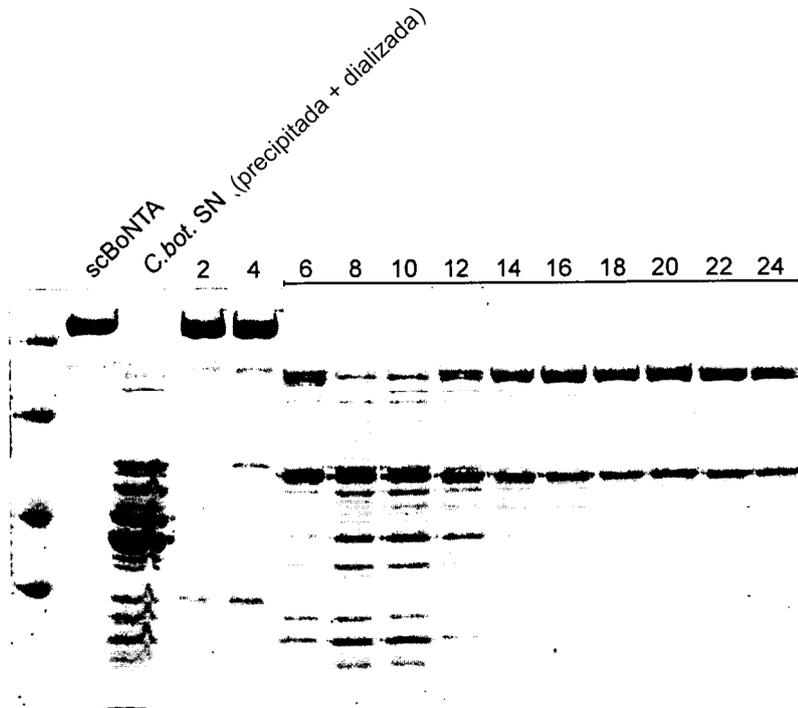


Figura 1

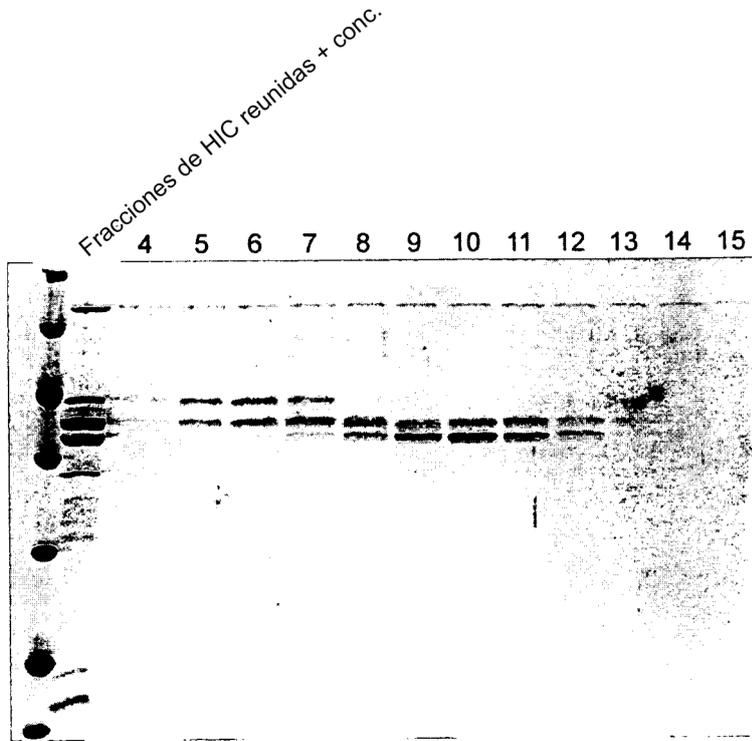


Figura 2

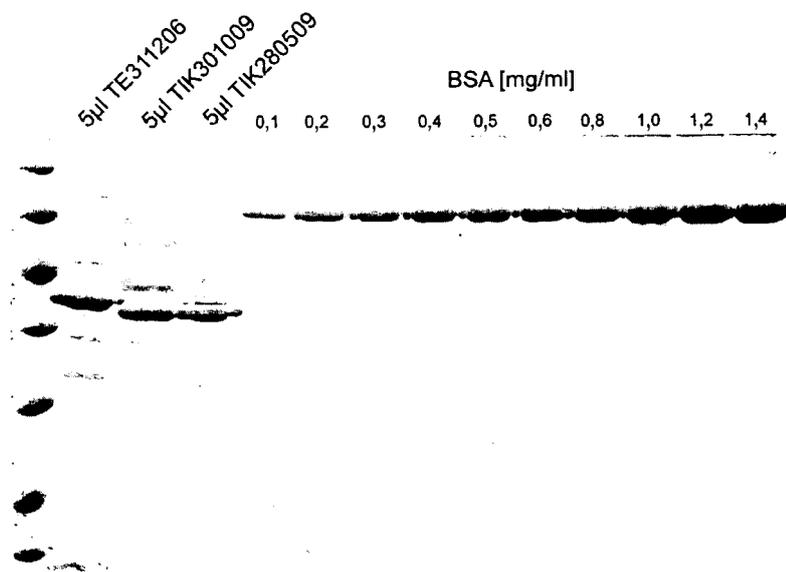


Figura 3

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
MKSKLLATV	LSAVITFSAV	SAVSAAPVKG	ESKSDPKTTT	ISWDKSEONA	KRATTDIKOK	KFDNAQEITK	FFEKNISKFG	VKKGTLNSTK	TLKDDKGTKH	YHTIYVEVEGI
120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
PVYYGRIVFT	TEKDSMDSI	NGRVDIVFEN	GNWKNKIKLS	KEDAIAKAKA	DIKNEKSKE	KAELIYNYE	GKPYVYLYN	SITNSGNWDI	FVNAEDGSIV	NKFNNTPTLL
230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
DTKAELPNA	KRIKDEAEKN	EAKKANMNN	IIDVQGSVK	GLGRITSDGL	VNINLTYDNG	RYLLKDNNEK	IYLYDLKNQV	DLDDLDNDFD	SPKGGHNEEL	MRSELVSNS
340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
MNMFVDDNQV	NSVDAYANNA	KSYDYENKL	SRUSLDNKGH	NIKGFVHFDK	NLGNAFWVGE	YDSNFFGDGD	GVRLSPLAKA	LDVVUGHELSH	GVTNKQSDLK	YEKESGALNE
450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
SFSDINGTAL	EKGKFEIGED	CWIPSDRYGE	IMRDMKPSR	GNQPAHKDF	EDLPVDEDHD	WGVHTNSGI	INHAAYLIAD	GFEKHGEKDS	KDIHAKIFYI	ANCYYWQDQIT
