

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 354**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2008 PCT/US2008/004252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2009 WO09035476**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2008 E 08742464 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 2208067**

54 Título: **Ensayo de transferencia de energía por resonancia con secuencia de escisión y espaciador**

30 Prioridad:

14.09.2007 US 972673 P

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

20.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FISH, ROBERT D. y
DONG, MIN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 717 354 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

Ensayo de transferencia de energía por resonancia con secuencia de escisión y espaciador

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad a la solicitud provisional 60/972673, presentada el 14 de septiembre de 2007 incorporada en la presente descripción como referencia en su totalidad.

Campo de la invención

- 10 El campo de la invención es la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia para ensayos de proteasas relacionados con las toxinas botulínicas y las toxinas tetánicas.

Antecedentes de la invención

- 15 Las neurotoxinas botulínicas (BoNT) son producidas por *Clostridium botulinum* y son las toxinas más potentes conocidas. Estas toxinas son una fuente bien reconocida de intoxicación alimentaria, que resulta frecuentemente en daños graves o incluso la muerte de las víctimas. Existen siete neurotoxinas botulínicas o serotipos estructuralmente relacionados (BoNT/A-G), cada uno de los cuales se compone de una cadena pesada (aproximadamente 100 KD) y una cadena ligera (aproximadamente 50 KD). La cadena pesada media la entrada de la toxina en una célula objetivo a través de endocitosis mediada por receptor. Una vez internalizada, la cadena ligera se transloca desde el lumen de la vesícula endosomal al citosol, y actúa como una proteasa dependiente de zinc para escindir las proteínas que median la fusión de membrana objetivo a vesícula ("proteínas sustrato").

- 25 Las proteínas sustratos de BoNT incluyen la proteína de membrana plasmática sintaxina, la proteína de membrana periférica SNAP-25 y una proteína de membrana vesicular sinaptobrevina (Syb). Estas proteínas se denominan en conjunto proteínas SNARE (receptor de proteína de unión a factor sensible a N-etilmaleimida soluble). La escisión de las proteínas SNARE bloquea la fusión de las vesículas con la membrana plasmática y anula la liberación de neurotransmisores en la unión neuromuscular. Entre las proteínas SNARE, la sintaxina y la SNAP-25 residen normalmente en la membrana objetivo y por lo tanto se denominan como t-SNARE, mientras que la sinaptobrevina se encuentra exclusivamente con las vesículas sinápticas dentro de la sinapsis y se denomina v-SNARE. Juntas, estas tres proteínas forman un complejo que se considera que es la maquinaria mínima necesaria para mediar la fusión entre la membrana de vesícula y la membrana plasmática. Por ejemplo, BoNT/A, E y C.sup.1 escinden SNAP-25 y BoNT/B, D, F, G escinden sinaptobrevina (Syb), en sitios únicos pero diferentes. BoNT/C también escinde sintaxina además de SNAP-25.

- 35 Debido a su amenaza como una fuente de intoxicación alimentaria, y como armas de bioterrorismo, existe una necesidad de detectar sensiblemente y rápidamente las BoNT. Actualmente, el método más sensible para detectar toxinas es realizar un ensayo de toxicidad en ratones. Este método requiere grandes cantidades de ratones, consume tiempo y no puede usarse para estudiar las cinéticas catalíticas de las toxinas. Se han desarrollado además una cantidad de sistemas de inmunoensayos amplificados basados en el uso de anticuerpos contra toxinas, pero la mayoría de estos sistemas requieren un proceso de amplificación complicado y costoso y tampoco pueden usarse para estudiar la actividad catalítica de las toxinas. Aunque pueden usarse la HPLC y un inmunoensayo para detectar moléculas de sustrato escindidas y medir las actividades enzimáticas de estas toxinas, estos métodos en general consumen tiempo y son complicados, algunos de estos requieren de anticuerpos especializados, que los hacen inaplicables para el tamizaje a gran escala. Además, existe una necesidad de métodos y composiciones nuevas y mejoradas para detectar las BoNT.

- 50 En los ensayos de FRET, se usan dos derivados de aminoácido fluorogénicos para reemplazar dos aminoácidos nativos en un péptido sintético muy corto (20-35 aminoácidos) que contiene sitios de escisión por toxinas. La señal de fluorescencia de un derivado de aminoácido se inactiva por el otro derivado de aminoácido cuando estos están cercanos entre sí en el péptido, este mecanismo se llama "transferencia de energía por resonancia de Förster" (FRET). La escisión del péptido separa los dos derivados de aminoácido y puede detectarse una disminución de FRET.

- 55 Los ensayos de FRET se han usado exitosamente para detectar las BoNT. (Ver por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2004/0191887 otorgada a Chapman, presentada el 28 de octubre de 2003, solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2006/0134722 otorgada a Chapman, presentada el 20 de diciembre de 2004, patente de Estados Unidos núm. 7208285 otorgada a Steward (Abril de 2007), y patente de Estados Unidos núm. 7183066 otorgada a Fernandez-Salas (Febrero de 2007), cada una de las cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. Cuando una definición o uso de un término en una referencia incorporada es consistente o contrario a la definición de ese término proporcionada en la presente descripción, se aplica la definición de que ese término proporcionada en la presente descripción y no se aplica la definición de ese término en la referencia). El documento US 2006/0134722 A1 describe un constructo que comprende una porción de fluoróforo donante y un fluoróforo aceptor que se conectan por un péptido enlazador, en donde el péptido enlazador es un sustrato de la neurotoxina botulínica seleccionada del grupo que consiste en sinaptobrevina, sintaxina y SNAP-25, que son todas parte del complejo de proteínas SNARE y pueden ser escindidas por la neurotoxina botulínica. No hay espaciador

entre el péptido enlazador y la porción de fluoróforo donante y no hay espaciador entre el péptido enlazador y el fluoróforo aceptor.

5 Aunque se ha demostrado algún éxito en la aplicación de ensayos de FRET para la detección de las BoNT, la sensibilidad y la especificidad no son suficientes. Se necesitan además aparatos, sistemas y métodos mejorados.

Breve descripción de la invención

10 La presente invención se refiere a un constructo como se define en las reivindicaciones 1 y 5.

En modalidades preferidas las etiquetas donantes yceptoras se colocan para proporcionar un acoplamiento electrónico de manera que la etiqueta donante pueda transferir energía a la etiqueta aceptoras mediante un mecanismo de acoplamiento dipolo-dipolo. En modalidades especialmente preferidas el mecanismo de acoplamiento dipolo-dipolo es la transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET).

15 Las etiquetas donantes y lasceptoras pueden ser ya sea un cromóforo o una porción de fluoróforo, en donde el espectro de emisión de la etiqueta donante se solapa con el espectro de excitación de la etiqueta aceptoras. Preferentemente, el donante es una proteína fluorescente verde o una variante de esta y el aceptor es una variante correspondiente de la proteína fluorescente verde. Una etiqueta donante y aceptoras particularmente preferida (par fluoróforo) para la presente invención es CFP-YFP.

20 De acuerdo con la presente invención, el péptido enlazador es un sustrato de una neurotoxina botulínica seleccionada del grupo que consiste en sinaptobrevina (VAMP), syntaxina y SNAP-25, o un fragmento de esta que puede ser reconocida y escindida por la neurotoxina botulínica ("fragmento escindible"). Estas proteínas se denominan en conjunto proteínas SNARE (receptor de proteína de unión a factor sensible a n-etilmaleimida soluble). El enlazador puede tener una longitud de la estructura primaria de cualquier longitud adecuada, que incluye por ejemplo, mayor que o igual a 5 nm, 8 nm, 10 nm, 12 nm, 14 nm y 20 nm.

25 En modalidades especialmente preferidas, el constructo completo comprende CFP-(SGLRSRA)-SNAP-25-(SNS)-YFP o CFP-(SGLRSRA)-sinaptobrevina-(SNS)-YFP.

30 En una modalidad, el péptido enlazador comprende al menos aproximadamente 14 residuos de aminoácidos y una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secs. con núm. de ident.: 1-6 (analizadas más abajo). En una modalidad preferida, el péptido enlazador comprende al menos aproximadamente 15, o al menos aproximadamente 16, o al menos aproximadamente 17, o al menos aproximadamente 18, o al menos aproximadamente 19, o al menos aproximadamente 20, o al menos aproximadamente 21, o al menos aproximadamente 22, o al menos aproximadamente 23, o al menos aproximadamente 24, o al menos aproximadamente 25, o al menos aproximadamente 26, o al menos aproximadamente 27, o al menos aproximadamente 28, o al menos aproximadamente 29 residuos de aminoácidos y una secuencia se selecciona del grupo que consiste en las secs. con núm. de ident.: 1-6 (analizadas más abajo).

35 En una modalidad preferida, el péptido enlazador comprende al menos aproximadamente 30 residuos de aminoácidos y una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secs. con núm. de ident.: 1-6. Con mayor preferencia, el péptido enlazador comprende al menos aproximadamente 35 residuos de aminoácidos, o al menos aproximadamente 40 residuos de aminoácidos, o al menos aproximadamente 45 residuos de aminoácidos, o al menos aproximadamente 50 residuos de aminoácidos. En una modalidad particularmente preferida, un constructo de la presente invención comprende un péptido enlazador que comprende al menos aproximadamente 55 residuos de aminoácidos o al menos aproximadamente 65 residuos de aminoácidos.

40 La secuencia del sitio de escisión de la presente invención comprende (a) una proteína, motivo, muteína SNARE, y (b) un espaciador con al menos 5 aminoácidos, en donde el espaciador incluye de acuerdo con una modalidad una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (GGGGS)_n y (EAAAK)_n, donde n es 1-3.

45 Debe interpretarse en la presente descripción que las "muteínas" de una proteína tienen al menos 30 % de identidad con una proteína nativa correspondiente, incluidas, por ejemplo, composiciones que tienen al menos 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad con la proteína nativa. Las variaciones de la identidad pueden comprender una o más adiciones, deleciones y sustituciones. Las muteínas contempladas incluyen fragmentos, truncados y proteínas de fusión.

50 El espaciador incluye de acuerdo con una modalidad una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (GGGGS)_n y (EAAAK)_n, donde n es 1-3. Tales configuraciones del espaciador aumentan el acoplamiento electrónico entre la etiqueta donante y la etiqueta aceptoras en relación con un constructo correspondiente sin el espaciador.

55 La presente invención proporciona además una molécula de polinucleótido aislada que codifica un constructo descrito anteriormente. El constructo es preferentemente un vector de expresión que comprende la molécula de polinucleótido unida operativamente a un promotor. Un promotor preferible para la invención es un promotor inducible.

La presente invención proporciona además una célula que comprende una molécula de polinucleótido aislada descrita anteriormente. En una modalidad, la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula neuronal cultivada primaria, célula PC12 o un derivado de esta, una célula de cromafina cultivada primaria, una célula de neuroblastoma, una célula SK-N-SH adrenérgica humana y una línea de células NS-26. Preferentemente, la célula es una célula neuronal cortical, una célula neuronal del hipocampo, una célula neuronal motora de la médula espinal o una célula Neuro 2a colinérgica murina.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un kit que comprende un constructo de la presente invención en un contenedor adecuado.

Además, la presente invención se refiere a un método como se especifica en la reivindicación 6.

Si bien no se desea mantener ninguna teoría o mecanismo de acción particular, se contempla que el espaciador mejora la sensibilidad y especificidad mediante el aumento del acoplamiento electrónico entre el donante y el aceptor, que a su vez es provocado (a) mediante la reducción de la distancia de la estructura terciaria entre el donante y el aceptor, y (b) proporcionando un salto electrónico entre el donante y el aceptor.

El espaciador incluye de acuerdo con una modalidad una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (GGGGS)_n y (EAAAK)_n, donde n es 1-3.

El método para detectar una neurotoxina botulínica de la presente invención comprende (a) proporcionar un constructo descrito anteriormente en la presente, en donde el enlazador es la proteína sustrato o un fragmento escindible de esta que corresponde a la neurotoxina botulínica a detectar, (b) exponer el constructo a una muestra que se sospecha que contiene una neurotoxina botulínica bajo una condición en la cual la neurotoxina botulínica escinde el sustrato proteico o un fragmento de este, y (c) detectar y comparar la señal de FRET antes y después de que el constructo se exponga a la muestra, en donde una disminución de FRET indica la presencia de la neurotoxina botulínica en la muestra. En una modalidad preferida, se añade Zn.sup.2+ adicional a la muestra a detectar. El método de la invención es adecuado para la detección de una neurotoxina botulínica seleccionada del grupo que consiste en BoNT/A, E, y C, y la proteína sustrato correspondiente es SNAP-25 o un fragmento escindible de esta. El método de la presente invención es adecuado además para la detección de BoNT/B, D, F o G, mediante el uso de sinaptobrevina (Syb) o un fragmento escindible de esta como una proteína sustrato correspondiente. De manera similar, el método de la presente invención es adecuado para detectar BoNT/C, con SNAP-25 o un fragmento escindible de esta como una proteína sustrato correspondiente.

En una modalidad preferida, para el método de la presente invención, FRET se detecta mediante un método seleccionado del grupo que consiste en 1) medir la fluorescencia emitida a la longitud de emisión del aceptor (A) y la longitud de emisión del donante (D), y determinar la transferencia de energía mediante la relación de las amplitudes de emisión respectivas; 2) medir la duración de la fluorescencia de D; 3) medir la tasa de fotoblanqueamiento de D; 4) medir la anisotropía de D o A; y 5) medir la fluorescencia de monómero/excímero de desplazamiento de Stokes.

El constructo de la presente invención puede usarse para un método de tamizaje de un inhibidor de una neurotoxina botulínica, que comprende proporcionar una célula genéticamente modificada para expresar un constructo como se describió anteriormente, en donde el enlazador en el constructo es un péptido sustrato que corresponde a la toxina botulínica; exponer dicha célula a la neurotoxina botulínica en la presencia de un compuesto inhibidor candidato; y detectar las señales de FRET de la célula antes y después de dicha exposición a la toxina botulínica, en donde una observación de una disminución no sustancial de FRET, en comparación con una célula expuesta a la neurotoxina botulínica en la ausencia del inhibidor candidato, indica que el inhibidor candidato es capaz de inhibir la neurotoxina botulínica. Preferentemente, el compuesto candidato está entre una biblioteca de compuestos y el método es un método de alto rendimiento.

Además, el constructo de la presente invención puede usarse en un método para detectar una neurotoxina botulínica, el método que comprende, a) proporcionar un constructo descrito en la presente descripción, en donde el enlazador es una proteína sustrato o un fragmento escindible de esta que corresponde a la neurotoxina botulínica a detectar, y en donde el constructo se ancla a una membrana plasmática de una célula, de manera que la proteína enlazadora adopta una conformación con la cual se produce FRET entre el fluoróforo donante y aceptor, b) exponer el constructo a una muestra que se sospecha que contiene la neurotoxina botulínica bajo una condición en la cual la neurotoxina botulínica escinde el sustrato proteico o un fragmento de este, y c) detectar y comparar la señal de FRET antes y después de que el constructo se exponga a la muestra, en donde una disminución de FRET indica la presencia de la neurotoxina botulínica en la muestra.

Preferentemente, el constructo de la presente invención se ancla a una vesícula, que puede o no estar en una célula.

Diversos objetos, características, aspectos y ventajas de la materia de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de modalidades preferidas, junto con los dibujos adjuntos en los cuales los mismos números representan los mismos componentes.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de los biosensores basados en CFP-YFP para monitorear la actividad proteasa de neurotoxinas botulínicas. La Figura 1A es un diseño de los constructos biosensores. CFP y YFP se conectan a través de un fragmento de sinaptobrevina (aminoácidos 33-94, panel superior), o de SNAP-25 (aminoácidos 141-206, panel inferior), respectivamente. Se indican los sitios de escisión para cada neurotoxina botulínica en estos fragmentos. La Figura 1B muestra la función de CFP y YFP como un par donante-aceptor para FRET, en el cual la excitación de CFP da como resultado la emisión de fluorescencia de YFP (panel superior). La transferencia de energía entre CFP y YFP enlazadas se anula después de la escisión del fragmento de sinaptobrevina o SNAP-25 con neurotoxinas botulínicas (panel inferior). La longitud de onda de excitación óptima para CFP es 434 nM y el máximo de emisión es 470 nM para CFP y 527 nM para YFP.

La Figura 2 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas biosensores recombinantes. La Figura 2A muestra los espectros de emisión de las CFP y YFP con etiqueta de his.sub.6 recombinante solas (300 nM), así como también la mezcla de estas dos proteínas (1:1). Las señales de fluorescencia se recolectaron de 450 a 550 nM mediante el uso de un fluorómetro PTIQM-1 en tampón Hepes (Hepes 50 mM, DTT 2 mM y ZnCl.sub.2 10 .mu.M, pH 7,1). La longitud de onda de excitación es 434 nM, la óptima para CFP. La proteína YFP solo provoca una pequeña señal de emisión de fluorescencia mediante la excitación directa a 434 nM. La Figura 2B muestra el espectro de emisión de CFP-SybII-YFP con etiqueta de his.sub.6 recombinante, recolectado como se describió en el panel de la Figura 2A. La flecha indica el máximo de emisión de YFP que resulta de FRET.

La Figura 3 representa que la escisión de las proteínas biosensores por la neurotoxina botulínica puede monitorearse mediante el barrido de espectros de emisión en tiempo real in vitro. A): las BoNT/B se redujeron anteriormente con DTT 2 mM, ZnCl.sub.2 10 .mu.M durante 30 min a 37 grados C. Se añadió la toxina 50 nM en una cubeta que contenía la proteína CFP-SybII-YFP 300 nM en el tampón Hepes (Hepes 50 mM, DTT 2 mM, ZnCl.sub.2 10 .mu.M). Los espectros de emisión se registraron como se describió en la Figura 2A en el tiempo indicado antes y después de añadir la toxina (panel superior). Se tomaron muestras de 30 .mu.l de la cubeta después de cada barrido de emisión y se mezclaron con tampón de carga para SDS. Estas muestras se sometieron a SDS-page y a quimioluminiscencia mejorada (ECL). La escisión de la proteína de fusión CFP-SybII-YFP se detectó mediante el uso de un anticuerpo anti-his.sub.6 que reconoce la etiqueta de his.sub.6 en el extremo N-terminal de la proteína de fusión (panel inferior). La escisión de la proteína de fusión CFP-SybII-YFP dio como resultado la disminución de la fluorescencia de YFP y el aumento de la fluorescencia de CFP. Este cambio se registró en tiempo real mediante el barrido de espectros de emisión. B): se usó CFP-SybII-YFP para analizar la actividad de BoNT/F, como se describió en el panel A. C): se usó CFP-SNAP-25-YFP para analizar la actividad de BoNT/A (se usó toxina 10 nM), como se describió en el panel A. D): se usó CFP-SNAP-25-YFP para analizar la actividad de BoNT/E (se usó toxina 10 nM), como se describió en el panel A.