560	570	580	590	600						
DFSKCRNDVV	KVAKDLYGDN	SKEVQIVKNA	FDQVGITATP	QLPL						

Figura 4

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
MKSKLLATV	LSAVITFTV	SAYAAPVVK	ESKVEPFTTT	ITUERNEQNT	KKAATDITEK	KFMNSEIITK	FFEKNISKFG	VOKGSLKNTK	TVKDEKGTKN	YHMIYEVEGI
120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
PVYYGRIVFT	TEKSSHDSI	NGRIDTVFEN	GNWKNKIKLS	KEDAIKAKN	DIKDEKATSK	KTDLYLYNFE	GRPYVYLVLD	LITDNGSWTV	FVNAEDGSIV	NKFNNTPTLI
230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
DTKDKLPNA	KKIKDEAKKA	SNAMNVIDVQ	GOSVKGVGKT	SLDGLWNIDV	TYGNGKYLYK	DSMKNIYLYD	LKNQWDEYDL	YNYLSRPNTYK	QILMSKSELI	SNVNNNFAN
340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
NOVNSVDAYV	NTNKTYDYTK	NKLNRSIDN	KCHNINGFVH	VGRNYGNAFW	YGPYDGMFFG	DGDGIYFSSL	AKSLDVVGHE	LSHGVTNKES	NLKYENESGA	LNESFSDING
450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
VAVEGCFNVL	GEDCQVAGGV	MRDHEMPSRG	QOPAHMKDYK	YKTMNDNDGG	VHINSGIINH	AAYLVADGIE	KTGAKNSKDI	MGKIFYTAMC	YKMBDETTNFA	KCRNDVYQVT
560	570	580	590							
KELYGENSNY	VKIVEKAFDO	VGITATPOLP	L							

Figura 5

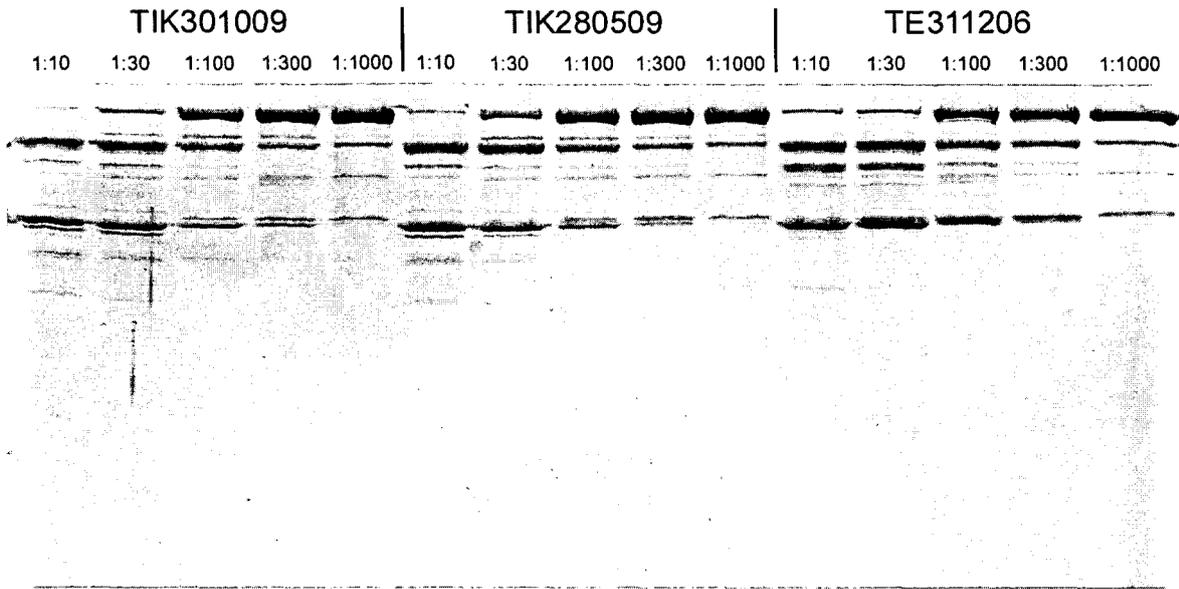


Figura 6A

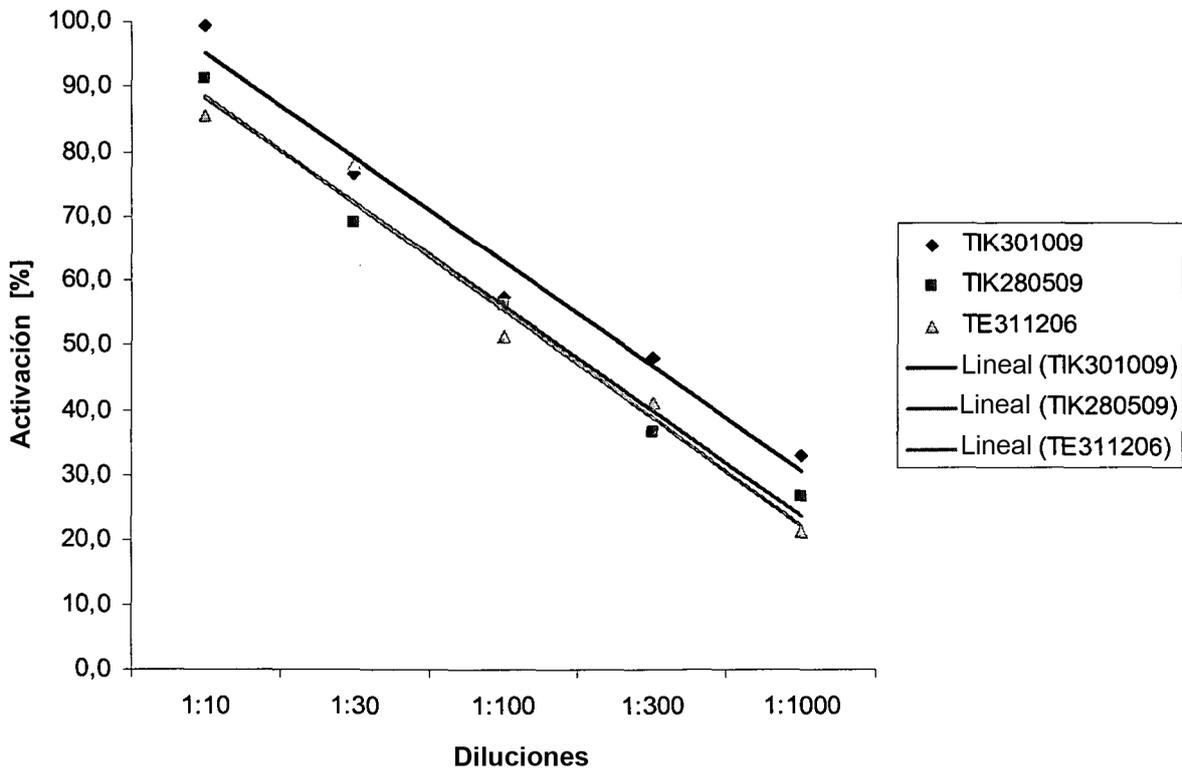


Figura 6B

**A**

scBoNTAS wt	KLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKV
scBoNTAS Throm	KLLCVRGIITS.T.SLVPGRGS.ALNDLCIKV
scBoNTAS Res	KLLCV.GIITS.T.SLVP.GS.ALNDLCIKV
scBoNTAS (GGSG) <sub>2</sub>	KLLCGGSG.....GSGGCIKV
scBoNTAS CGS-C	KLL.G.....S.IKV
scBoNTAS FQWYI	KLLCFQW.....YICIKV