La Figura 4 muestra el monitoreo de la cinética de proteasa de la neurotoxina botulínica mediante el uso de las proteínas biosensores en un espectrofluorómetro de microplacas. A): El cambio de fluorescencia durante la escisión de las proteínas biosensores por la neurotoxina botulínica podría registrarse en tiempo real mediante el uso de un lector de placas. Se mezcló BoNT/A 10 nM con CFP-SNAP-25-YFP 300 nM, y la muestra se sometió a barrido a 100 .mu.l por pocillo mediante el uso de un lector de placas. La excitación es 434 nm y para cada punto de datos, se recolectaron los valores de emisión a 470 nm (canal de CFP) y a 527 nm (canal de YFP o FRET). La reacción se rastreó durante una hora y media en el intervalo de 30 segundos por punto de datos. La disminución de la fluorescencia de YFP y el aumento de la fluorescencia de CFP se monitorearon en tiempo real. B): La tasa de escisión es dependiente de la concentración de la neurotoxina. Las diversas concentraciones de neurotoxina botulínica A y E se analizaron para su capacidad de escindir la misma cantidad de proteínas biosensores. El cambio de la señal de FRET (relación de FRET) se mide mediante la relación entre la señal de emisión de YFP y la señal de emisión de CFP en el mismo punto de datos. C): la proteína CFP-SNAP-25-YFP sola y la mezcla de las proteínas CFP/YFP (1:1) se sometieron a barrido al mismo tiempo, como el control interno.

La Figura 5 muestra la sensibilidad del ensayo de biosensores mediante el uso de un lector de placas. A): Se mezcló CFP-SNAP-25-YFP 300 nM con diversas concentraciones de BoNT/A o E en una placa de 96 pocillos, el volumen total es 100 .mu.l por pocillo. La placa se incubó a 37 grados C. durante 4 horas y después de sometieron a barrido con un lector de placas (panel superior). La relación de FRET se graficó contra el valor logarítmico de la concentración de toxina. Los valores de EC.sub.50 para cada curva se enumeran en la tabla en el panel inferior. Cada punto de datos representa la media de tres experimentos diferentes. B): se mezcló CFP-SybII-YFP 300 nM con diversas concentraciones de BoNT/B o F. Los datos se recolectaron y graficaron como se describió en el panel A.

La Figura 6 representa el monitoreo de la actividad de neurotoxinas botulínicas en células vivas. A): CFP-SNAP-25-YFP se expresó en células PC12 de tipo silvestre. La entrada y la actividad catalítica de BoNT/A (50 nM) se monitorearon mediante el registro del cambio de la relación de FRET que resulta de la escisión de CFP-SNAP-25-YFP dentro de las células. La relación de FRET se promedió de un total de 53 células tratadas con toxina y 53 células de control. El tratamiento con BoNT/A durante 72 horas reduce la relación de FRET de toda la población de células en un grado significativo ($P < 1.47E-5$). B): Las células PC 12 que expresan syt II se transfectaron con CFP-SybII-YFP y se trataron con BoNT/B (30 nM). La entrada y la actividad catalítica de BoNT/B se monitorearon mediante el registro

del cambio de la relación de FRET como en el panel (A); se analizaron 73 células tratadas con toxina y 73 células de control. El tratamiento con BoNT/B durante 72 horas reduce la relación de FRET de toda la población de células en un grado significativo ($P < 2E-10$).

5 La Figura 7 muestra el monitoreo de la actividad de BoNT/A en células vivas mediante el uso de acuerdo con la presente invención. (a). Medición de la señal de FRET de sensores de toxinas en células vivas. Se usó CFP-SNAP-25(141-206)-YFP para transfectar células PC12. Este sensor parece ser soluble en células. Se tomaron tres imágenes mediante el uso de un conjunto de filtros diferentes (CFP, FRET y YFP) para cada célula de manera secuencial, mediante el uso de exactamente las mismas configuraciones. Las imágenes se codificaron con colores para reflejar la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias como se indica en la tabla de consulta de la izquierda. El valor de FRET corregido se calculó restando la interferencia tanto de CFP como de YFP de las señales recolectadas mediante el uso del conjunto de filtros de FRET, según se detalla en los Métodos. (b). Se usaron las células PC12 transfectadas con CFP-SNAP-25(141-206)-YFP para detectar la actividad de BoNT/A. Se añadió la holotoxina BoNT/A cincuenta nM al medio de cultivo y se analizaron 80 células después de 96 horas. La señal de FRET corregida se normalizó para la señal de fluorescencia de CFP y se graficó como un histograma con los segmentos indicados. Las células de control se transfectaron con el mismo sensor pero no se trataron con toxinas y se analizaron en paralelo. La incubación con BoNT/A desplazó la relación de FRET (FRET corregida/CFP) entre la población celular, lo que indica que las proteínas sensores se escindieron por BoNT/A en las células. Sin embargo, el desplazamiento fue pequeño, lo que indica que la escisión no fue eficiente en las células. (c). Panel izquierdo: se construyó un sensor de toxinas eficiente mediante la unión de CFP y YFP a través de la SNAP-25 de longitud completa (aminoácidos 1-206) y se analizó para detectar la actividad de BoNT/A en las células. Esta proteína de fusión CFP-SNAP-25(FL)-YFP se localizó principalmente en las membranas plasmáticas en las células a través de la palmitoilación en sus cuatro cisteínas (panel izquierdo, recuadros superiores del panel del medio). Panel del medio: Las células PC 12 se transfectaron con el sensor CFP-SNAP-25(FL)-YFP y se usaron para detectar la actividad de BoNT/A. Se añadió la holotoxina BoNT/A cincuenta nM al medio de cultivo y se analizaron las señales de FRET de 200 células después de 48 y 96 horas como se describió en el panel (a). Las células de control se transfectaron con sensores de toxinas pero no se trataron con toxinas y se analizaron en paralelo. Las imágenes de células representativas se mostraron en el panel del medio. Este sensor rindió una FRET significativa (recuadro de "FRET corregida" superior del panel del medio). La señal de FRET se anuló después de que las células se trataron con BoNT/A (96 h, recuadro de "FRET corregida" inferior del panel del medio). Nota: uno de los productos de escisión, el extremo C-terminal de la SNAP-25 etiquetada con YFP, se degradó después de la escisión con toxinas. Por lo tanto, la señal de fluorescencia de YFP disminuyó significativamente en células tratadas con toxinas (recuadro "YFP" inferior). Panel derecho: las relaciones de FRET se grafican como un histograma con los segmentos indicados como se describió en el panel (b). (d). Las células PC12 se transfectaron con CFP-SNAP-25(Cys-Ala)-YFP (SNAP-25 de longitud completa con mutaciones Cys 85,88,90,92 Ala, panel izquierdo). Esta proteína se ha distribuido de manera difusa en todo el citosol y carece de la fuerte señal de FRET observada para CFP-SNAP-25(FL)-YFP (panel derecho, recuadro de "FRET corregida"). (e). Las células PC12 se transfectaron con CFP-SNAP-25(FL)-YFP y CFP-SNAP-25(Cys-Ala)-YFP. Las células se trataron con (+, células intactas) o sin (-, células intactas) BoNT/A (50 nM, 72 h) y se lavaron. La mitad de los extractos celulares de las muestras que no se exponen a BoNT/A se incubaron además con (+, in vitro) o sin (-, in vitro) BoNT/A reducida in vitro (200 nM, 30 min, 37 grados C.), sirvieron como controles para mostrar los productos de escisión (dos productos de escisión se indican mediante flechas). Se cargó la misma cantidad de cada muestra (30 .mu.g de lisado celular) en un gel de SDS-page y se sometió a análisis de inmunotransferencia mediante el uso de un anticuerpo anti-GFP. Mientras que CFP-SNAP-25(FL)-YFP experimentó una escisión significativa en células intactas, no hubo escisión detectable de CFP-SNAP-25(Cys-Ala)-YFP en las células, lo que indica que el anclaje a membrana es importante para la escisión eficiente por BoNT/A en células vivas. Nota: solo se detectó un producto de escisión (CFP-SNAP-25(1-197)) en las células tratadas con toxina, lo que indica que el otro producto de escisión (SNAP-25(198-206)-YFP) se degradó en gran medida en las células.

La Figura 8 muestra que el anclaje del sensor CFP-SNAP-25(141-206)-YFP a la membrana plasmática generó un sensor que se escindió eficientemente por BoNT/A en las células. (a). Una descripción esquemática de la construcción del constructo para dirigir CFP-SNAP-25(141-206)-YFP a la membrana plasmática. Un fragmento de SNAP-25 que contiene los sitios de palmitoilación (residuos 83-120) se fusionó al extremo N-terminal del sensor CFP-SNAP-25(141-206)-YFP y este fragmento dirigió a la proteína de fusión a la membrana plasmática. (b). Las células PC 12 se transfectaron con SNAP-25(83-120)-CFP-SNAP-25(141-206)-YFP. Se añadió la holotoxina BoNT/A cincuenta nM al medio de cultivo y se analizaron las señales de FRET de 80 células después de 96 horas como se describió en la Figura 7a. Las células de control, transfectadas con sensores de toxinas pero no tratadas con toxinas, se analizaron en paralelo. Las imágenes de células representativas se muestran en el panel izquierdo. Este sensor rindió una FRET significativa (recuadro de "FRET corregida" superior del panel izquierdo). La señal de FRET se redujo después de que las células se trataron con BoNT/A (96 h, recuadro de "FRET corregida" inferior del panel izquierdo). Panel derecho: las relaciones de FRET de las células se grafican como un histograma con los segmentos indicados como se describió en la Figura 7b. (c). Las células PC12 se transfectaron con diversos constructos de CFP/YFP y las relaciones de FRET correspondientes se determinaron como se describió en la Figura 7a. La coexpresión de CFP y YFP en las células, no dio como resultado una FRET significativa en las condiciones del ensayo. CFP-SNAP-25(FL)-YFP exhibió niveles significativos de FRET mientras que la CFP-SNAP-25(Cys-Ala)-YFP soluble no.

65 La Figura 9 muestra que la escisión eficiente de Syb por BoNT/B requiere la localización de Syb a las vesículas. (a). CFP-Syb(33-94)-YFP se usó para transfectar una línea de células PC12 que expresa establemente sinaptotagmina II

(Dong y otros Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell Biol.* 162, 1293-1303 (2003)). Este sensor parece ser soluble dentro de las células y genera señales de FRET fuertes (panel superior). Las células PC12 transfectadas con CFP-Syb(33-94)-YFP se usaron para detectar la actividad de BoNT/B. Se añadió la holotoxina BoNT/B cincuenta nM al medio de cultivo y se analizaron 80 células después de 96 horas como se describió en la Figura 7b. Las células de control se transfectaron con el mismo sensor pero no se trataron con toxinas y se analizaron en paralelo. La incubación con BoNT/B desplazó la relación de FRET entre la población celular, lo que indica que las proteínas sensores se escindieron por BoNT/B en las células. Sin embargo, el desplazamiento fue pequeño, lo que indica que la escisión no fue eficiente en las células. (b). Una descripción esquemática del sensor YFP-Syb(FL)-CFP. La Syb de longitud completa contiene 116 aminoácidos, y se localiza en vesículas a través de un dominio transmembrana único. La escisión de Syb por BoNT/B libera el dominio citoplasmático de Syb etiquetado con YFP desde la vesícula. (c). Las células PC12 que expresan establemente sinaptotagmina II se transfectaron con YFP-Syb(FL)-CFP y se trataron con BoNT/B (50 nM, 48 h, recuadros inferiores), o sin toxina (control, recuadros superiores). Las imágenes de fluorescencia de CFP y YFP se recolectaron para cada célula, y se muestran las células representativas. Este sensor se localiza en las vesículas, y se excluyó del núcleo en células vivas, como se evidencia por ambas señales fluorescentes de CFP y YFP (recuadros superiores). El tratamiento con BoNT/B dio como resultado una redistribución de las señales de YFP, la cual se hace soluble en el citosol y entra al núcleo. (d). Una versión truncada de Syb, los residuos 33-116, se usó para enlazar una CFP y YFP. Este constructo contiene la misma región citosólica (residuos 33-94, panel (b)) que los fragmentos de Syb en el sensor CFP-Syb(33-96)-YFP soluble y contiene además el dominio transmembrana de Syb. Las células PC 12 que expresan sinaptotagmina II se transfectaron con CFP-Syb(33-116)-YFP y CFP-Syb(33-94)-YFP. Las células se trataron con (+, células intactas) o sin (-, células intactas) BoNT/B (50 nM, 48 h), y se lavaron. La mitad de los extractos celulares de las muestras que no se expusieron a BoNT/B se incubaron además con (+, in vitro) o sin (-, in vitro) BoNT/B reducida in vitro (200 nM, 30 min, 37 grados C). Dos productos de escisión se indican por asteriscos. Se cargó la misma cantidad de cada muestra (30 .mu.g de lisado celular) en un gel de SDS-page y se sometió a análisis de inmunotransferencia mediante el uso de un anticuerpo anti-GFP. Mientras que CFP-Syb(33-116)-YFP experimentó una escisión significativa en células intactas, no hubo escisión detectable de CFP-Syb(33-94)-YFP, lo que indica que la localización en vesículas es importante para la escisión eficiente por BoNT/B en células vivas.

La Figura 10 es un esquema que representa un constructo de la materia anterior, que tiene un enlazador que incluye una secuencia del sitio de escisión dispuesta entre una etiqueta donante y una etiqueta aceptora.

La Figura 11a es un esquema que representa un constructo que tiene un enlazador que incluye una secuencia del sitio de escisión y un espaciador, el espaciador que está dispuesto entre la secuencia del sitio de escisión y la etiqueta aceptora.

La Figura 11b es un esquema que representa un constructo que tiene un enlazador que incluye una secuencia del sitio de escisión y un espaciador, el espaciador que está dispuesto entre la etiqueta donante y la secuencia del sitio de escisión.

La Figura 11c es un esquema que representa una modalidad del constructo de la presente invención, que tiene un enlazador que incluye una secuencia del sitio de escisión, un primer espaciador y un segundo espaciador, el primer espaciador que está dispuesto entre el donante y la secuencia del sitio de escisión y el segundo espaciador que está dispuesto entre la secuencia del sitio de escisión y el aceptor.

La Figura 12 es un diagrama de bloque que ilustra las etapas de un método de mejorar la sensibilidad de la transferencia de energía entre una etiqueta donante y una etiqueta aceptora.

La Figura 13 es un diagrama de bloque que ilustra las etapas de un método para detectar la neurotoxina botulínica.

Descripción detallada

La presente invención es adecuada para monitorear la actividad de la neurotoxina botulínica en células vivas y neuronas.

La presente invención proporciona un constructo y método de uso del constructo que comprende las proteínas SNAP-25 y Syb de longitud completa junto con espaciadores como los enlazadores, como biosensores fluorescentes que pueden detectar la actividad de toxinas dentro de células vivas. La escisión de SNAP-25 anuló las señales FRET de CFP/YFP y la escisión de Syb dio como resultado la redistribución espacial de la fluorescencia de YFP en las células. La presente invención proporciona un medio para llevar a cabo el tamizaje basado en células de inhibidores de toxina y para caracterizar la actividad de toxinas dentro de las células. La presente invención describe además que la localización subcelular de SNAP-25 y Syb afecta la escisión eficiente por BoNT/A y B en las células, respectivamente.

La Transferencia de Energía por Resonancia Fluorescente (FRET) es una herramienta que permite la evaluación de la distancia entre una molécula y otra (por ejemplo, una proteína o ácido nucleico) o entre dos posiciones en la misma molécula. En la actualidad, FRET se conoce ampliamente en la técnica (para una revisión, ver Matyus, (1992) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 12:323). FRET es un proceso sin radiación en el cual la energía se transfiere desde

una molécula donante excitada a una molécula aceptora. La transferencia de energía sin radiación es el proceso mecánico cuántico mediante el cual la energía del estado excitado de un fluoróforo se transfiere sin emisión real de fotones a un segundo fluoróforo. Los principios físicos cuánticos se revisan en Jovin y Jovin, 1989, Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry, eds. E. Kohen y J. G. Hirschberg, Academic Press. En resumen, un fluoróforo absorbe energía luminosa a una longitud de onda característica. Esta longitud de onda también se conoce como la longitud de onda de excitación. La energía absorbida por un fluorocromo se libera posteriormente mediante diversas vías, siendo una la emisión de fotones para producir fluorescencia. La longitud de onda de la luz que se emite se conoce como la longitud de onda de emisión y es una característica inherente de un fluoróforo particular. En FRET, la energía se libera a una longitud de onda de emisión del segundo fluoróforo. El primer fluoróforo generalmente se denomina el donante (D) y tiene un estado excitado de energía superior al del segundo fluoróforo, denominado el aceptor (A).

Una característica esencial del proceso es que el espectro de emisión del donante se solapa con el espectro de excitación del aceptor y que el donante y el aceptor están suficientemente cerca.

Además, la distancia entre D y A debe ser lo suficientemente pequeña para permitir la transferencia sin radiación de energía entre los fluoróforos. Debido a que la tasa de transferencia de energía es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre el donante y el aceptor, la eficiencia de la transferencia de energía es extremadamente sensible a los cambios de distancia. La transferencia de energía es la que se produce con eficiencia detectable en el intervalo de distancia de 1-10 nm, pero es típicamente de 4-6 nm para resultados óptimos. El intervalo de distancia sobre el cual la transferencia de energía sin radiación es eficaz depende de muchos factores diferentes también, que incluyen la eficiencia cuántica de fluorescencia del donante, el coeficiente de extinción del aceptor, el grado de solapamiento de sus espectros respectivos, el índice de refracción del medio y la orientación relativa de los momentos de transición de los dos fluoróforos.