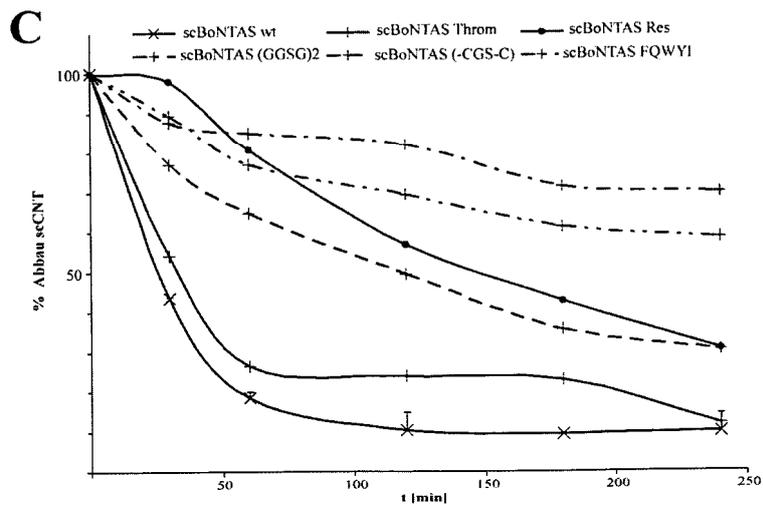
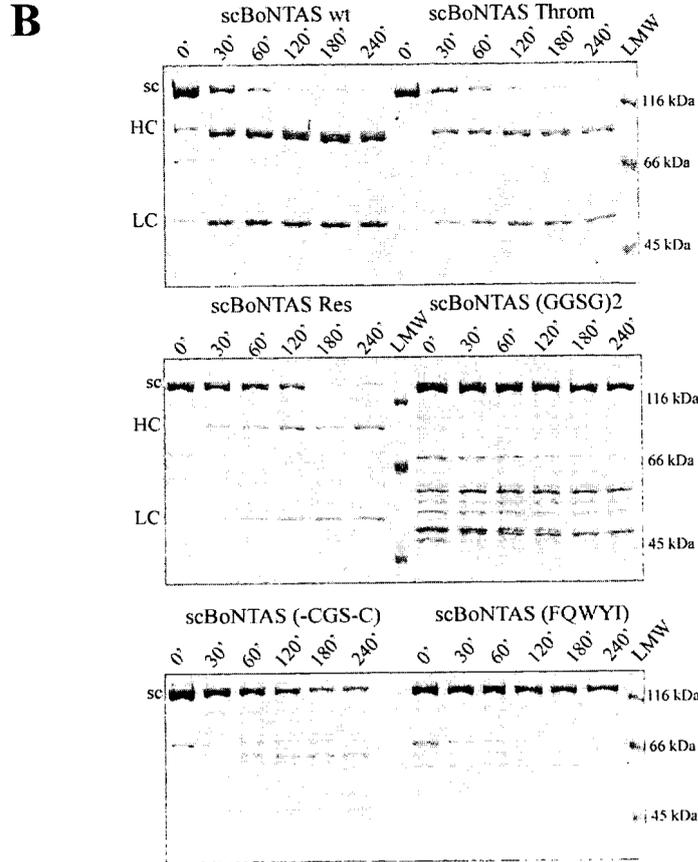


Figura 7

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
MPFVVKQFNY	KDPVNGVDIA	YKIPNAGOM	QPVKAFKIHN	KIUVIPEDT	FTNPEEGDN	PPPEAKQPV	SYVDSTYLS	DNEKDNYLK	VTKLFRIS	TDLGRHLLTS	IURGIPFUGG	STDTLEKVI
140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
DTMCINVTOP	DGSYSEELN	LVIIGSADI	IQFECKFQH	EVLNLTENY	GSTOYIRSP	DFTFGEESL	EVDITNPLGA	GKFATPAVT	LAHELHACH	RLVGIAINFN	RVFKNVTNAY	YEMSGLEVSF
270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
EELRTFGGHD	AKFIDSLQEN	EFRLYYNKF	KDIASLTKA	KSIIVGTTASL	QYKRWVFEK	YLLSDETSCK	FSDVKLKFDK	LYKMLTEIYT	EDNFVFFKV	LNKRTYLNFD	KAVFKINIYP	KVNYTIYDGF
400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
NLRENTLAA	FRGQTEIHN	HNFTKLNFT	GLFEFYKLLC	VRGIITSYTK	SLDKGVNKAL	NDLCIKVNWU	DLFFSSEDN	FTNDLNKGE	ITSDTINIEAA	EENISLDLIQ	QYLYTFNFDN	EPENISIEHL
530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
SSDIIGQLEL	HPNIEFPNG	KKVELDKYTH	FHYLRAQEF	HGKSRIALTN	SYNEALLNPS	RVYTFSSDY	VKKVWKATEA	AMFLGWVEQL	VYDFDTETSE	VSTTDKIADI	TIIPYIGPA	LNIGNMLYKD
660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
DFVGALIFSG	AVILLEFIPE	IAIPVLGTF	LVSZIANKVL	TVQITIDNALS	KRNERDEVY	KYIVTNULAK	VNTQIDLIRK	KHKEALENQA	EATKALINYQ	YNOYTEEERN	NINFNIDDL	SKLNEISINKA
790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
MININKFLNQ	CSVSYLMNSH	IPYGVKRLED	FDASLKDALL	KYIYDNRGTL	IGQVDRKDK	VNNTLSTDIP	FQLSKYVDNQ	RLLSFTTEYI	KNIINTSILN	LRYESNHLLD	LSRYASKINI	GSKWNFDPID
920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
KNQIQLFNLE	SSKIEVILKN	AIVYNSHYEN	FSTSFWRIP	KYFNISISLNN	EYTIINCHE	NSGWRVSLNY	GEIITULQDT	QELKQRVFK	YSQMINISDY	INRUIFVTTI	NNRLNNSKIY	INGRLIDQRP
1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
ISNLGNIRAS	NNIHFELDGC	R0THRYIWIK	YFNLFDKELN	EKEIKDLIDN	QSNISGILKDF	WGDYLOYDQRP	YHMLNLYDPN	KYVDYNNVGI	RGYNYLKGPR	GSVNTTNIYL	NSSLYRGTKF	IIRKYASGNK
1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
DNIYRNDRV	YIMVYVKNKE	YRLATNASQA	GVEKILSALE	IPDVGNLISQV	VWKSNDQCG	ITNKCKENLQ	DNNGNDIGFI	GFHOFNNIAK	LVASNWNVNRQ	IERSSRTLGC	SWEFIPVDDG	WGERPL

Figura 8A

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MPVVKQFNY	KDPVVCVDIA	YIKIPNAGQH	QPVKAFRIHN	KIWIPEBDT	FTNPEGDIN	PPPEAKQVPV	SYDSTYLST	DNEKDNYLKC	VTKLPERIYS
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
IDLGRMLLTS	IVRCIPFVGG	STIDTELKVI	DINCIINVQP	DGSRSEELN	LVIIGPSADI	IQFCKSFCH	EVLNLRMGY	CSTQYRFSF	DFTFCFERSL
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
EYDYNPLGA	GKFAATPAVT	LAHELHACH	RLYGLAIPNP	RVPKVINAY	YEMSGLEVSF	HELRTFGCH	AKPIDSLOEN	EFRLYYNKF	KDIASITLKA
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
KSIIVGTTASL	QYMKRVFRKK	YLLSRDTSGR	FSDVRLKPKDK	LYKHLTEIYT	EDNFVKFKV	LNRKTYLNF	KAFFKINIVP	KVNYTIYDGF	NLRNTNLAAN
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
FNCQNTIRNN	MMFTKLNFT	GLFBEYKLLC	VRCIITSKTK	SIDKGYKAL	MDLCLKVNW	DLPFSPSEDN	FINDLNKCEK	ITSDTNIAA	EKNISLDLIQ
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
QYLLTRFNDN	EPENISIRNL	SSDIICQLEL	HPNIBRPPNG	KRYELDKYTH	FHYLRAQEF	HCKSRIALTN	SUNEALMPS	RVTYFFSSDY	VKKVKNKATRA
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
AHFLGWVQL	VYDFTDEISE	VSTDKIADI	TIIIPYICPA	LNICNHLYKD	DFVCGALIFSG	AVILLEFIPE	IAPVLGTFFA	LVSYIANKVL	TVQIIDNAIS
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
KMKKUDBEY	KYIIVTNLAK	VNTQIDLIEK	KMKKALEMQA	EATKALINYO	YNQYTEEBKN	MINFPHDLS	SKLINESINKA	MININKFLNQ	CSVSYLMMNSH
810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
IIFYGVKLED	FDASLKDALL	KYIYDNRGIL	IGQVDRKDK	VMTLSDIP	FQLSKYVDNQ	RLLSTFTEYI	KMLINTSILM	LYRESHLLID	LSRYASKIMI
910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
GSKVNFDPID	KKQIQLFMLE	SSKIRVILKN	AIWYNSHYEN	FSTSFWRIP	KYFNSISLNN	FYTIINCHEN	NSGURVSLNY	GRITWLODT	QBIKQRVYVK
1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
YSQMINESDY	INRWIFVIT	MNRLMNSKIY	INCLLDQKP	ISNLGNIHAS	MNIHFKLDC	RDTHRYIWK	YFNLFKELN	EKAIKLDYDN	QSNKILKDF
1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
WGDYLOYDKP	YHMLNLYDPN	KYVDYMWVCI	RCYNYLQPR	GSWITNLYL	MSSLYRGTKE	LIKKTASCHK	DNIYVNRDRV	YINWVKNKE	YRLATMASQA
1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
CVEKILLSALE	IPDVCNLSOV	VVNRKNDQOC	ITMKCKNNLQ	DNNNDICFI	CFHQFNNIK	LVASWYNRQ	IBRSSRTLGC	SWRFPVDDG	WCERPL