La presente invención proporciona un constructo ("constructo FRET") que comprende un fluoróforo FRET donante y un aceptor enlazados por un péptido enlazador ("péptido sustrato") que es escindible por una BoNT correspondiente. En la presencia de un BoNT, se escinde el péptido enlazador, lo que conduce de esta manera a una disminución de la transferencia de energía y a un aumento de la emisión de luz por el fluoróforo donante. De esta manera, la actividad de proteólisis de la toxina puede monitorearse y cuantificarse en tiempo real.

Como se usa en la presente descripción con respecto al donante y las porciones fluorescentesceptoras correspondientes, "correspondiente" se refiere a una porción fluorescente aceptora que tiene un espectro de emisión que solapa el espectro de excitación de la porción fluorescente donante. La longitud de onda máxima del espectro de emisión de la porción fluorescente aceptora debería ser al menos 100 nm mayor que la longitud de onda máxima del espectro de excitación de la porción fluorescente donante. En consecuencia, puede producirse una transferencia de energía no radioactiva eficiente.

Como se usa en la presente descripción con respecto a péptido sustrato y a BoNT, "correspondiente" se refiere a una toxina BoNT que es capaz de actuar sobre el péptido enlazador y escindir en un sitio de escisión específico.

El donante fluorescente y las porciones receptoras correspondientes se escogen en general para (a) transferencia de energía de Foster de alta eficiencia; (b) un gran desplazamiento de Stokes final (>100 nm); (c) desplazamiento de la emisión en la medida de lo posible en la porción roja del espectro visible (>600 nm); y (d) desplazamiento de la emisión a una mayor longitud de onda que la emisión fluorescente de agua Raman producida por la excitación a la longitud de onda de excitación del donante. Por ejemplo, puede escogerse una porción fluorescente donante que tenga su máximo de excitación cerca de la línea láser (por ejemplo, Helio-Cadmio 442 nm o Argón 488 nm), un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico y un buen solapamiento de su emisión fluorescente con el espectro de excitación de la porción fluorescente aceptora correspondiente. Puede escogerse una porción fluorescente aceptora correspondiente que tenga un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico, un buen solapamiento de su excitación con la emisión de la porción fluorescente donante y la emisión en la parte roja del espectro visible (>600 nm).

Un experto en la técnica reconocerá que muchas moléculas de fluoróforo son adecuadas para FRET. En una modalidad preferida, las proteínas fluorescentes se usan como fluoróforos. Las porciones fluorescentes donantes representativas que pueden usarse con diversas porciones fluorescentesceptoras en la tecnología de FRET incluyen fluoresceína, Amarillo Lucifer, B-ficoeritrina, 9-acridinaisotiocianato, Amarillo Lucifer VS, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcoumarina, succinimidil 1-pirenbutirato y derivados de ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico. Las porciones fluorescentesceptoras representativas, que dependen de la porción fluorescente donante usada, incluyen LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5, Cy5.5, Lisamina rodamina B cloruro de sulfonilo, isotiocianato de tetrametil rodamina, isotiocianato de rodamina, isotiocianato de eritrosina, fluoresceína, pentaacetato de dietilentríamina u otros quelatos o iones de Lantánidos (por ejemplo, Europio o Terbio). Las porciones fluorescentes donantes y receptoras pueden obtenerse, por ejemplo, de Molecular Probes (Junction City, Oreg.) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.).

La Tabla 1 enumera otros ejemplos de fluoróforos químicos adecuados para el uso en la invención, junto con sus longitudes de onda de excitación y emisión.

Determinados aminoácidos de origen natural, tales como triptófano, son fluorescentes. Además los aminoácidos pueden derivatizarse, por ejemplo, mediante la unión de un grupo fluorescente a un aminoácido (tal como la unión de AEDANS a una Cys), para generar un par fluoróforo para FRET. El par AEDANS-Cys se usa comúnmente para detectar un cambio conformacional e interacciones en las proteínas. Algunas otras formas de grupos de fluorescencia se han usado además para modificar aminoácidos y para generar FRET dentro de los fragmentos de proteínas (por ejemplo, 2,4-dinitrofenil-lisina con S-(N-[4-metil-7-dimetilamino-coumarin-3-il]-carboxamidometil)-cisteína-).

En otra modalidad, que es específicamente adecuada para el uso en células vivas, se usan la proteína fluorescente verde (GFP) y sus diversos mutantes como los fluoróforos. Los ejemplos de las proteínas fluorescentes que varían entre sí en el máximo de excitación y emisión se enumeran en la Tabla 1 del documento WO 97/28261 (T sien y otros, 1997), que se incorpora en la presente descripción como referencia. Estas (cada una seguida de longitudes de onda [máximo de excitación/máximo de emisión] expresadas en nanómetros) incluyen la Proteína Fluorescente Verde de tipo silvestre [395(475)/508] y el mutante clonado de las variantes de la Proteína Fluorescente Verde P4 [383/447], P4-3 [381/445], W7 [433(453)/475(501)], W2 [432(453)/408], S65T [489/511], P4-1 [504(396)/480], S65A [471/504], S65C [479/507], S65L [484/510], Y66F [360/442], Y66W [458/480], IOc [513/527], WIB [432(453)/476(503)], Emerald [487/508] y Sapphire [395/511]. Pueden usarse las proteínas fluorescentes rojas tales como DsRed (Clontech) que tienen un máximo de excitación de 558 nm y un máximo de emisión de 583. Esta lista no es exhaustiva de las proteínas fluorescentes conocidas en la técnica; los ejemplos adicionales se encuentran en las bases de datos públicas de Genbank y SwissPro.

Tabla 1

Fluoróforo	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Color
PKH2	490	504	verde
PKH67	490	502	verde
Fluoresceína (FITC)	495	525	verde
Hoechst 33258	360	470	azul
R-Ficoeritrina (PE)	488	578	naranja-rojo
Rodamina (TRITC)	552	570	rojo
Quantum Red™	488	670	rojo
PKH26	551	567	rojo
Rojo Texas	596	620	rojo
Cy3	552	570	rojo

GFP es una proteína de 27-30 KD y puede fusionarse con otra proteína, por ejemplo, la proteína objetivo, y la proteína de fusión puede modificarse por ingeniería genética para su expresión en una célula huésped, como las de E. coli. GFP y sus diversos mutantes son capaces de generar fluorescencia en células y tejidos vivos. Las formas de mutación de GFP tienen ligeras diferencias entre aminoácidos dentro de su región de fluorescencia que dan como resultado su espectro desplazado. Se espera que en el futuro se generen más mutaciones de GFP para tener diferentes espectros. Entre estas variantes de GFP, BFP-YFP, BFP-CFP, CFP-YFP, GFP-DsRed, se usan comúnmente como pares de donante-aceptor de FRET para detectar interacciones proteína-proteína. Estos pares son adecuados además para detectar la escisión por proteasas de la región enlazadora que une al par.

Se prefiere el uso de las proteínas fluorescentes porque permiten el uso de un fragmento enlazador de aproximadamente 60 residuos de aminoácidos. Los fragmentos más largos normalmente son más sensibles al reconocimiento y a la escisión por toxinas, por lo tanto, dan como resultado una mayor sensibilidad para detectar toxinas. Como se muestra en los ejemplos a continuación, las EC50 para BoNT/A y E después de 4 horas de incubación con CFP-SNAP-YFP son tan bajas como 15-20 pM (1-2 ng/ml), cuando se miden con un espectrofluorómetro de microplacas ampliamente usado (Spectra Max Gemini, Molecular Device). Las EC50 para BoNT/B y F son de aproximadamente 200-250 pM y la sensibilidad puede mejorarse aumentando el tiempo de incubación.

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, dos fluoróforos se enlazan entre sí por un enlazador de longitud adecuada, de manera que se produce FRET. El enlazador es un fragmento de una proteína sustrato de BoNT. Cuando se exponen a una BoNT capaz de escindir el fragmento enlazador, los dos fluoróforos se separan y se anula FRET. La presente invención proporciona en consecuencia un método para detectar BoNT mediante la detección del cambio en FRET. Las proteínas SNARE de muchas especies son adecuadas como proteínas sustrato para toxinas

BoNT, porque se conoce que estas proteínas se conservan al nivel de aminoácido. Se conocen muchas de estas proteínas sustrato de BoNT y están disponibles para ser usadas o modificadas para el uso como un péptido enlazador adecuado para la presente invención. Algunas de las proteínas sustrato y sus número de acceso a GenBank se enumeran en

Tabla 2

Proteína	Origen	Núm. de acceso a GenBank
syb I	ratón	NP-033522
syb Ia	Humano	NP_055046
syb I	rata	AAN85832
syb	Rana africana	AAB88137
syb	rayo eléctrico	A32146
syb	Babosa marina borracha	P35589
syb	Takifugu rubripes	AAB94047
syb	drosophila	AAB28707
syb II	ratón	NP_033523
syb II	Rana africana	P47193
Syb II	conejo	AAN14408
syb II	rata	NP_036795
syb II	Humano	AAH19608
syb 3	Humano	AAP36821
SNAP25-1	Pez cebra	AAC64289
SNAP25-A	Humano	NP_003072
SNAP25a	Rana americana	AAO13788
SNAP25	ratón	XP_130450
SNAP25	rata	NP_112253
SNAP25	carpin dorado	150480
SNAP25-b	Pez cebra	NP_571509
SNAP25b	Rana americana	AAO13789
SNAP25-3	Humano	CAC34535

Se conoce que cada toxina BoNT escinde un enlace peptídico específico entre dos aminoácidos específicos dentro del sitio de escisión por toxinas. La Tabla 3 más adelante enumera los pares de aminoácidos para cada toxina BoNT. Estos pares de secuencia de aminoácidos, sin embargo, no son suficientes para el reconocimiento y la escisión por toxinas. Por ejemplo, BoNT/A escinde SNAP-25 en Q(197)-R(198) de la secuencia de SNAP-25 de rata (Núm. de acceso a GenBank: NP.sub.--112253), pero no en Q(15)-R(16). En general, no existe una secuencia de aminoácidos conservada como el sitio de reconocimiento; más bien, se considera que las toxinas reconocen la estructura terciaria, en lugar de la primaria, de su proteína objetivo. Sin embargo, un fragmento muy corto de la proteína sustrato es suficiente para el reconocimiento y escisión por toxinas, independientemente de su origen de especie, siempre que tenga los dos residuos de aminoácidos en el sitio de escisión por toxinas enumerado más abajo en la Tabla 3 más adelante.

La proteína o péptido enlazador puede ser tan largo como la longitud completa de la proteína sustrato de BoNT. Preferentemente el enlazador es un fragmento más corto de la proteína sustrato. Un enlazador de sustrato de longitud completa puede ser demasiado largo para una FRET eficiente, y un fragmento más corto es más eficaz y fácil de producir que la proteína de longitud completa. Por otro lado, como se indicó anteriormente, el péptido enlazador debería estar por encima de determinada longitud mínima, porque por debajo de una longitud mínima tal, la escisión del péptido enlazador por la BoNT respectiva se vuelve ineficiente.

Tabla 3

Enlaces peptídicos reconocidos y escindidos por las toxinas BoNT		
Toxina	Sitio de escisión	Secuencia de reconocimiento mínima putativa
BoNT/A	Q-R	Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys sec. con núm. de ident.: 1
BoNT/B	Q-F	Gly-Ala-Ser-Gln-Phe-Glu-Thr-Ser sec. con núm. de ident.: 2
BoNT/C (SNAP25)	R-A	Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met sec. con núm. de ident.: 3
BoNT/C (Sintaxina)	K-A	Asp-Thr-Lys-Lys-Ala-Val-Lys-Phe sec. con núm. de ident.: 4
BoNT/D	X-L	
BoNT/E	R-I	Gln-Ile-Asp-Arg-Ile-Met-Glu-Lys sec. con núm. de ident.: 5
BoNT/F	Q-K	Glu-Arg-Asp-Gln-Lys-Leu-Ser-Glu sec. con núm. de ident.: 6
BoNT/G	A-A	

Mediante el uso de syb II y BoNT/B como un ejemplo, la Tabla 4 más adelante ilustra la relación entre la longitud del péptido enlazador y la tasa de escisión por toxinas. La proteína syb II de rata de longitud completa (Núm. de GenBank: NP.sub.--036795) tiene 116 aminoácidos, de los cuales los aminoácidos 1-94 en el extremo amino terminal es el dominio citoplasmático y el resto el dominio transmembrana. Como deja claro la Tabla 1, dentro de determinado límite, un fragmento más corto se escinde por la toxina a una tasa más lenta (datos de Foran y otros, Biochemistry 33:15365, 1994).

Como puede observarse en la Tabla 4, la neurotoxina de tétano (TeNT) requiere un fragmento más largo (33-94) que BoNT/B (55-94) para la escisión óptima. Un fragmento que consiste en 60-94 se ha usado en varios estudios que incluyen varios métodos de ensayo de toxinas basados en péptidos (Schmidt y otros, 2003, como arriba, y Schmidt y otros, 2001, Analytical Biochemistry, 296: 130-137).

Para BoNT/A, se requiere el fragmento 141-206 de SNAP-25 para conservar la mayor parte de la sensibilidad a toxinas (Washbourne y otros, 1997, FEBS Letters, 418:1). Además existen otros informes de que un péptido más corto, los aminoácidos 187-203 de SNAP25, es suficiente para ser escindido por BoNT/A (, 2001). El sitio mínimo para BoNT/A es: Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys (sec. con núm. de ident.: 1). BoNT/A escinde Gln-Arg.

Tabla 4

Relación entre la longitud del fragmento de Syb II y la tasa de escisión		
Longitud del fragmento de syb II	Tasa de escisión relativa por BoNT/B	% de Tasa de escisión relativa por TeNT
1-116 de longitud completa	100 (%)	100 (%)
33-94	100	100
45-94	121	1,1
55-94	105	0,4
65-94	7	0,3

Mediante el uso de SNAP-25 de longitud completa como la secuencia enlazadora entre CFP y YFP dentro de las células PC 12, los resultados preliminares indican que las señales FRET obtenidas son más fuertes que las obtenidas mediante el uso de un fragmento más corto, lo suficiente como para ser detectadas mediante el uso de un microscopio

de laboratorio convencional. Se considera que en las células PC12 la tasa de escisión de la SNAP-25 de longitud completa por BoNT/A es más rápida y más consistente de célula a célula que el fragmento corto, probablemente debido al hecho de que la SNAP-25 de longitud completa se dirige a la membrana plasmática, a la cual la cadena ligera de BoNT/A también puede dirigirse y anclarse.

5 Para BoNT/B, se encontró que un fragmento tan corto como entre los residuos 60-94 es tan eficaz como un fragmento entre los residuos 33-94. Preferentemente, se usa un fragmento entre 33-94 para BoNT/B y TeNT. Ambas toxinas escinden entre Gln y Phe, y se considera que la secuencia mínima para la escisión es: Gly-Ala-Ser-Gln-Phe-Glu-Thr-Ser (sec. con núm. de ident.: 2). Existen indicaciones de que la cadena ligera de BoNT/B puede dirigirse y anclarse a vesículas sinápticas, además puede ser deseable dirigir, a través de secuencias señales, un constructo FRET de la presente invención a las vesículas sinápticas para lograr una mayor escisión eficiente dentro de las células.

15 BoNT/C escinde tanto a SNAP25 como a Sintaxina, y se considera que escinde a una tasa muy baja si el sustrato está en solución. Las SNAP25 y Sintaxina nativas que residen en la membrana celular se escinden con mayor eficiencia por BoNT/C. La secuencia de escisión mínima para SNAP25 es: Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met (sec. con núm. de ident.: 3), donde la escisión se produce entre Arg-Ala; para Sintaxina, la secuencia de escisión mínima es Asp-Thr-Lys-Lys-Ala-Val-Lys-Phe (sec. con núm. de ident.: 4) y la escisión se produce en Lys-Ala.

20 BoNT/E requiere una secuencia mínima de: Gln-Ile-Asp-Arg-Ile-Met-Glu-Lys (sec. con núm. de ident.: 5) y escinde entre Arg-Ile.

BoNT/F escinde Gln-Lys. Schmidt y otros (*Analytical Biochemistry*, 296: 130-137 (2001)) informaron que un fragmento 37-75 de syb II conserva la mayoría de la sensibilidad a toxinas y la secuencia mínima es: Glu-Arg-Asp-Gln-Lys-Leu-Ser-Glu (sec. con núm. de ident.: 6).

25 A partir del análisis anterior sobre los sitios de escisión mínimos y la relación entre la fortaleza de la señal FRET y la longitud del enlazador, y entre la eficiencia de escisión y la longitud del enlazador, un experto en la técnica puede escoger fácilmente la longitud adecuada del enlazador para lograr el equilibrio óptimo entre la fortaleza de la señal FRET y la eficiencia de escisión.

30 En una modalidad, puede purificarse primero una proteína enlazadora o fragmentos de esta, o los péptidos se sintetizaron primero y después los grupos de fluorescencia se añadieron en determinados aminoácidos mediante una reacción química. Una etiqueta fluorescente se une al polipéptido enlazador o, alternativamente, una proteína fluorescente se fusiona en marco con un polipéptido enlazador, como se escribe más adelante. El análisis anterior deja claro que mientras que son deseables los fragmentos de sustrato cortos para la especificidad de detección de toxinas, los fragmentos más largos pueden ser deseables para una mejor fortaleza de la señal o eficiencia de escisión. Se reconoce fácilmente que cuando la proteína sustrato contiene más de un sitio de reconocimiento para un BoNT, un solo resultado de posición no será suficiente para identificar cuál toxina específica está presente en la muestra. En una modalidad de la presente invención, si un fragmento de sustrato más largo, especialmente una proteína sustrato de longitud completa, se usa, el sustrato puede manipularse por ingeniería genética, por ejemplo, a través de mutagénesis dirigida a sitio u otros métodos moleculares de ingeniería genética bien conocidos por los expertos en la técnica, de manera que este solo contenga un sitio de reconocimiento para toxinas/proteasas. Ver, por ejemplo, Zhang y otros, 2002, *Neuron* 34:599-611 "Ca²⁺-dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for Ca²⁺ triggered exocytosis" (que demuestra que la SNAP-25 que tiene mutaciones en el sitio de escisión por BoNT/E (Asp 179 a Lys) es resistente a la escisión por BoNT/E, pero se comporta de manera normal cuando se analiza para la formación del complejo SNARE). En una modalidad preferida, el método de la presente invención usa una combinación de ingeniería genética de especificidad y optimización de longitud para lograr la fortaleza de señal óptima, la eficiencia de escisión y la especificidad a toxina/serotipo.

50 En una modalidad preferida, los fluoróforos son proteínas fluorescentes adecuadas unidas por un péptido sustrato adecuado. Puede producirse después un constructo FRET a través de la expresión de moléculas de ácido nucleico recombinantes que comprenden una fusión en marco de secuencias que codifican un polipéptido tal y una etiqueta proteica fluorescente ya sea in vitro (por ejemplo, mediante el uso de un sistema de transcripción/traducción libre de células, o en su lugar mediante el uso de células cultivadas transformadas o transfectadas mediante el uso de los métodos conocidos en la técnica). Las células adecuadas para producir el constructo FRET pueden ser células bacterianas, fúngicas, vegetales, una célula animal. El constructo FRET también puede producirse in vivo, por ejemplo, en una planta transgénica, o en una animal transgénico que incluye, pero no limitado a, insectos, anfibios y mamíferos. Una molécula de ácido nucleico recombinante de uso en la invención puede construirse y expresarse mediante métodos moleculares bien conocidos en la técnica, y adicionalmente puede comprender secuencias que incluyen, pero no limitado a, las que codifican una etiqueta (por ejemplo, una etiqueta de histidina) para permitir la purificación fácil, un enlazador, una señal de secreción, una señal de localización celular u otra señal de secuencia primaria capaz de dirigir al constructo a una localización celular particular, si esto se desea.

65 Un nivel tan bajo como 300 nM de proteínas es suficiente para generar suficientes señales de fluorescencia que puedan detectarse mediante el uso de un espectrofluorómetro de microplacas. El cambio de la señal de fluorescencia puede rastrearse en tiempo real para reflejar la actividad enzimática proteasa de las toxinas. El monitoreo en tiempo

real mide los cambios en la señal a medida que avanza la reacción, y permite la recolección rápida de datos y rinde la información con respecto a la cinética de reacción en diversas condiciones. Los cambios en la relación de FRET y los grados de escisión pueden correlacionarse, por ejemplo, para un determinado espectrofluorómetro mediante el uso de un método tal como un ensayo de HPLC para correlacionar la unidad de constante cinética de la relación de FRET con respecto a la concentración de sustrato.

La Figura 10, es un esquema de un constructo de la materia anterior 100, que tiene un enlazador 130 que incluye una secuencia del sitio de escisión 140 y el sitio de escisión 142 dispuesta entre una etiqueta donante 110 y una etiqueta aceptora 120. Este tipo de constructo de la materia anterior funciona razonablemente bien para detectar las BoNT. Sin embargo, el constructo ilustrativo 100a de la figura 11a, sorprendentemente, tiene una mejor sensibilidad para detectar las BoNT debido a la inclusión del espaciador 150a dentro del enlazador 130a.

La Figura 11a es un esquema que representa un constructo 100a no de acuerdo con la presente invención, que tiene un enlazador 130a que incluye una secuencia del sitio de escisión 140, un sitio de escisión 142, y un espaciador 150a. El espaciador 150a está dispuesto entre la secuencia del sitio de escisión 140 y la etiqueta aceptora 120. El constructo 100a puede seleccionarse del grupo que consiste en CFP-(SGLRSRA)-SNAP-25-(SNS)-YFP y CFP-(SGLRSRA)-sinaptobrevina-(SNS)-YFP.

La etiqueta donante 110 y la etiqueta aceptora 120 se colocan para proporcionar un acoplamiento electrónico de manera que la etiqueta donante pueda transferir energía a la etiqueta aceptora mediante un mecanismo de acoplamiento dipolo-dipolo, que incluye pero no limitado a la transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET).

El péptido enlazador 130a es un sustrato de una neurotoxina botulínica seleccionada del grupo que consiste en sinaptobrevina (VAMP), syntaxina y SNAP-25, o un fragmento de esta que puede ser reconocido y escindido por la neurotoxina botulínica. Estas proteínas en conjunto se denominan las proteínas SNARE. El enlazador 130a puede tener una longitud de la estructura primaria de cualquier longitud adecuada, que incluye por ejemplo, mayor que o igual a 5 nm, 8 nm, 10 nm, 12 nm, 14 nm y 20 nm.

El espaciador 150a puede tener cualquier número adecuado de aminoácidos, pero preferentemente al menos 3, 5, 7, 10, 12 o 15 aminoácidos. El espaciador 150a puede incluir una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (GGGGS)_n y (EAAAK)_n, donde n es 1-3. Alternativamente, el espaciador 150a puede comprender una proteína, motivo o muteína SNARE. Aunque el espaciador 150a aumenta la distancia de la estructura primaria entre la etiqueta donante 110 y la etiqueta aceptora 120, el espaciador 150a aumenta ventajosamente el acoplamiento electrónico (efecto de FRET) entre la etiqueta donante 110 y la etiqueta aceptora 120 en relación con un constructo correspondiente sin el espaciador. El acoplamiento electrónico mejorado se produce porque el espaciador 150a reduce la distancia de la estructura terciaria entre la etiqueta donante 110 y la etiqueta aceptora 120, lo que permite por lo tanto aumentar el acoplamiento electrónico.

La secuencia del sitio de escisión 140 puede comprender (a) una proteína, motivo, muteína SNARE, y (b) un espaciador con al menos 5 aminoácidos, en donde el espaciador incluye una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (GGGGS)_n y (EAAAK)_n, donde n es 1-3.

El constructo 100b de la Figura 11b, el cual no es de acuerdo con la presente invención, es similar al constructo 100a de la Figura 11a excepto que el enlazador 130b tiene el espaciador 150b dispuesto entre la etiqueta donante 110 y la secuencia del sitio de escisión 140.

El constructo 100c de la Figura 11c, el cual es de acuerdo con la presente invención, es similar al constructo 100a de la Figura 11a excepto que el enlazador 130b tiene (a) un primer espaciador 150c dispuesto entre la etiqueta donante 110 y la secuencia del sitio de escisión 140 y (b) un segundo espaciador 150d dispuesto entre la secuencia del sitio de escisión 140 y la etiqueta aceptora 120.

La Figura 12 ilustra las etapas de un método 200 para mejorar la sensibilidad de la transferencia de energía entre la etiqueta donante y la etiqueta aceptora mediante el uso del constructo de las figuras 11a -11c. Como se expuso anteriormente, los constructos de las figuras 11a y 11b no son de acuerdo con la presente invención, mientras que el constructo de la figura 11c es de acuerdo con la presente invención. La etapa 210 se compone de proporcionar un constructo de acuerdo con las figuras 11a-11c que comprende la etiqueta donante y la etiqueta aceptora que se acoplan físicamente mediante un enlazador. El constructo es un constructo basado en proteínas y el enlazador es una secuencia peptídica 212. La etapa 220 se compone de incluir en el enlazador una secuencia del sitio de escisión. La secuencia del sitio de escisión comprende una proteína SNARE, o un fragmento o muteína de esta, y de acuerdo con la presente invención los espaciadores del constructo de la figura 11c comprenden de acuerdo con una modalidad de la presente invención cada secuencia seleccionada del grupo que consiste en (GGGGS)_n y (EAAAK)_n, donde n es 1-3 222. La etapa 230 se compone de incluir un espaciador en el enlazador entre al menos uno del donante y la secuencia del sitio de escisión y el aceptor y la secuencia del sitio de escisión, por lo que el acoplamiento electrónico entre el donante y el aceptor aumenta (a) mediante la reducción de una distancia de la estructura terciaria entre el donante y el aceptor 234, y (b) proporcionando un salto electrónico entre el donante y el aceptor 236.

La Figura 13 ilustra las etapas de un método 300 para detectar la neurotoxina botulínica mediante el uso del constructo de las figuras 11a-11c. Como se expuso anteriormente, los constructos de las figuras 11a y 11b no son de acuerdo con la presente invención, mientras que el constructo de la figura 11c es de acuerdo con la presente invención. La etapa 310 comprende proporcionar un constructo de la reivindicación 1, en donde un enlazador es una proteína sustrato o un fragmento escindible de esta de la neurotoxina botulínica a detectar. La etapa 320 comprende exponer el constructo a una muestra que se sospecha que contiene la neurotoxina botulínica bajo una condición en la cual la neurotoxina botulínica escinde la proteína sustrato o el fragmento de esta. Y la etapa 330 comprende detectar y comparar una señal FRET antes y después de que el constructo se expone a la muestra, en donde una disminución de FRET indica la presencia de la neurotoxina botulínica en la muestra.

El método de la presente invención es altamente sensible y, como una consecuencia, puede usarse para detectar la cantidad traza de las BoNT en muestras ambientales directamente, incluidas las protoxinas dentro de las células bacterianas de *Botulinum*. En consecuencia, la presente invención proporciona además un método para la detección e identificación de toxinas directamente mediante el uso de muestras ambientales.

La presente invención proporciona además un método para tamizar inhibidores de las BoNT mediante el uso de los sistemas *in vitro* descritos anteriormente. Debido a su alta sensibilidad, lectura rápida y facilidad de uso, un sistema *in vitro* basado en la presente invención es adecuado además para tamizar inhibidores de toxina. Específicamente, un constructo FRET con sustrato de BoNT adecuado se expone a una BoNT correspondiente, en la presencia de una sustancia inhibidora candidata y los cambios en las señales FRET se monitorean para determinar si el candidato inhibe las actividades de la BoNT.

La presente invención proporciona además un método para detectar una BoNT mediante el uso de un sistema basado en células para detectar las BoNT y para tamizar además los inhibidores de BoNT. Un constructo FRET con sustrato de BoNT como se describe anteriormente se expresa dentro de una célula y la célula se expone después a una muestra que se sospecha que contiene una BoNT, y los cambios en las señales FRET se monitorean después como una indicación de la presencia/ausencia o concentración de la BoNT. Específicamente, una disminución de las señales FRET indica que la muestra contiene una BoNT correspondiente.

Los ensayos de tamizaje de alto rendimiento basados en células tienen el potencial de revelar no solo los agentes que pueden bloquear la actividad proteolítica de las toxinas, sino además los agentes que pueden bloquear otras etapas en la acción de la toxina tal como la unión a su(s) receptor(es) celular(es), la translocación de la cadena ligera a través de las membranas endosomales y el repliegamiento de la cadena ligera en el citosol después de la translocación.

La presente invención proporciona además un método para tamizar los inhibidores de las BoNT mediante el uso del sistema basado en células descrito anteriormente. Específicamente, una célula que expresa un constructo FRET con sustrato de BoNT adecuado se expone a una BoNT correspondiente, en la presencia de una sustancia inhibidora candidata, y los cambios en las señales FRET se monitorean para determinar si el candidato inhibe las actividades de la BoNT. En comparación con otros métodos de tamizaje basados en *in vitro* que solo pueden identificar inhibidores directos de la interacción toxina-sustrato, el método de tamizaje basado en células de la presente invención permite además el tamizaje de inhibidores de otras actividades relacionadas con toxinas, tales como pero no limitadas a la unión de receptores de membrana a toxinas, la translocación en membranas y el movimiento intracelular de toxinas.

De acuerdo con una modalidad preferida, una molécula de ácido nucleico recombinante, preferentemente un vector de expresión, que codifica un polipéptido sustrato de BoNT y dos péptidos fluorescentes efectores de FRET adecuados se introduce en una célula huésped adecuada. Un experto puede escoger un vector de expresión adecuado, preferentemente un vector de expresión de mamífero para la invención, y reconocerá que existen enormes cantidades de opciones. Por ejemplo, la serie de vectores pcADN, tal como pCI y pSi (de Promega, Madison, Wis.), CDM8, pCeo4. Muchos de estos vectores usan promotores virales. Preferentemente, se usan promotores inducibles, tales como los vectores tet-on y tet-off de BD Biosciences (San Jose, Calif.).

Son adecuadas muchas opciones de líneas celulares como la célula huésped para la presente invención. Preferentemente, la célula es de un tipo en el cual la BoNT respectiva exhibe sus actividades tóxicas. En otras palabras, las células preferentemente muestran receptores de superficie celular adecuados, o de otra manera permiten que la toxina se transloque en la célula de manera suficientemente eficaz y permiten que la toxina escinda al polipéptido sustrato adecuado. Los ejemplos específicos incluyen neuronas cultivadas primarias (neurona cortical, neurona del hipocampo, neurona motora de la médula espinal, etc); células PC 12 o líneas de células PC12 derivadas; células cromafinas cultivadas primarias; varias líneas celulares de neuroblastoma cultivadas, tales como la línea celular Neuro 2a colinérgica murina, línea celular SK-N-SH adrenérgica humana y línea de células NS-26. Ver, por ejemplo, Foster y Stringer (1999), Genetic Regulatory Elements Introduced Into Neural Stem and Progenitor Cell Populations, *Brain Pathology* 9: 547-567.

La región codificante del polipéptido sustrato-FRET se encuentra bajo el control de un promotor adecuado. Dependiendo de los tipos de células huésped usadas, muchos promotores adecuados se conocen y están fácilmente disponibles en la técnica. Tales promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Un promotor constitutivo puede seleccionarse para dirigir la expresión del polipéptido deseado de la presente invención. Un constructo de expresión

tal puede proporcionar ventajas adicionales ya que evita la necesidad de cultivar los huéspedes de expresión en un medio que contenga un sustrato de inducción. Los ejemplos de promotores adecuados podrían ser LTR, SV40 y CMV en sistemas de mamíferos; lac o trp de *E. coli* en sistemas bacterianos; promotor de polihedro de baculovirus (polh) en sistemas de insectos y otros promotores que se conoce que controlan la expresión en células eucariotas y procariontas o en sus virus. Los ejemplos de promotores constitutivos y/o inducibles fuertes que se prefieren para el uso en huéspedes de expresión fúngica son los que pueden obtenerse de los genes fúngicos para promotores de xilanasa (xlnA), fitasa, ATP-sintetasa, subunidad 9 (oliC), triosa fosfato isomerasa (tpi), alcohol deshidrogenasa (AdhA), .alfa.-amilasa (amy), amiloglucosidasa (AG--del gen de glaA), acetamidasa (amdS) y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (gpd). Los ejemplos de promotores de levadura fuertes son los que pueden obtenerse a partir de los genes para la alcohol deshidrogenasa, lactasa, 3-fosfoglicerato quinasa y triosafosfato isomerasa. Los ejemplos de promotores bacterianos fuertes incluyen promotores SPO.sub.2 así como también promotores de genes de proteasas extracelulares.

Pueden usarse además promotores híbridos para mejorar la regulación inducible del constructo de expresión. El promotor puede incluir adicionalmente características para asegurar o para aumentar la expresión en un huésped adecuado. Por ejemplo, las características pueden ser regiones conservadas tales como Caja Pribnow o una caja TATA. El promotor incluso puede contener otras secuencias para afectar (tal como mantener, aumentar o disminuir) los niveles de expresión de la secuencia de nucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, otras secuencias adecuadas incluyen el intrón Shl o un intrón ADH. Otras secuencias incluyen elementos inducibles--tales como elementos inducibles por temperatura, químicos, luz o estrés. Además, pueden estar presentes elementos adecuados para mejorar la transcripción o la traducción. Un ejemplo del último elemento es la secuencia señal 5' de TMV (ver Sleat, 1987, *Gene* 217: 217-225; y Dawson, 1993, *Plant Mol. Biol.* 23: 97).

El vector de expresión puede contener además las secuencias que actúan sobre el promotor para amplificar la expresión. Por ejemplo, los elementos de acción cis SV40, CMV y polioma (potenciadores) y un marcador de selección pueden proporcionar un rasgo fenotípico para la selección (por ejemplo, resistencia a dihidrofolato reductasa o a neomicina para células de mamíferos o resistencia a ampicilina/tetraciclina para *E. coli*). La selección del vector apropiado que contiene el promotor apropiado y el marcador de selección se encuentra dentro del nivel del experto en la técnica.

Preferentemente, la región codificante para el polipéptido sustrato-FRET está bajo el control de un promotor inducible. En comparación con un promotor constitutivo, es preferible un promotor inducible porque este permite el control adecuado de la concentración del reportero en la célula, además la medición de los cambios en las señales FRET se facilita mucho.

Por ejemplo, el reportero de FRET puede controlarse mediante el uso del sistema Tet-on & Tet-off (BD Biosciences, San Jose, Calif.). Bajo el control de este promotor, la expresión génica puede regularse de forma precisa, reversible y cuantitativa. En resumen, para el sistema Tet-on, la transcripción del gen corriente abajo solo se produce cuando la doxiciclina está presente en el medio de cultivo. Después de la transcripción durante un determinado periodo de tiempo, puede cambiarse el medio de cultivo para agotar la doxiciclina y por lo tanto, parar la síntesis de nuevas proteínas reporteras de FRET. Además, no existen antecedentes de proteínas FRET recién sintetizadas y es posible que puedan observarse cambios más rápidos después del tratamiento con toxinas.

El análisis de fluorescencia puede llevarse a cabo mediante el uso de, por ejemplo, un sistema de microscopio epifluorescente de recuento de fotones (que contiene el espejo dicróico y los filtros apropiados para monitorear la emisión fluorescente en el intervalo particular), un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones o un fluorómetro. La excitación para iniciar la transferencia de energía puede llevarse a cabo con un láser de iones de argón, una lámpara de arco de mercurio (Hg) de alta intensidad, una fuente de luz de fibra óptica, u otra fuente de luz de alta intensidad filtrada apropiadamente para la excitación en el intervalo deseado. Será evidente para un experto en la técnica que los medios de excitación/detección pueden aumentarse mediante la incorporación de medios fotomultiplicadores para mejorar la sensibilidad de la detección. Por ejemplo, puede usarse el método de correlación cruzada de dos fotones para lograr la detección en una escala de única molécula (ver, por ejemplo, Kohl y otros, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, 99:12161, 2002).