Figura 8B

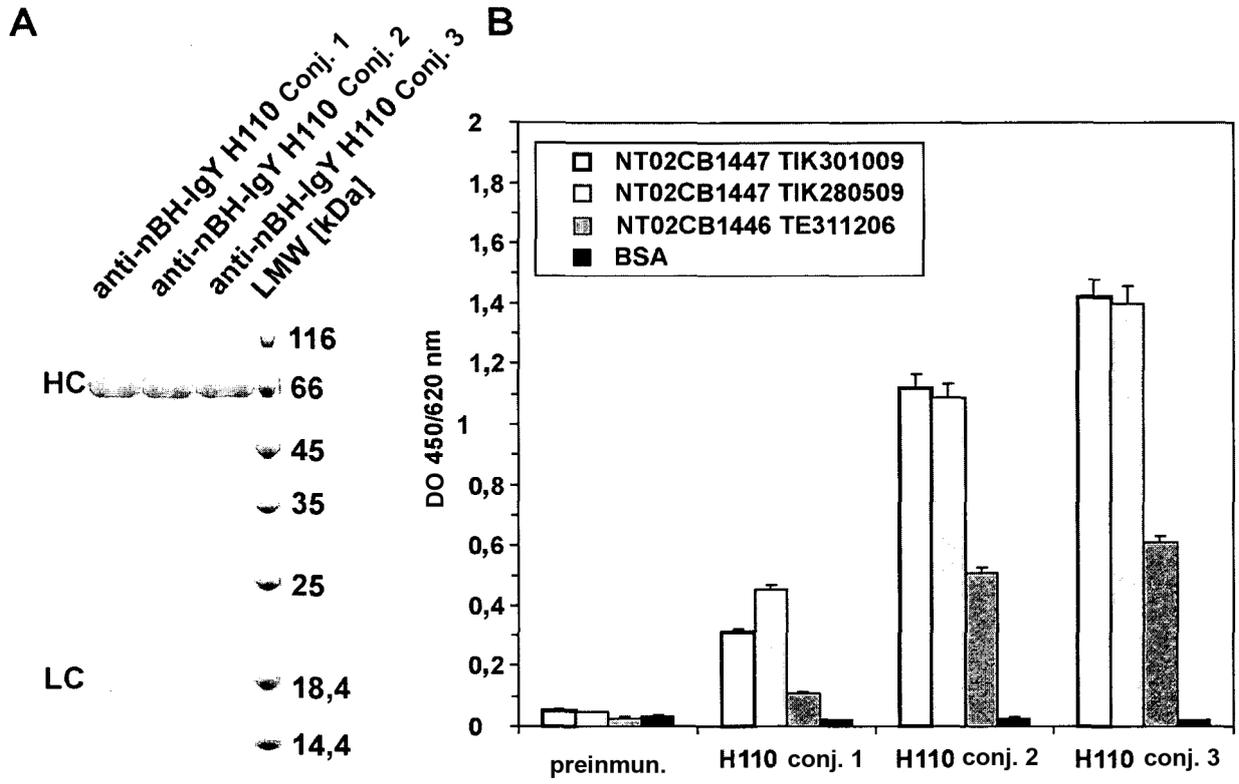


Figura 9

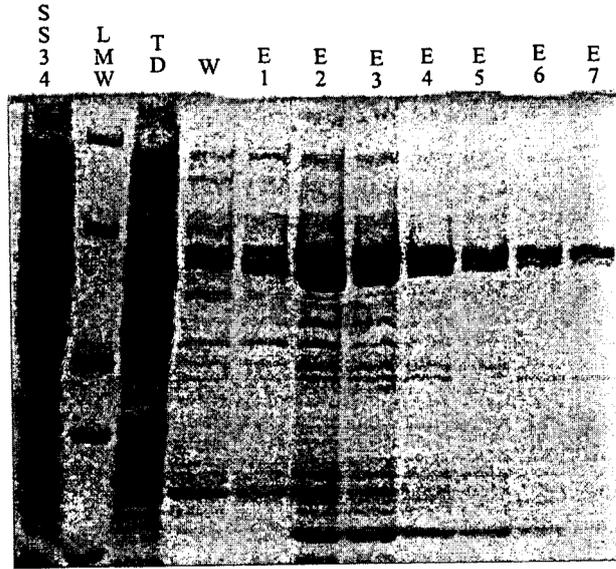