Pueden medirse un número de parámetros de salida de fluorescencia. Estos incluyen: 1) medir la fluorescencia emitida a la longitud de onda de emisión del aceptor (A) y donante (D) y determinar la amplitud de la transferencia de energía mediante la relación de sus amplitudes de emisión; 2) medir la duración de la fluorescencia de D; 3) medir la tasa de fotoblanqueamiento de D; 4) medir la anisotropía de D y/o A; o 5) medir la fluorescencia de monómero/excímero de desplazamiento de Stokes. Ver, por ejemplo, Mochizuki y otros, (2001) "Spatio-temporal images of grow-factor-induced activation of Ras and Rap1." *Nature* 411:1065-1068, Sato y otros (2002) "Fluorescent indicators for imaging protein fosforylation in single living cells." *Nat Biotechnol.* 20:287-294.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para detectar las BoNT mediante el uso de técnicas de imagenología por resonancia de plasmones de superficie (SPRi). La resonancia de plasmones de superficie (SPR) es una técnica óptica establecida para la detección de la unión molecular, en base a la generación de plasmones superficiales en una película metálica fina (típicamente de oro) que apoya la química de unión. Los plasmones de

superficie son en conjunto oscilaciones de electrones libres restringidos en la película metálica. Estos electrones se excitan por resonancia por un campo de luz incidente de un prisma de índice altamente refractivo. El ángulo de incidencia q sobre el que se produce esta excitación resonante es relativamente estrecho y se caracteriza por una reducción de la intensidad de la luz reflejada que tiene un mínimo en el ángulo resonante de incidencia q_r . La fase de la luz reflejada también varía casi linealmente con respecto a q en esta región. El valor de q_r es sensible al índice de refracción del medio que reside dentro de unos pocos nanómetros de la película metálica. Las pequeñas variaciones en el índice refractivo, debido a la unión de una molécula a la película, o debido al cambio en el peso molecular de las moléculas unidas, pueden además detectarse como una variación de este ángulo. Se conocen muchos métodos en la técnica para el anclaje de biomoléculas a superficies metálicas, para detectar tal anclaje y medir la SPRi se conocen en la técnica, ver por ejemplo patente de Estados Unidos núm. 6,127,129 patente de Estados Unidos núm. 6,330,062, y Lee y otros, 2001, Anal. Chem. 73: 5527-5531, Brockman y otros, 1999, J. Am. Chem. Soc. 121: 8044-8051, y Brockman y otros, 2000, Annu. Rev. Phys. Chem. 51: 41-63, las cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

En la práctica puede depositarse una capa de péptidos objetivo de BoNT sobre el metal. Se aplica una muestra que se sospecha que contiene una BoNT correspondiente a la superficie compuesta y se incuba para permitir que la toxina, si está presente, escinda los péptidos objetivos unidos. La escisión dará como resultado la disminución del peso molecular del péptido unido a la superficie metálica, cuya disminución puede detectarse mediante el uso de equipos y métodos estándar. Una disminución en el grosor de la capa unida indica que se ha producido la escisión y en consecuencia, la muestra contiene la toxina que corresponde al péptido objetivo.

Alternativamente, la unión de una proteína BoNT a su péptido sustrato correspondiente, que se ancla a la superficie metálica, también provocará un cambio en el índice refractivo y puede detectarse mediante técnicas y aparatos de SPRi conocidos.

Se conocen en la técnica muchos métodos para anclar o depositar moléculas proteicas o peptídicas en una superficie metálica. Por ejemplo, puede añadirse un residuo de Cys extra al extremo del péptido, el cual puede reticularse después en la superficie metálica. Indirectamente, un anticuerpo puede anclarse primero a la superficie metálica y a cuyo anticuerpo puede unirse el sustrato de toxina. El anclaje indirecto a través de los anticuerpos es adecuado para la presente invención siempre que la unión del anticuerpo al sustrato no impida que la toxina reconozca y acceda al sitio de escisión del sustrato. Además, puede usarse níquel-NTA o glutatión para mantener las proteínas de fusión his6 o GST, respectivamente. La información adicional con respecto al anclaje de un péptido a la superficie metálica puede encontrarse en Wegner y otros, (2002) Characterization and Optimization of Peptide Arrays for the Study of Pitope-Antibody Interactions Using Surface Plasmon Resonance Imaging" Analytical Chemistry 74:5161-5168, la cual se incorpora además en la presente descripción como referencia en su totalidad.

Los cambios de aproximadamente 10-16 bases en una molécula de ácido nucleico, que corresponde a 3,000 a 6,400 d de peso molecular, pueden detectarse fácilmente mediante SPR1. Esto implica que puede detectarse un cambio de tan solo 16 residuos de aminoácidos en una molécula peptídica. Esta alta sensibilidad permite el anclaje de un sustrato peptídico corto en la superficie, en lugar de usar las proteínas sustrato de toxina de longitud completa. Se prefieren los fragmentos peptídicos cortos porque son más estables, menos costosos de preparar y permiten una mayor especificidad de reacción.

EJEMPLOS (no de acuerdo con la invención)

Materiales y Métodos

Construcción de constructos de ADN biosensores: El ADNc de YFP (Clontech) se insertó en el vector pECFP-C1 (Clontech) mediante el uso de los sitios EcoRI y BamHI para generar el vector pECFP-YFP. El ADNc que codifica los aminoácidos 33-94 de syb II de rata se amplificó mediante el uso de PCR y en el vector pECFP-YFP mediante el uso de los sitios XhoI y EcoRI, que están entre el gen de CFP y YFP, para generar el constructo CFP-SybII-YFP (denominado además como CFP-Syb (33-94)-YFP) que puede usarse para transfectar células. El constructo CFP-SNAP-25-YFP (denominado además CFP-SNAP-25 (141-206)-YFP) se construyó mediante el uso del mismo método, pero mediante el uso de los residuos 141-206 de SNAP-25. También se produjo un constructo (CFP-SNAP25FL-YFP) con la SNAP-25B de rata de longitud completa como el enlazador. Para purificar proteínas quiméricas recombinantes mediante el uso de bacterias E. coli, se movió además el gen de FP-SybII-YFP y el gen de CFP-SNAP-25-YFP del vector pECFP-YFP a un vector pTrc-his (Invitrogen) mediante el uso de los sitios NheI y BamHI.

La mutación de cuatro residuos de Cys de SNAP-25 a Ala se logró mediante mutagénesis dirigida a sitio mediante el uso de PCR, y el fragmento se insertó después entre CFP y YFP como se describió anteriormente. SNAP-25(83-120)-CFP-SNAP-25(141-206)-YFP se construyó primero mediante la inserción del fragmento de ADNc que codifica los residuos 83-120 de SNAP-25 en los sitios XhoI/EcoRI de pEYFP-N1(Clontech), y después mediante la subclonación del ADNc de CFP-SNAP-25(141-206) en los sitios corriente abajo mediante el uso de EcoRI/BamHI. YFP-Syb(FL)-CFP se construyó primero mediante la inserción de un ADNc de Syb II de longitud completa en los vectores pECFP-C1 en los sitios EcoRI y BamHI, y después la inserción de un ADNc de YFP de longitud completa en dirección corriente arriba en los sitios XhoI y EcoRI. YFP-Syb(33-116)-CFP se construyó mediante el reemplazo de Syb de longitud

completa en el constructo YFP-Syb(FL)-CFP a través de los sitios EcoRI/BamHI. Todos los fragmentos de ADNc se generaron a través de PCR.

5 Purificación de proteínas y adquisición de espectros de fluorescencia: Las proteínas CFP-SyblI-YFP y CFP-SNAP-25-YFP con etiqueta de His.sub.6 se purificaron como se describió (Chapman y otros, A novel function for the second C2 domain of synaptotagmin. *Ca.sup.2+-triggered dimerization*. *J. Biol. Chem.* 271, 5844-5849 (1996)). Las proteínas se dializaron mediante el uso del tampón HEPES (HEPES 50 mM, pH 7,1) durante toda la noche. La proteína 300 nM se puso en una cubeta en un volumen total de tampón HEPES 500 .mu.l que contenía DTT 2 mM y ZnCl.sub.2 10 .mu.M. Los espectros de emisión de 450 nM a 550 nM se recolectaron mediante el uso de un fluorómetro PTIQM-1. La longitud de onda de excitación es 434 nM, que es la longitud de onda de excitación óptima para CFP.

15 Activación de la neurotoxina botulínica y el monitoreo de la escisión de las proteínas biosensores: La BoNT/A, B, E o F se incubó con DTT 2 mM y ZnCl.sub.2 10 .mu.M durante 30 min a 37 grados C para reducir la cadena ligera de toxina de la cadena pesada. Para los experimentos que usan un fluorómetro PTIQM-1, se añadió BoNT/A, E 10 nM o BoNT/B, F 50 nM en la cubeta que contenía los sensores FRET correspondientes 300 nM. Los espectros de emisión se recolectaron como se describió anteriormente, a determinados intervalos de tiempo después de añadir las toxinas (por ejemplo 0, 2, 5, 10, 30, 60, 90 min). Al final de cada barrido de emisión, se recolectó una pequeña porción de la muestra (30 .mu.l), se mezcló con tampón de carga de SDS, y después se sometió a un gel de SDS-page. La proteína sensor y los productos de escisión se visualizaron con un anticuerpo anti-his.sub.6 mediante el uso de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (Pierce).

25 Para los experimentos que usan un espectrofluorómetro, se preparó la proteína sensor de FRET 300 nM en un volumen de 100 .mu.l por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadieron diversas concentraciones de las BoNT en cada pocillo y las muestras se excitaron a 434 nM. Los espectros de emisión del canal de YFP (527 nM), y el canal de CFP (470 nM) se recolectaron durante 90 min a intervalos de 30 segundos. La relación de FRET se determina mediante la relación entre el canal de YFP y el canal de CFP para cada punto de datos.

30 Medición del cambio de la relación de FRET en células vivas después del tratamiento con toxinas. Los constructos de ADN pECFP-SNAP25-YFP se usaron para transfectar células PC12 mediante el uso de electroporación (Bio-Rad). Las células se pasaron 24 horas después de la transfección y se añadió BoNT/A 50 nM en el medio de cultivo. Después de la incubación durante 72 horas con toxina, las imágenes de fluorescencia de las células que expresan el sensor de FRET se recolectaron mediante el uso de un microscopio TE-300 de Nikon. Se recolectaron dos imágenes de cada célula (canal de CFP y canal de FRET) mediante el uso del siguiente conjunto de filtros (Chroma Inc.): canal de CFP: filtro de excitación para CFP (436/10 nm), divisor de haces JP4, filtro de emisión para CFP: (470/30 nm); canal de FRET: filtro de excitación para CFP (436/10 nm), divisor de haces JP4, filtro de emisión para YFP (535/30 nm). Se sustrajo el fondo (el área que no contiene células) de cada imagen y las intensidades de fluorescencia del canal de CFP y del canal de FRET de cada célula se compararon mediante el uso del software MetaMorph. La relación de FRET se determina mediante la relación de intensidad entre el canal de FRET y el canal de CFP como se describió anteriormente. Las células de control no se trataron con toxinas pero se analizaron de una manera idéntica. Para analizar BoNT/B en células vivas, se transfectó una línea de células PC12 que expresaban syt II mediante el uso del mismo procedimiento como se describió anteriormente.

45 Imagenología de células vivas y análisis de FRET: Las células PC12 se transfectaron con diversos constructos de ADNc indicados en las leyendas de la Figura a través de electroporación (Bio-Rad, CA). Las imágenes de fluorescencia se recolectaron mediante el uso de un microscopio TE-300 de Nikon con un objetivo inmerso en aceite de 100 veces. La FRET entre CFP/YFP en células vivas se cuantificó mediante el uso de un método establecido con el método de conjunto de tres filtros (Gordon y otros, Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J.* 74, 2702-2713 (1998); Sorkin y otros, Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Curr. Biol.* 10, 1395-1398 (2000)). En resumen, se adquirieron tres imágenes consecutivas para cada célula, mediante los conjuntos de tres filtros diferentes: Filtro para CFP (excitación, 436/10 nm; emisión, 470/30 nm), filtro para FRET (excitación, 436/10 nm; emisión, 535/30 nm), y filtro para YFP (excitación, 500/20 nm, emisión, 535/30 nm). Se usó un divisor de haces JP4 (Set ID 86000, Chroma Inc. VT). Todas las imágenes se adquirieron con las mismas configuraciones (Agrupamiento 4.veces.4, tiempo de exposición 200 ms). Para excluir la señal FRET dependiente de concentración que puede surgir del alto nivel de expresión de proteínas fluorescentes, solo se contaron en los experimentos células con intensidades de CFP y de YFP por debajo del valor medio de la escala máxima de 12-bit (1-2097 escala de grises) (Miyawaki y otros, Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol.* 327, 472-500 (2000); Erickson y otros, DsRed as a potential FRET partner with CFP and GFP. *Biophys J* 85, 599-611 (2003)). Se sustrajo el fondo (de las áreas que no contenían células) de cada imagen sin procesar antes de que se calcularan los valores de FRET. Después se obtuvieron y compararon los valores de intensidad de fluorescencia de cada imagen. Las células PC 12 transfectadas con CFP o YFP solo se probaron primero para obtener el valor de interferencia para estos conjuntos de filtros. El canal de filtro FRET exhibe aproximadamente 56-64 % de fuga para CFP y aproximadamente 24 % para YFP. Prácticamente no existe interferencia para YFP mientras se usa el filtro de CFP, o para CFP mientras se usa el filtro de YFP, lo que simplifica en gran medida los cálculos de FRET. Para las células que expresan sensores de toxinas, el valor de "FRET corregida" se calculó mediante el uso de la siguiente ecuación: $FRET\ corregida = FRET - (CFP.veces.0,60) - (YFP.veces.0,24)$,

donde FRET, CFP y YFP corresponden a la intensidad de fluorescencia de las imágenes adquiridas mediante los conjuntos de filtro para FRET, CFP e YFP, respectivamente. La fracción promedio de fuga que proviene de la fluorescencia de CFP e YFP son 0,6 y 0,24, respectivamente, cuando se adquiere la imagen mediante el conjunto de filtros para FRET. Debido a que la escisión por toxinas del sensor CFP-SNAP25FL-YFP dio como resultado la disociación de la membrana del fragmento de YFP, el cual se degradó en el citosol (Figura 7c, e), la relación de FRET usada en los análisis de datos se calcula como la normalización del valor de "FRET corregida" solo para la intensidad de fluorescencia de CFP (FRET corregida/CFP). Se notó que la intensidad de CFP en estos cálculos fue una subestimación debido a la inactivación del donante si se produce la FRET. Sin embargo, se ha informado que la disminución de la fluorescencia de CFP debido a la inactivación del donante es solo de aproximadamente 5-10 % (Gordon y otros, Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. Biophys J 74, 2702-2713 (1998); Sorkina y otros, Oligomerization of dopamine transporters visualized in living cells by fluorescence resonance energy transfer microscopy. J. Biol. Chem. 278, 28274-28283 (2003)). Todas las imágenes y cálculos se realizaron mediante el uso del software MetaMorph (Universal Imaging Corp., PA).

Para los experimentos que implican el tratamiento con toxinas, las holotoxinas se añadieron al medio de cultivo celular durante varias veces y las células se analizaron después como se describió anteriormente. Las células de control se transfectaron con sensores de toxinas pero no se trataron con toxinas y se analizaron de una manera idéntica.

Análisis por inmunotransferencia de la escisión de sustratos por toxinas: Las células PC12 de tipo silvestre o células Syt II+PC12 (Dong y otros, 2003, más arriba) se transfectaron con diversos constructos de ADNc sensores de toxina como se indica en las leyendas de la Figura. Se añadió BoNT/A o B al medio de cultivo 24 h después de la transfección y las células se incubaron durante otras 48 horas. Después las células se cosecharon y los lisados celulares se sometieron a análisis de inmunotransferencia como se describió anteriormente. Las células de control se transfectaron con los mismos constructos de ADNc y se analizaron en paralelo excepto que no se trataron con toxinas. Un tercio de los lisados celulares de control se trataron con toxinas in vitro (BoNT/A o B 200 nM, 30 min a 37 grados C) y se sometieron a análisis de inmunotransferencia. La SNAP-25 endógena y los sensores CFP-SNAP-25-YFP transfectados se analizaron mediante el uso de un anticuerpo anti-SNAP-25. Las proteínas sensoras CFP-SNAP-25-YFP y CFP-SybII-YFP se analizaron además mediante el uso de un anticuerpo policlonal contra GFP (Santa Cruz., CA). Se usó un anticuerpo anti-his6 (Qigen Inc., CA) para analizar la escisión de las proteínas sensoras recombinantes.

Ejemplo 1: Biosensores basados en el par de FRET CFP-YFP y actividad proteasa de las neurotoxinas botulínicas

Para monitorear la actividad proteasa de la neurotoxina botulínica mediante el uso del método de FRET, las proteínas CFP y YFP se conectan a través de un fragmento de syb II o SNAP-25, indicado como CFP-SybII-YFP y CFP-SNAP-25-YFP, respectivamente (Figura 1A). Se usaron los fragmentos cortos de sustratos de toxinas en lugar de la proteína de longitud completa para optimizar la eficiencia de transferencia de energía de CFP-YFP, que disminuye exponencialmente a medida que aumenta la distancia. Sin embargo, la eficiencia de escisión por BoNT disminuye significativamente a medida que los fragmentos de la proteína objetivo se hacen más cortos. Además, se usó la región que contenía los aminoácidos 33-96 de la secuencia de sinaptobrevina porque se ha informado que esta conserva la misma tasa de escisión por BoNT/B, F y TeNT como lo hace la proteína sinaptobrevina de longitud completa. De manera similar, se seleccionaron los residuos 141-206 de SNAP-25 para asegurar que el constructo aún puede ser reconocido y escindido por BoNT/A y E.

El ensayo de FRET se representa en la Figura 1B. Cuando se excita a 434 nM (longitud de onda de excitación óptima para CFP), las proteínas quiméricas CFP-SybII-YFP y CFP-SNAP-25-YFP podrían provocar la emisión de fluorescencia de YFP debido a la FRET entre el par CFP-YFP. Las neurotoxinas botulínicas pueden reconocer y escindir los fragmentos de sustrato cortos entre CFP y YFP, y la señal FRET se anulará después que CFP y YFP se separan. Debido a que estas proteínas quiméricas pueden expresarse en células vivas, pueden indicarse además como "biosensores" para neurotoxinas botulínicas.