Figura 10A

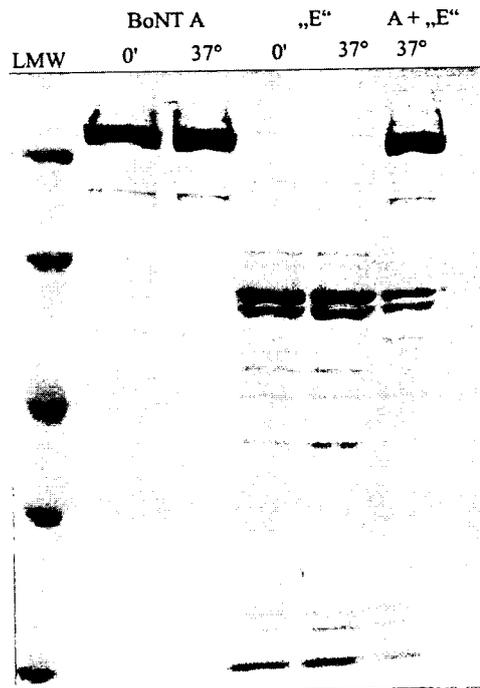


Figura 10B

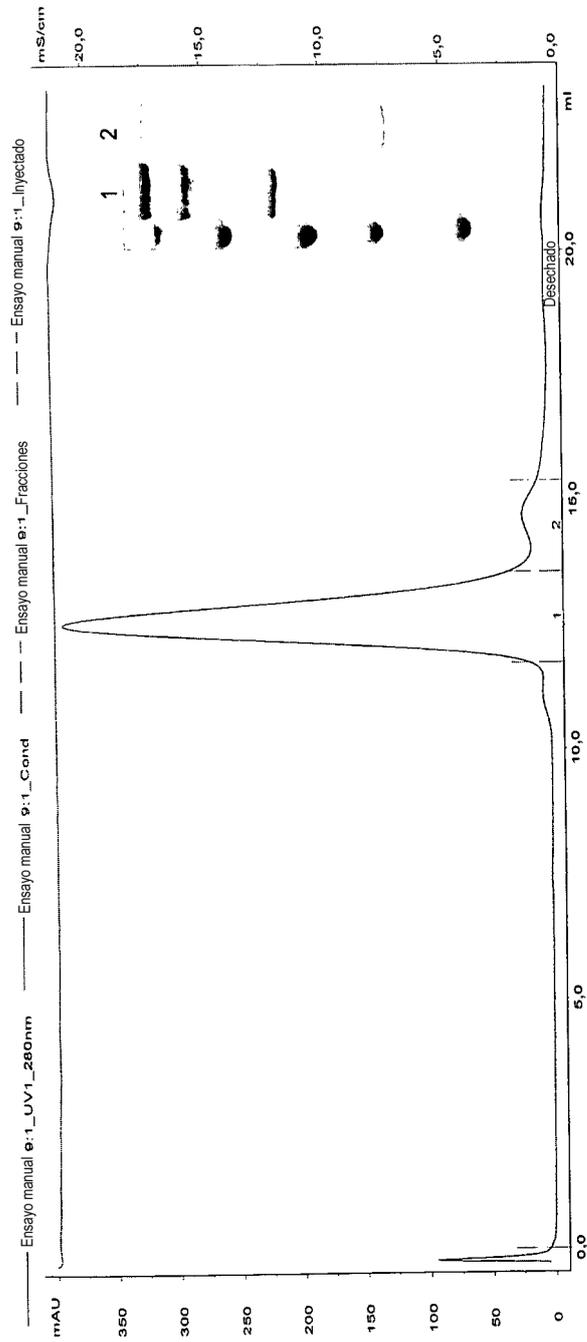


Figura 11A