Se purificó primero la proteína quimérica recombinante con etiqueta de his.sub.6 de CFP-SybII-YFP y CFP-SNAP-25-YFP y se caracterizó su espectro de emisión mediante el uso del fluorómetro PTIQM-1. Como se esperaba, ambas proteínas biosensores muestran un máximo fluorescencia de YFP obvio a 525 nM cuando sus CFP se excitaron a 434 nM (Figura 2B, C). Por el contrario, la YFP sola produjo solo una pequeña señal de fluorescencia cuando se excitó directamente a 434 nM (Figura 2A). La mezcla de CFP y YFP individuales no tiene el máximo de emisión a 525 nM (Figura 2A). Esto demuestra que el máximo de fluorescencia de YFP observado mediante el uso de las proteínas biosensores resultó de FRET. Debido a que la relación de FRET (intensidad de fluorescencia de YFP/intensidad de fluorescencia de CFP) se afectó por muchos factores, tales como la composición del tampón, la concentración de Zn.sup.2+ y la concentración de agentes reductores (datos no mostrados), todos los experimentos posteriores se llevaron a cabo en las mismas condiciones de tampón (Hepes 50 nM, DTT 2 mM, ZnCl.sub.2 10 .mu.M, pH 7,1). Se añadieron DTT 2 mM y Zn.sup.2+ 10 .mu.M para optimizar la actividad proteasa de la neurotoxina botulínica.

Ejemplo 2: Monitoreo de la escisión de proteínas biosensores por las neurotoxinas botulínicas in vitro

Se mezcló la proteína quimérica CFP-SybII-YFP 300 nM con la holotoxina BoNT/B reducida previamente 50 nM en una cubeta. Los espectros de emisión se recolectaron en diferentes puntos de tiempo después de añadir BoNT/B (0,

2, 5, 10, 30, 60 min, etc). Al final de cada barrido, se tomó un pequeño volumen de muestra (30 μ l) de la cubeta y se mezcló con tampón de carga de SDS. Estas muestras se sometieron después a geles de SDS-page y la escisión de proteínas quiméricas se visualizó mediante el uso de un anticuerpo contra la etiqueta de his.sub.6 en la proteína quimérica recombinante. Como se muestra en la Figura 3A, la incubación de la proteína biosensor con BoNT/B dio como resultado una disminución de la emisión de YFP y un aumento de la emisión de CFP. La disminución de la relación de FRET es consistente con el grado de escisión de la proteína quimérica por BoNT/B (Figura 3A, panel bajo). Este resultado demuestra que la escisión de la proteína biosensor puede monitorearse en tiempo real mediante el registro del cambio en su relación de FRET.

El mismo ensayo se realizó para detectar la escisión de CFP-SybII-YFP por BoNT/F y la escisión de CFP-SNAP-25-YFP por BoNT/A o E (Figura 3B, C, D). Se obtuvieron resultados similares con el experimento mediante el uso de BoNT/B. En todos los casos, se observaron las mismas cinéticas de escisión del sustrato mediante el uso de la lectura óptica y el análisis de inmunotransferencia. BoNT/A y E escindieron sus sustratos quiméricos mucho más rápido que BoNT/B y F en el ensayo. Por lo tanto, se usaron solo BoNT/A o E 10 nM para registrar el cambio producido en los primeros minutos. La escisión de la proteína quimérica es específica, ya que la mezcla de BoNT/B y F con CFP-SNAP-25-YFP, o la mezcla de BoNT/A y E con CFP-SybII-YFP no dio como resultado ningún cambio en la relación de FRET o la escisión del sustrato (datos no mostrados).

Ejemplo 3: Monitoreo de la actividad proteasa de la neurotoxina botulínica en tiempo real mediante el uso de un espectrofluorómetro de microplacas

Los experimentos anteriores demuestran que la actividad de la neurotoxina botulínica puede detectarse in vitro mediante el monitoreo de los cambios de los espectros de emisión de sus proteínas biosensores objetivo. Después se determinó si puede monitorearse la escisión de las proteínas biosensores en tiempo real mediante el uso de un lector de microplacas--esto demostrará la facilidad de adaptar este ensayo para el futuro tamizaje de alto rendimiento. Como se muestra en la Figura 4A, se mezcló la proteína quimérica CFP-SNAP-25-YFP 300 nM con BoNT/A 10 nM en una placa de 96 pocillos. CFP se excitó a 436 nm y se registró la fluorescencia del canal de CFP (470 nm) y del canal de YFP (527 nm) durante 90 min a intervalos de 30 segundos. La adición de BoNT/A dio como resultado la disminución de la emisión del canal de YFP y el aumento de la emisión del canal de CFP. Este resultado permitió rastrear la cinética de la actividad enzimática de la neurotoxina botulínica en múltiples muestras en tiempo real. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 4B, se añadieron diversas concentraciones de BoNT/A o E en CFP-SNAP-25-YFP 300 nM y la relación de FRET de cada muestra se monitoreó simultáneamente como se describió en la Figura 4A. Los cambios en la relación de FRET se relacionaron con la concentración de toxina--una mayor concentración de toxina dio como resultado una disminución más rápida de la relación de FRET. Este cambio en la relación de FRET es específico, porque no se detectó un cambio significativo ya sea para CFP-SNAP-25-YFP solo (Figura 4C panel izquierdo) o para una mezcla de CFP y YFP (Figura 4C panel derecho).

Aunque podría ser difícil correlacionar el cambio de la relación de FRET con la escisión real de las proteínas biosensores en esta etapa, ese método aún proporciona la vía más fácil de comparar las cinéticas de escisión de toxinas entre múltiples muestras cuando estas muestras se prepararon y se sometieron a barrido simultáneamente--esto es particularmente útil para el tamizaje de alto rendimiento de inhibidores de toxina porque podría proporcionar información sobre cómo el inhibidor afecta las actividades enzimáticas de las toxinas. Se notó que la unidad para cada parámetro cinético podría ser la relación de FRET en lugar de la concentración de sustratos en estos casos.

La sensibilidad de este ensayo basado en FRET se determina mediante la incubación de diversas concentraciones de toxinas con la cantidad fijada de sus proteínas biosensores objetivo durante determinado periodo de tiempo. La relación de FRET se registra mediante el uso de un espectrofluorómetro de microplacas y se grafica en función de la concentración de toxinas. Como se muestra en la Figura 5A, este método tiene sensibilidades similares para BoNT/A y E después de 4 horas de incubación (EC50 para BoNT/A es 15 pM y para BoNT/E es 20 pM, panel superior), y la incubación durante 16 horas aumenta ligeramente la sensibilidad de detección (Figura 5A, panel inferior). Las sensibilidades para BoNT/B y F son cercanas entre sí, pero son aproximadamente 10 veces menores que para BoNT/A y E con 4 horas de incubación (Figura 5B, panel superior, EC50 es 242 pM para BoNT/B y 207 pM para BoNT/F). La extensión del periodo de incubación a 16 horas aumenta la capacidad de detectar la actividad de BoNT/F y de BoNT/B en 8-veces y 2-veces, respectivamente.

Ejemplo 4: Monitoreo de la actividad de neurotoxinas botulínicas en células vivas

El ensayo de biosensores basado en CFP-YFP no solo puede usarse para detectar una neurotoxina botulínica in vitro, sino que puede usarse además en células vivas. Para establecer esta aplicación, las células PC 12 se transfectaron con CFP-SNAP-25-YFP. La célula PC12 es una línea celular neuroendocrina que es capaz de captar BoNT/A y E. Las células transfectadas se incubaron con BoNT/A (50 nM) durante 72 horas y la relación de FRET de las células que expresaron CFP-SNAP25-YFP se registró mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia equipado con conjuntos de filtro especiales para la detección de FRET entre CFP-YFP. En resumen, la relación de FRET se calcula como la relación entre la intensidad de fluorescencia de las imágenes de la misma célula recolectada mediante el uso de dos conjuntos de filtros, uno para CFP (excitación 437 nm/emisión 470 nm), y otro para FRET (excitación 437 nm/emisión 535 nm). Se recolectó un número total de 53 células y se comparó con el mismo número de células de

control que expresaban la misma proteína biosensor pero no se expusieron a la toxina. Como se muestra en la Figura 6A, el tratamiento con BoNT/A durante 72 horas disminuyó significativamente la relación de FRET para la población celular que se examinó ($p < 1,47E-05$). Las células PC12 de tipo silvestre no son sensibles a BoNT/B y F.

5 Se creó recientemente una línea de células PC 12 que expresan sinaptotagmina II, un receptor para BoNT/B y un biosensor CFP-SyBII-YFP. Estas células se usaron para detectar la acción de BoNT/B en células vivas. Como se muestra en la Figura 6B, el tratamiento con BoNT/B (30 nM) durante 72 horas disminuyó significativamente la relación de FRET de las proteínas biosensores expresadas en las células ($p < 2,1E-10$). Se notó que aún había un gran número de células que no parecen cambiar la relación de FRET para ambas proteínas biosensores. Existen varias explicaciones posibles. Primero, la relación toxina/proteína biosensor puede ser muy baja en estas células, por lo tanto, la escisión significativa de las proteínas biosensores puede requerir un tiempo de incubación más largo. Segundo, estas células pueden tener un alto nivel de actividad de síntesis de proteína, por lo tanto la nueva proteína biosensor se sintetizó rápidamente para reemplazar los productos de escisión. Sin embargo, estos experimentos demuestran la viabilidad de adoptar este ensayo basado en FRET en células vivas y neuronas.

15 Ejemplo 5: Detección de las BoNT basada en células

Para llevar a cabo los estudios basados en células, primero se transfectaron las células PC12 con el sensor CFP-SNAP-25(141-206)-YFP (Figura 7a). La señal FRET en células vivas se adquirió mediante el uso de un método establecido de conjunto de tres filtros con un microscopio de epifluorescencia como se muestra en la Figura 2a (Gordon, y otros, Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 74, 2702-2713 (1998); y Sorkin y otros, Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Curr. Biol.* 10, 1395-1398 (2000), como se describió anteriormente en la Sección de Materiales y Métodos. Las células PC12 transfectadas se trataron con BoNT/A 50 nM durante 96 horas. Se analizaron las imágenes de fluorescencia y la relación de FRET normalizada (FRET corregida/CFP) se graficó en la Figura 7b. Aunque se informó que los fragmentos de SNAP-25(141-206) tienen similares tasas de escisión por toxinas que SNAP-25 de longitud completa in vitro (Washbourne y otros, Botulinum neurotoxin types A and E require the SNARE motif in SNAP-25 for proteolysis. *FEBS Lett.* 418, 1-5 (1997)), CFP-SNAP-25(141-206)-YFP parece ser un pobre sustrato de toxinas en células vivas. La incubación de BoNT/A (50 nM) durante 96 horas exhibió un pequeño desplazamiento (pero significativo) de la relación de FRET entre la población celular, lo que indica que la escisión es ineficiente en las células, y este sensor no es práctico para la detección de toxinas en las células.

Sorprendentemente, se encontró que mediante el uso de SNAP-25 de longitud completa como el enlazador entre CFP y YFP rindió niveles significativos de FRET cuando se expresó en células PC 12, a pesar del hecho de que SNAP-25 tiene una longitud de 206 residuos de aminoácidos (Figura 7c y 8c). Esta señal FRET es dependiente del anclaje a membrana de SNAP-25 ya que la mutación de los sitios de palmitoilación dentro del SNAP-25 (Cys 85, 88, 90, 92 Ala) (Lane & Liu, Characterization of the palmitoylation domain of SNAP-25. *J. Neurochem.* 69, 1864-1869 (1997); Gonzalo y otros, SNAP-25 is targeted to the plasma membrane through a novel membrane-binding domain. *J. Biol. Chem.* 274, 21313-21318 (1999); Koticha y otros, Plasma membrane targeting of SNAP-25 increases its local concentration and is necessary for SNARE complex formation and regulated exocytosis. *J. Cell Sci.* 115, 3341-3351 (2002); Gonelle-Gispert y otros, Membrane localization and biological activity of SNAP-25 cysteine mutants in insulin-secreting cells. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 18), 3197-3205 (2000)), que da como resultado la distribución citosólica de la proteína (indicada como CFP-SNAP-25(Cys-Ala)-YFP), reduce significativamente la señal FRET (Figura 7d). Este hallazgo sugiere que el anclaje a membrana de SNAP-25 puede dar como resultado los cambios conformacionales que acercan los extremos N-terminal y C-terminal de SNAP-25 entre sí. Este sensor se indica como CFP-SNAP-25(FL)-YFP. La incubación de células que expresan CFP-SNAP-25(FL)-YFP con BoNT/A 50 nM dio como resultado una disminución progresiva de la relación de FRET en el tiempo (Figura 7c, panel derecho). La escisión por BoNT/A del sensor dio como resultado dos fragmentos: un fragmento N-terminal de SNAP-25 etiquetado con CFP que permaneció en la membrana (Figura 2c, panel del medio) y un fragmento C-terminal corto de SNAP-25 etiquetado con YFP que se esperó que se redistribuyera en el citosol después de la escisión por toxinas. De manera interesante, se notó que el producto de escisión C-terminal, SNAP-25(198-206)-YFP, desapareció en gran medida después de la escisión por toxinas (Figura 2c, el recuadro "YFP" en el panel del medio). Esta observación se confirmó mediante el análisis de inmunotransferencia (Figura 7e), lo que indica que este fragmento soluble se degradó mucho más rápido que el otro fragmento que se mantiene en la membrana. Este resultado inesperado proporciona una vía alternativa para detectar la actividad de toxinas en células vivas simplemente mediante el monitoreo de la relación entre la fluorescencia de CFP y YFP.

Se informó recientemente que la cadena ligera de BoNT/A contiene las señales de localización en membrana y se dirige a la membrana plasmática en células PC 12 diferenciadas (Fernandez-Salas y otros, Plasma membrane localization signals in the light chain of botulinum neurotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 3208-3213 (2004). Por lo tanto, se investigó la posibilidad de que el anclaje a membrana de SNAP-25 sea crítico para la escisión eficiente por BoNT/A. Para analizar directamente esta idea, CFP-SNAP-25(Cys-Ala)-YFP, que se distribuyó en el citosol (Figura 7d) y CFP-SNAP-25(FL)-YFP, que se ancló a la membrana plasmática, se usaron para transfectar las células PC 12 y se analizaron en paralelo para la escisión por BoNT/A en las células. Como se indica en la Figura 7e, la incubación de células con BoNT/A dio como resultado la escisión de una cantidad significativa del sensor CFP-SNAP-25(FL)-

YFP, mientras que no hubo escisión detectable de CFP-SNAP-25 (Cys-Ala)-YFP bajo las mismas condiciones de ensayo.

Para confirmar más aun este hallazgo, se dirigió el sensor ineficiente que contenía SNAP-25(141-206) a la membrana plasmática mediante el uso de un fragmento corto de SNAP-25 (residuos 83-120, los que también dirigen a GFP a las membranas plasmáticas (Gonzalo y otros, SNAP-25 is targeted to the plasma membrane through a novel membrane-binding domain. *J. Biol. Chem.* 274, 21313-21318 (1999)) (Figura 8a). Como se esperaba, el anclaje del sensor CFP-SNAP-25(141-206)-YFP a la membrana plasmática dio como resultado la escisión eficiente por BoNT/A (Figura 8b). Estos hallazgos indican que la localización subcelular de SNAP-25 es de hecho crítica para la escisión eficiente por BoNT/A en las células.

Después se analizó si el sensor CFP-Syb(33-94)-YFP podría usarse para analizar la actividad de BoNT/B en las células. Para estos estudios, se usó una línea de células PC12 que expresan sinaptotagmina II, que media la entrada de BoNT/B en las células (Dong y otros Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell Biol.* 162, 1293-1303 (2003)). Como se muestra en la Figura 9a (panel superior), el CFP-Syb(33-94)-YFP transfectado es una proteína soluble presente en todas las células. Similar al caso de CFP-SNAP-25(141-206)-YFP, (50 nM, 96 horas) el tratamiento con BoNT/B solo disminuyó ligeramente la relación de FRET (Figura 9a, panel inferior), lo que indica que la escisión de este sensor también es ineficiente en las células.

La experiencia con el sensor de BoNT/A llevó a investigar si la localización subcelular de Syb es importante para la escisión de Syb por BoNT/B. La Syb endógena tiene una longitud de 116 residuos de aminoácidos y reside en las vesículas secretoras mediante un dominio transmembrana único (residuos 95-116, Figura 9b). Para asegurar la localización vesicular apropiada, se usó la Syb de longitud completa como el enlazador entre CFP y YFP. Debido a que CFP es relativamente resistente al ambiente ácido en el lumen de la vesícula (Tsien, *The green fluorescent protein*. *Annu. Rev Biochem* 67, 509-544 (1998)), la CFP se fusionó al extremo C-terminal de Syb y se predice que reside dentro de las vesículas, mientras que la YFP se fusionó al extremo N-terminal de Syb y en orientación al citosol (Figura 9b). Este sensor se indica como YFP-Syb(FL)-CFP. Ya que es improbable que se produzca FRET entre CFP y YFP aquí, se ha tomado en cuenta un nuevo enfoque para monitorear la escisión por BoNT/B. La escisión del sensor YFP-Syb(FL)-CFP podría generar dos fragmentos, incluida una porción N-terminal etiquetada con YFP, que podría liberarse en el citosol y una porción C-terminal etiquetada con CFP que está restringida dentro de las vesículas. Por lo tanto, la actividad de toxinas podría dar como resultado la redistribución de la fluorescencia de YFP en las células. Se demostró que YFP-Syb(FL)-CFP es un sensor de toxinas eficiente en las células. Como se indica en la Figura 9c, el tratamiento con BoNT/B dio como resultado la disociación de YFP de las vesículas y su redistribución en el citosol. Se notó que el fragmento de YFP soluble fue capaz de entrar al núcleo, donde no había señal de fluorescencia antes del tratamiento con toxinas (Figura 9c), lo que proporciona un área donde la redistribución de YFP puede detectarse fácilmente. A diferencia del ensayo FRET, este método de detección no requiere de una corta distancia entre CFP y YFP, lo que proporciona por lo tanto un nuevo enfoque para monitorear la actividad proteasa en células vivas.

Para excluir la posibilidad de que la escisión ineficiente del sensor que contiene el fragmento de Syb(33-94) se deba a la pérdida de los 32 aminoácidos del extremo N-terminal, se construyó un sensor que contenía la forma truncada de Syb que carece de los 32 residuos del extremo N-terminal (indicado como CFP-Syb(33-116)-YFP). Este sensor contiene el mismo dominio citosólico de Syb con el sensor ineficiente (residuos 33-94), más el dominio transmembrana (residuos 95-116), que se ancla a las vesículas. Cuando se analizó en paralelo, se escindió una cantidad significativa de CFP-Syb(33-116)-YFP por BoNT/B después de 48 horas, mientras que no hubo escisión detectable de CFP-Syb(33-94)-YFP (Figura 9d), lo que indica que la localización vesicular determina la eficiencia de escisión en las células. Esta conclusión es apoyada además por un informe reciente de que la presencia de mezclas de lípidos negativamente cargados mejora la tasa de escisión de Syb por BoNT/B, TeNT y BoNT/F in vitro (Caccin y otros, VAMP/synaptobrevin cleavage by tetanus and botulinum neurotoxins is strongly enhanced by acidic liposomes. *FEBS Lett.* 542, 132-136 (2003)). Es posible que las toxinas puedan favorecer la unión a membranas vesiculares en las células, lo que aumenta por lo tanto la posibilidad de encontrar Syb localizada en las vesículas. Alternativamente, es posible además que la presencia del dominio transmembrana pueda ser crítica para mantener un estado conformacional apropiado de Syb que se requiere para la escisión eficiente.

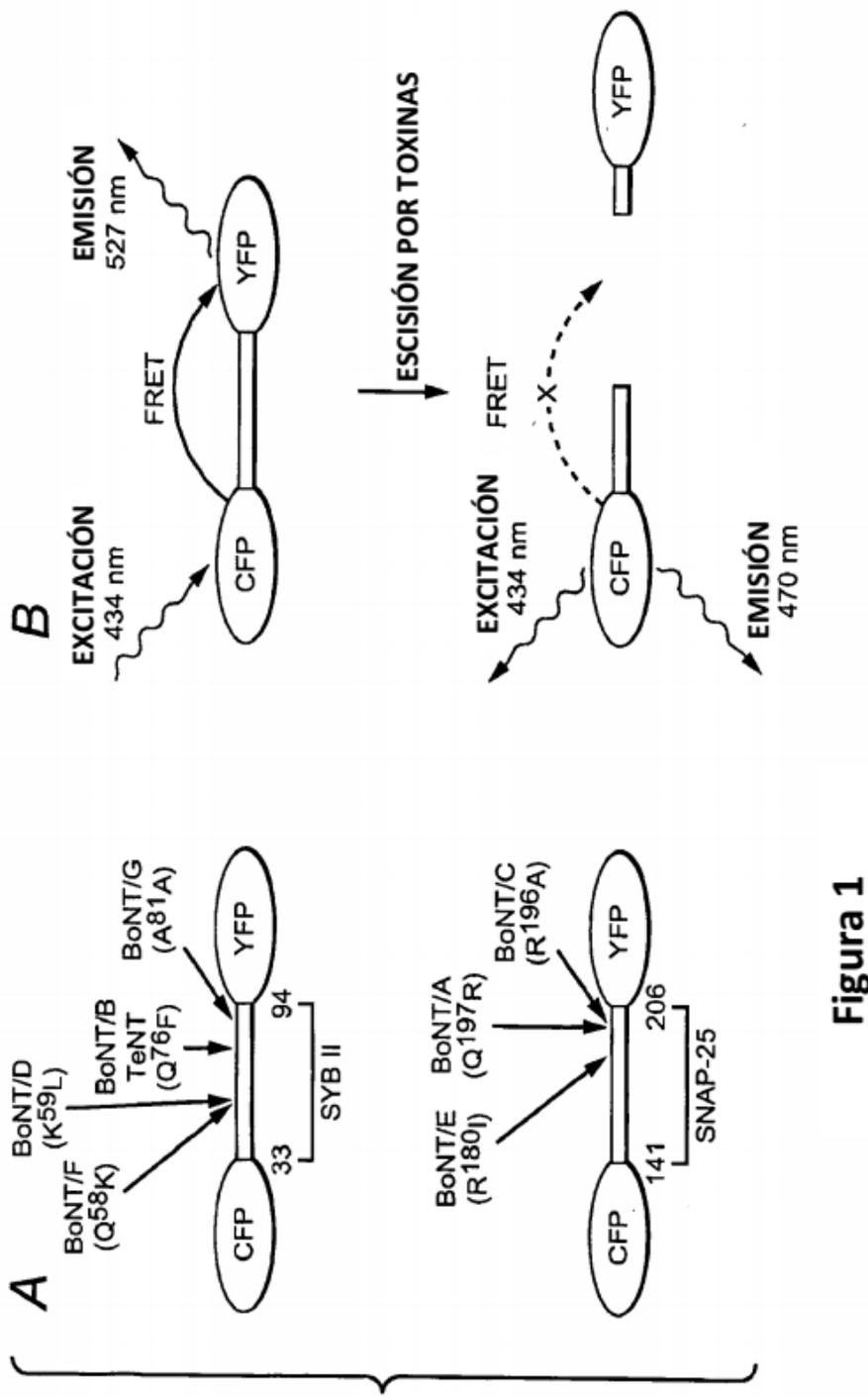
El uso de SNAP-25 y Syb II de longitud completa como los enlazadores proporcionó excelentes reporteros ópticos que pueden reflejar la escisión de sustratos endógenos en células vivas. Estos dos reporteros podrían ser capaces de detectar las siete neurotoxinas botulínicas y la neurotoxina de tétano (TeNT). La secuencia enlazadora de sustrato puede modificarse fácilmente para lograr la detección específica de BoNT o TeNT individual cambiando la longitud o mutando otros sitios de escisión o reconocimiento por toxinas. Estos biosensores de toxinas podrían permitir el tamizaje basado en células de inhibidores de toxinas, y el estudio de reconocimiento y escisión de sustratos por toxinas en las células.

La descripción y los ejemplos anteriores se han expuesto simplemente para ilustrar la invención y no pretenden ser limitantes. Ya que los expertos en la técnica pueden producir modificaciones de las modalidades descritas que incorporan el espíritu y la sustancia de la invención, debe interpretarse que la invención en términos generales incluye todas las variaciones que caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de estos. Todas las referencias mencionadas y/o enumeradas anteriormente se incorporan a continuación expresamente como referencia.

Debería ser evidente para los expertos en la técnica que son posibles muchas más modificaciones además de las ya descritas sin apartarse de los conceptos de la invención en la presente descripción. El objeto de la invención, además, no debe restringirse excepto en el espíritu de las reivindicaciones adjuntas. Además, en la interpretación tanto de la descripción como de las reivindicaciones, todos los términos deben interpretarse de la manera más amplia posible y coherente con el contexto. En particular, los términos "comprende" y "que comprende" deberían interpretarse como que se refieren a elementos, componentes o etapas de manera no exclusiva, lo que indica que los elementos, componentes o etapas a los que se hace referencia pueden estar presentes, o utilizarse o combinarse con otros elementos, componentes o etapas a los que no se hace referencia expresamente. Cuando las reivindicaciones de la descripción se refieran a al menos uno de algo seleccionado del grupo que consiste en A, B, C y N, el texto debería interpretarse como que requiere solo un elemento del grupo, no A más N, o B más N, etc.

REIVINDICACIONES

1. Un constructo que tiene:
 5 una etiqueta donante y una etiqueta aceptora colocadas para proporcionar un acoplamiento electrónico de manera que el donante pueda transferir energía al aceptor mediante un mecanismo de acoplamiento dipolo-dipolo;
 un enlazador dispuesto entre el donante y el aceptor, en donde el enlazador comprende
 una secuencia del sitio de escisión seleccionada del grupo que consiste en una proteína SNARE, un motivo SNARE y una muteína SNARE, en donde la secuencia del sitio de escisión incluye un sitio de escisión,
 10 un primer espaciador colocado entre el donante y la secuencia del sitio de escisión, en donde el primer espaciador comprende una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en (GGGS)_n y (EAAAK)_n, donde n es 1 a 3, y
 un segundo espaciador colocado entre el aceptor y la secuencia del sitio de escisión, en donde el segundo espaciador comprende una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en (GGGS)_n y (EAAAK)_n, donde n es 1 a 3,
 15 en donde los espaciadores primero y segundo proporcionan un aumento del acoplamiento electrónico entre la etiqueta donante y la etiqueta aceptora en relación con un constructo correspondiente sin los espaciadores primero y segundo.
- 20 2. El constructo de conformidad con la reivindicación 1, en donde al menos uno del donante y el aceptor es al menos uno de un fluoróforo y un cromóforo, y preferentemente en donde el mecanismo de acoplamiento dipolo-dipolo es una transferencia de energía por resonancia de Forster (FRET).
- 25 3. El constructo de conformidad con la reivindicación 1, en donde el enlazador tiene una longitud de la estructura primaria ≥ 10 nm.
4. El constructo de conformidad con la reivindicación 1, en donde el enlazador tiene una longitud de la estructura primaria ≥ 12 nm.
- 30 5. Un constructo que tiene:
 una etiqueta donante y una etiqueta aceptora colocada para proporcionar un acoplamiento electrónico de manera que el donante pueda transferir energía al aceptor mediante un mecanismo de acoplamiento dipolo-dipolo, en donde el donante es la proteína fluorescente ciano (CFP) y el aceptor es la proteína fluorescente amarilla (YFP);
 35 un enlazador dispuesto entre el donante y el aceptor, en donde el enlazador es SNAP-25 o sinaptobrevina, un primer espaciador colocado entre el donante y la secuencia del sitio de escisión, en donde el primer espaciador es una secuencia peptídica (SGLRSRA), y
 un segundo espaciador colocado entre el aceptor y la secuencia del sitio de escisión, en donde el segundo espaciador es un péptido (SNS),
 40 de manera que el constructo se selecciona del grupo que consiste en CFP-(SGLRSRA)-SNAP-25-(SNS)-YFP y CFP-(SGLRSRA)-sinaptobrevina-(SNS)-YFP,
 en donde los espaciadores primero y segundo proporcionan un aumento del acoplamiento electrónico entre la etiqueta donante y la etiqueta aceptora en relación con un constructo correspondiente sin los espaciadores primero y segundo.
- 45 6. Un método para detectar una neurotoxina botulínica, el método que comprende,
 a) proporcionar un constructo de conformidad con la reivindicación 1 o de conformidad con la reivindicación 5,
 b) exponer el constructo a una muestra que se sospecha que contiene la neurotoxina botulínica en una condición en la cual la neurotoxina botulínica escinde la proteína sustrato o el fragmento de esta, y
 50 c) detectar y comparar una señal FRET antes y después de que el constructo se exponga a la muestra, en donde una disminución de FRET indica la presencia de la neurotoxina botulínica en la muestra.