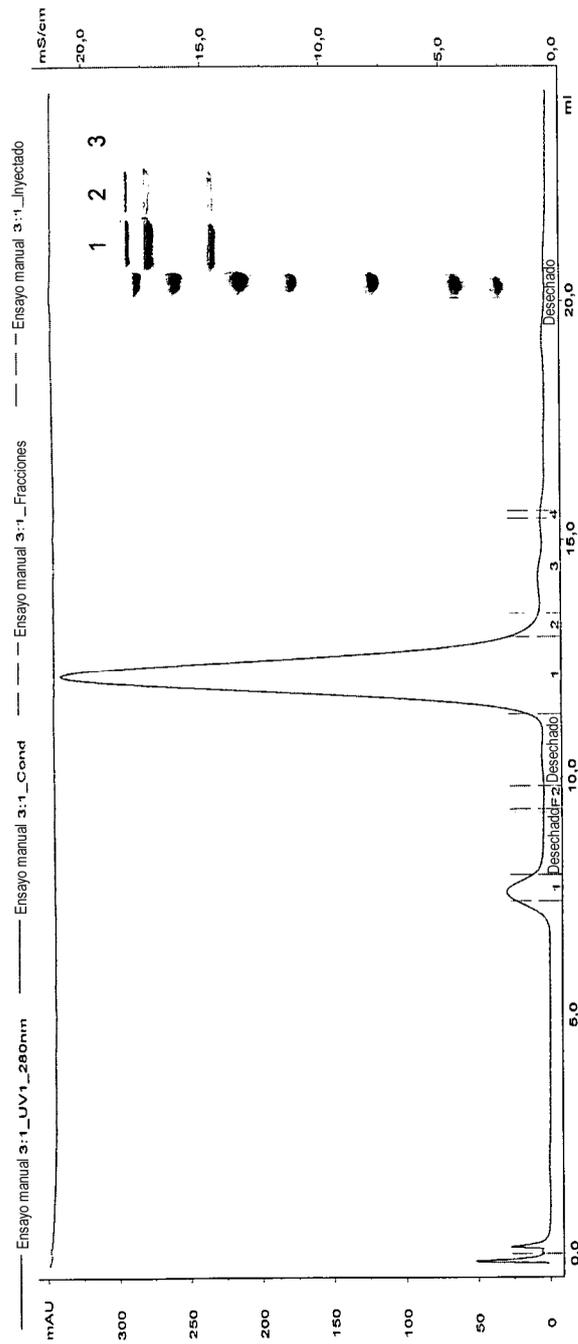


Figura 11B

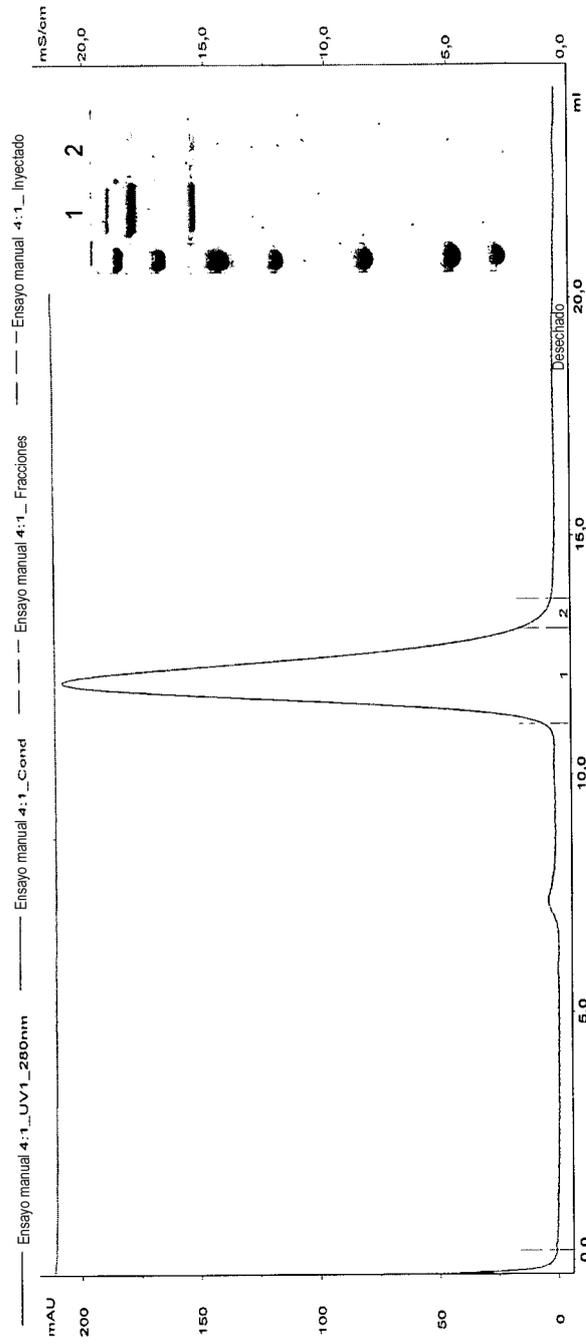


Figura 11C