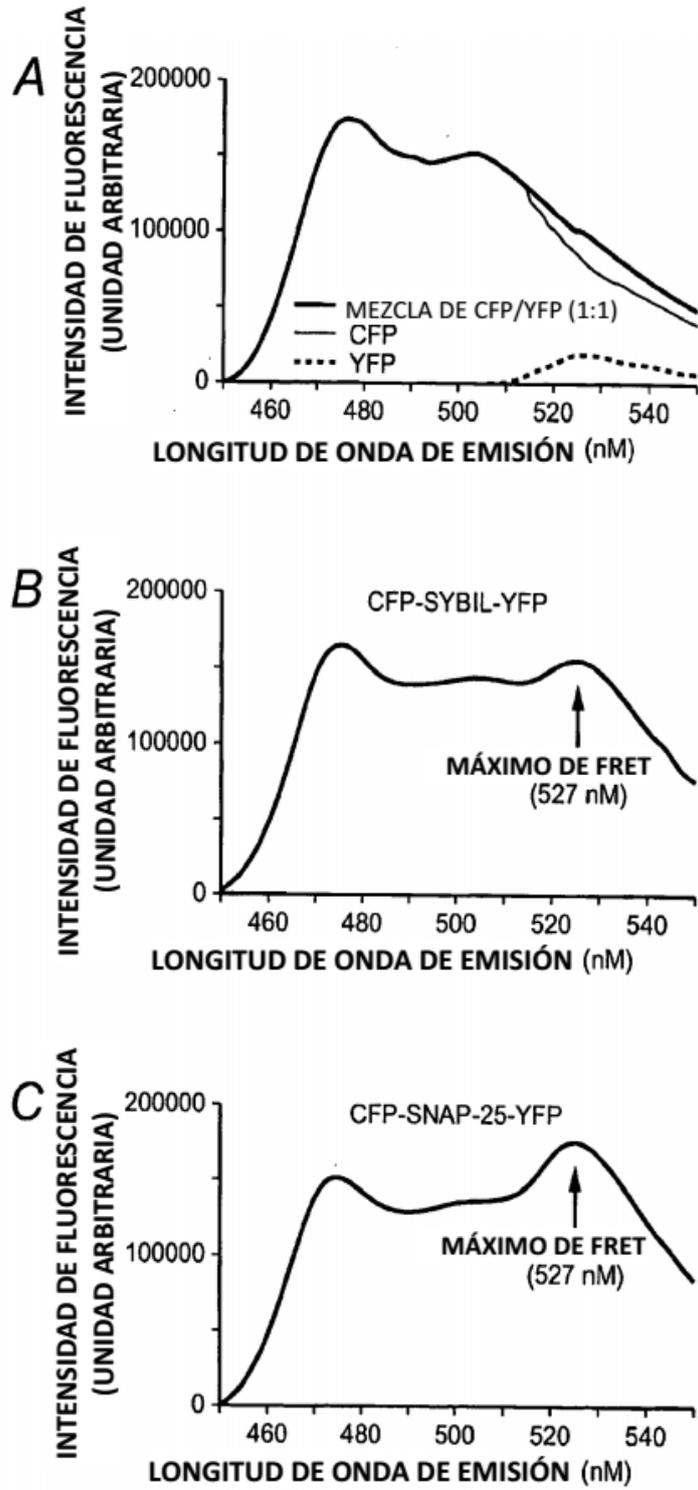


Figura 2

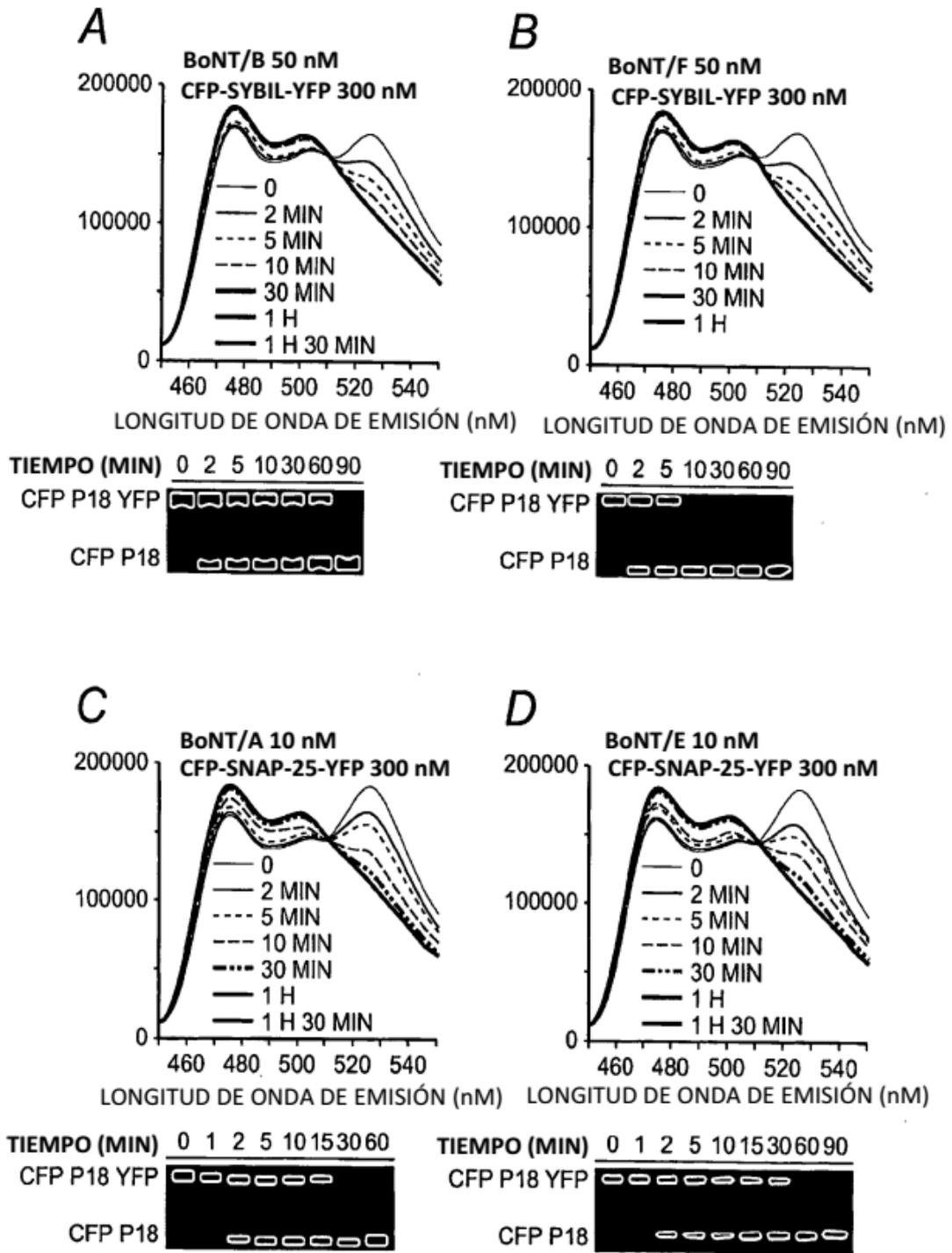


Figura 3

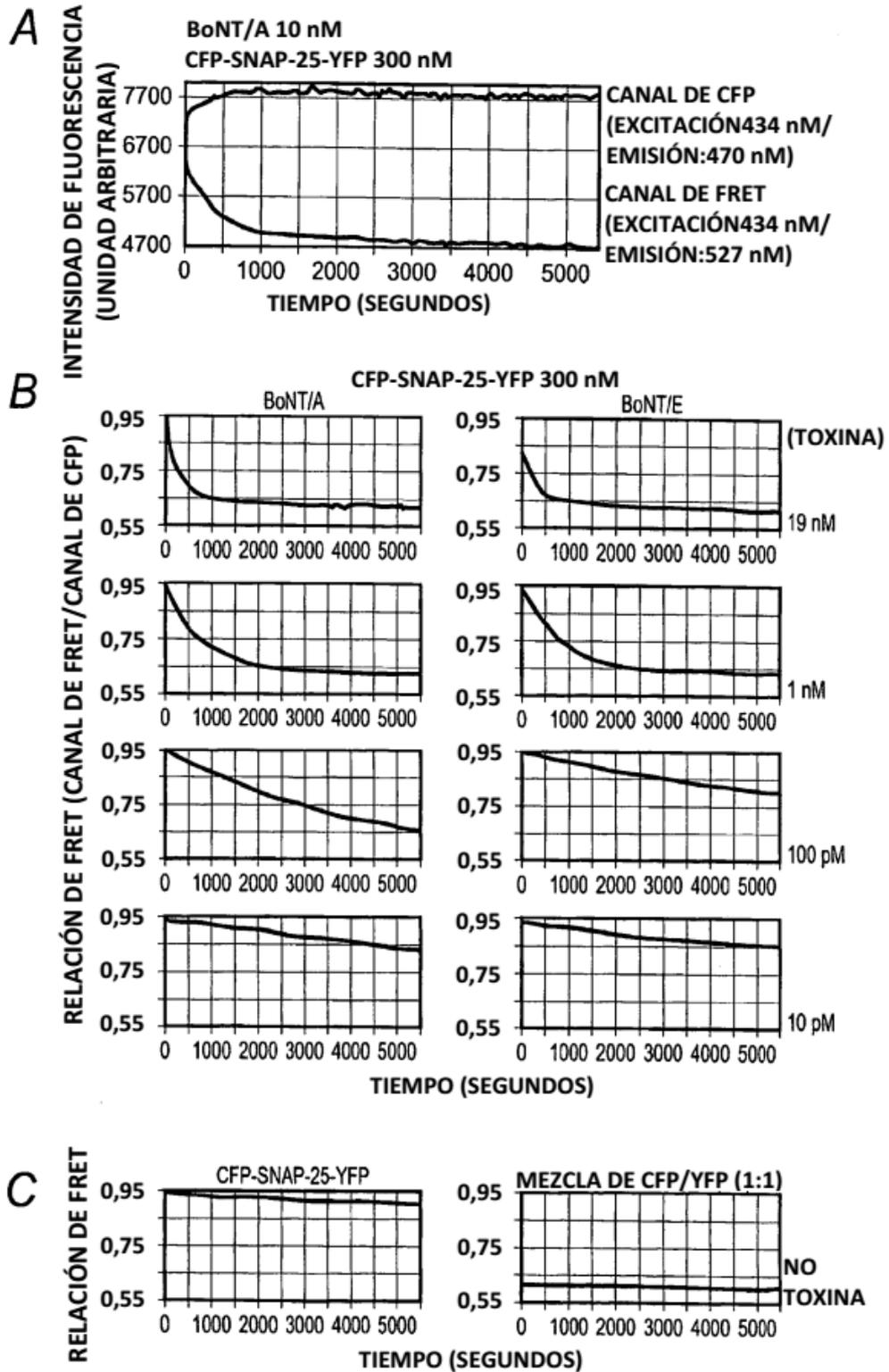
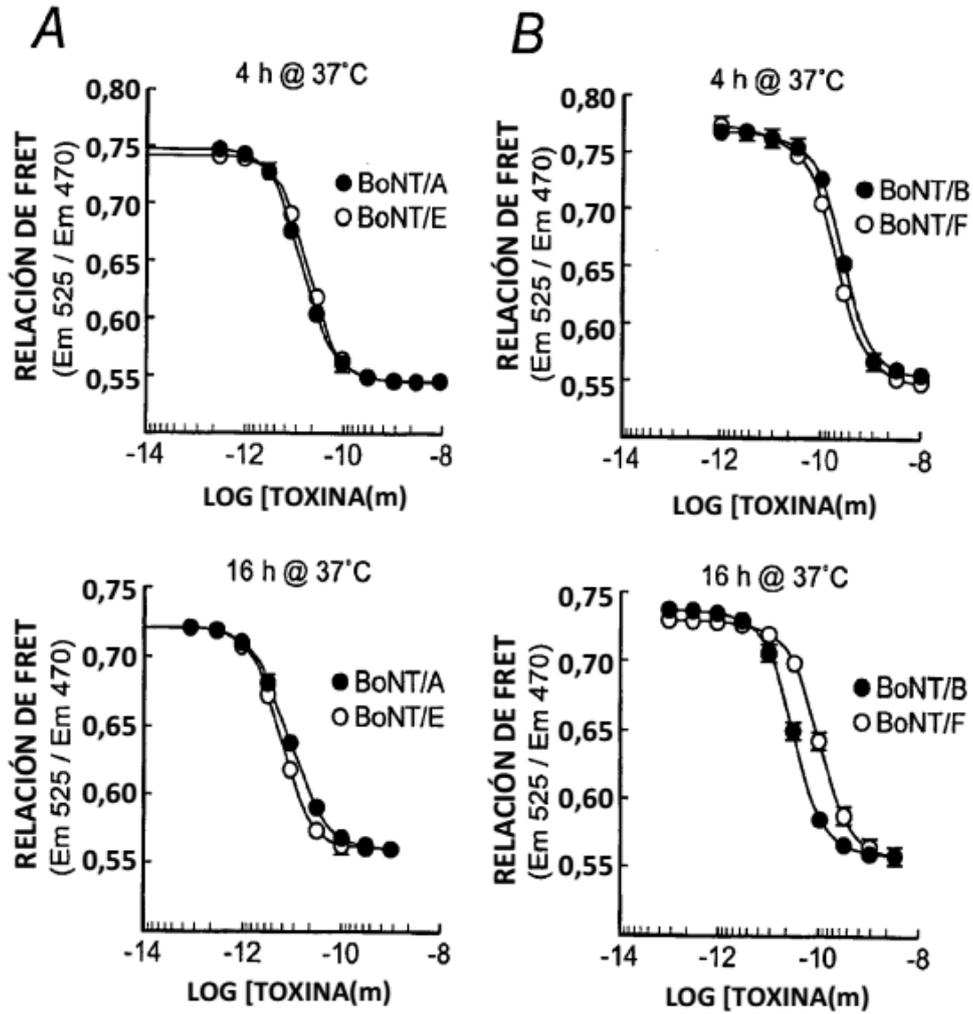


Figura 4



	4 h	16 h
BoNT/A	15 pM	10 pM
BoNT/E	20 pM	6 pM
EC50:		
BoNT/B	242 pM	32 pM
BoNT/F	207 pM	98 pM

Figura 5

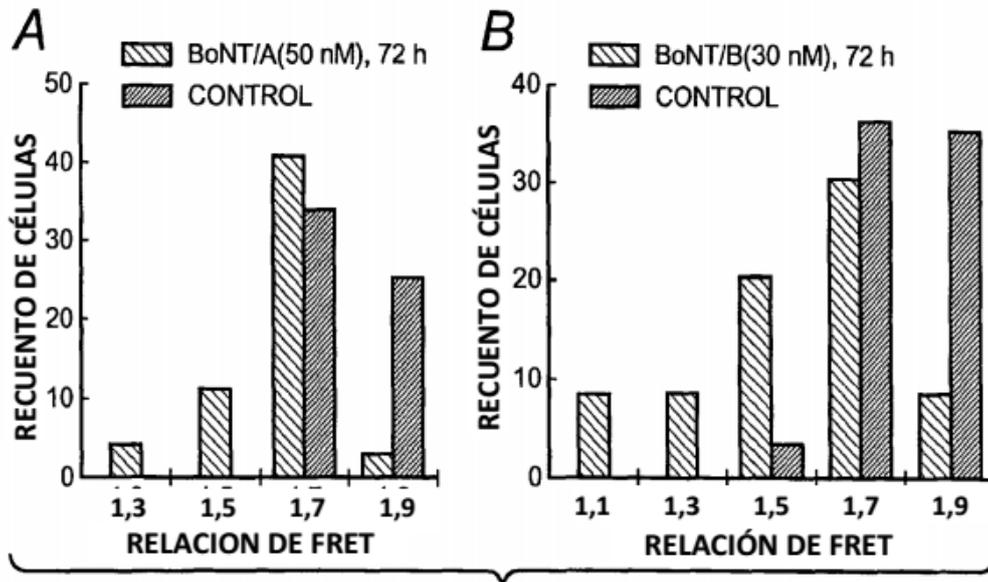
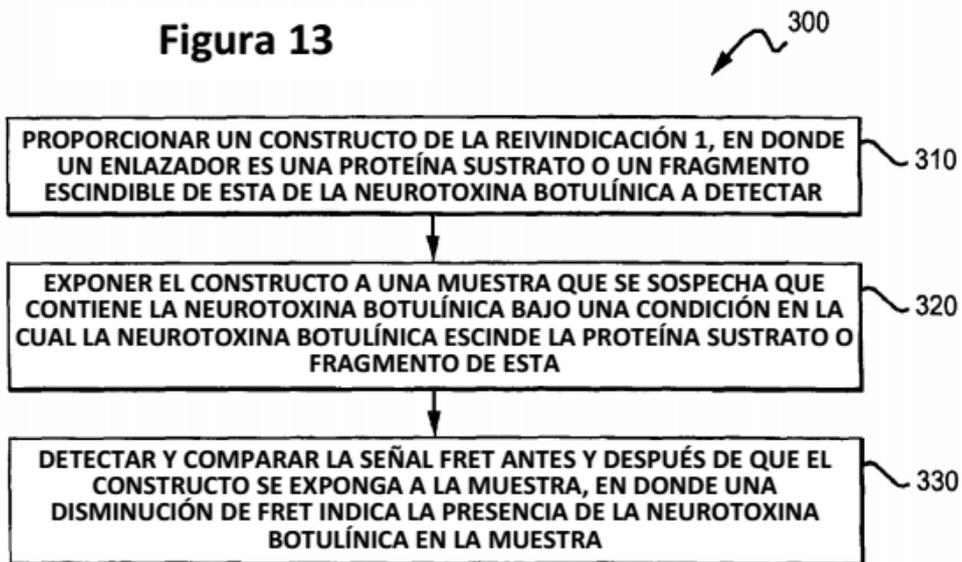
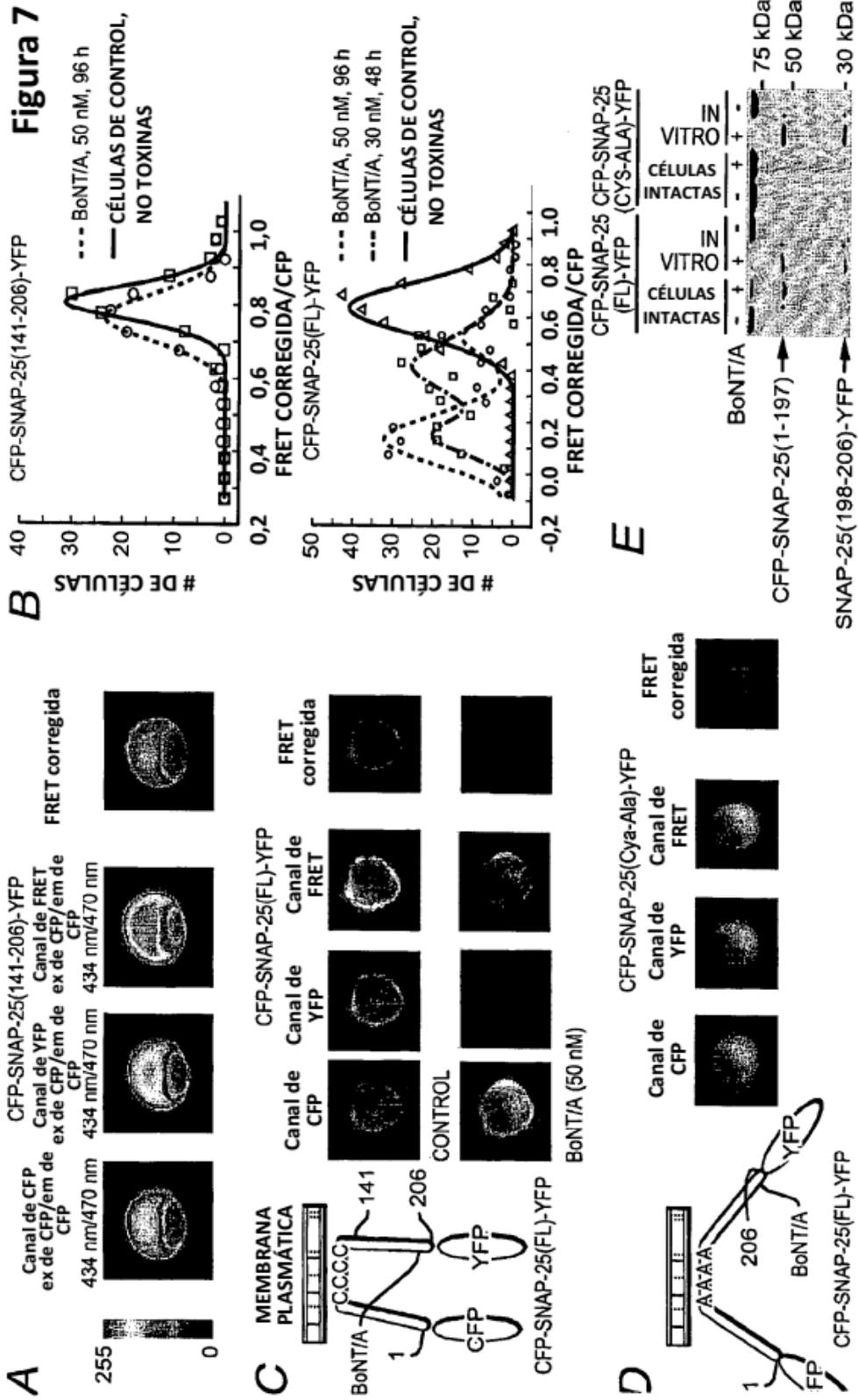


Figura 6

Figura 13





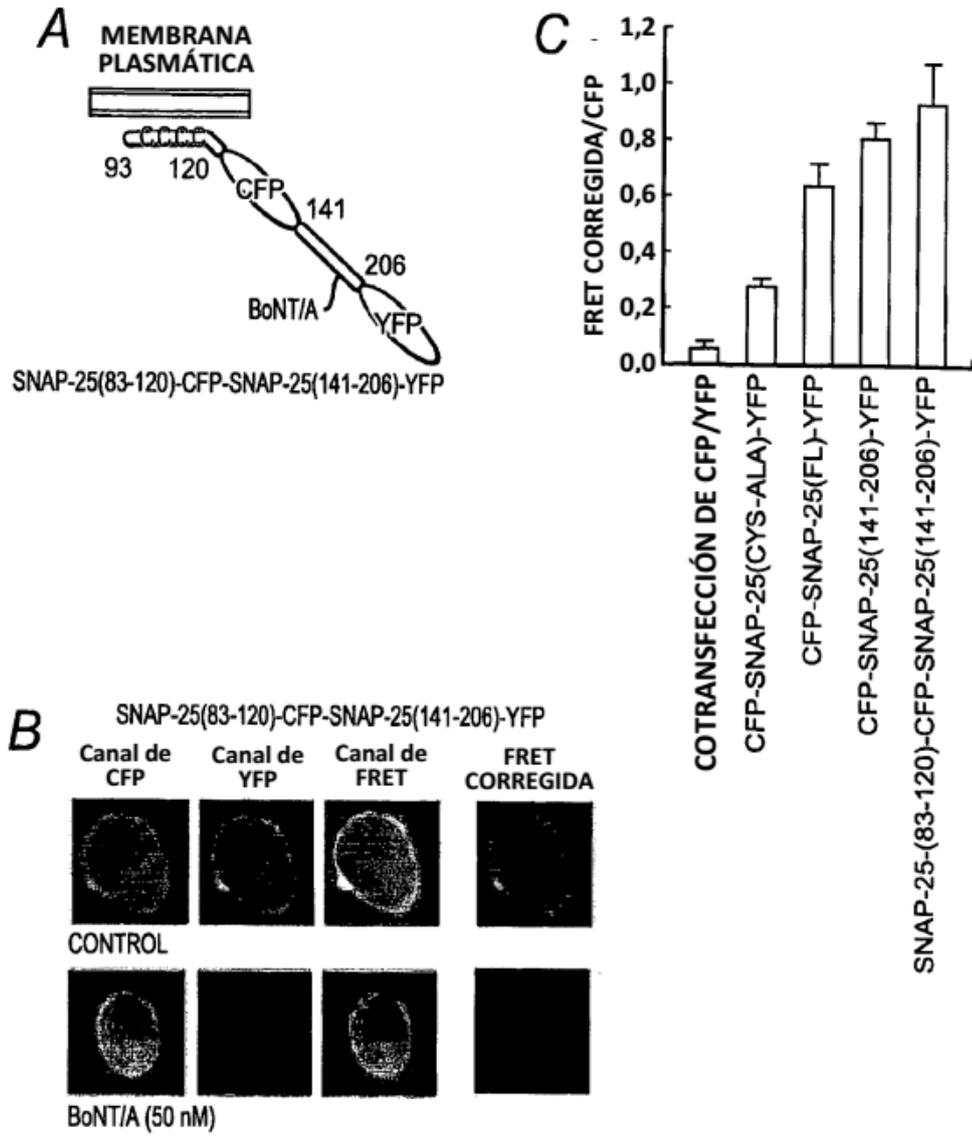
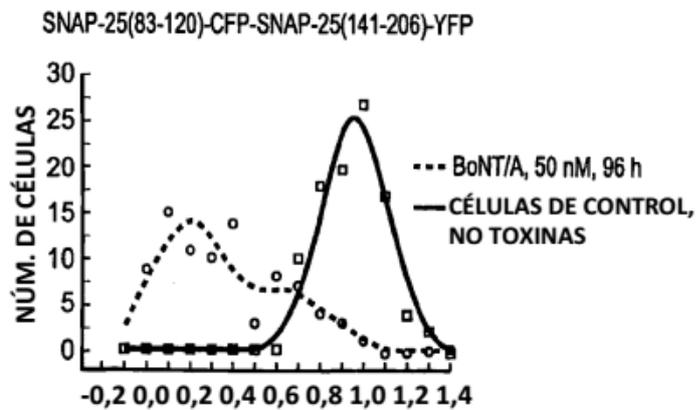


Figura 8



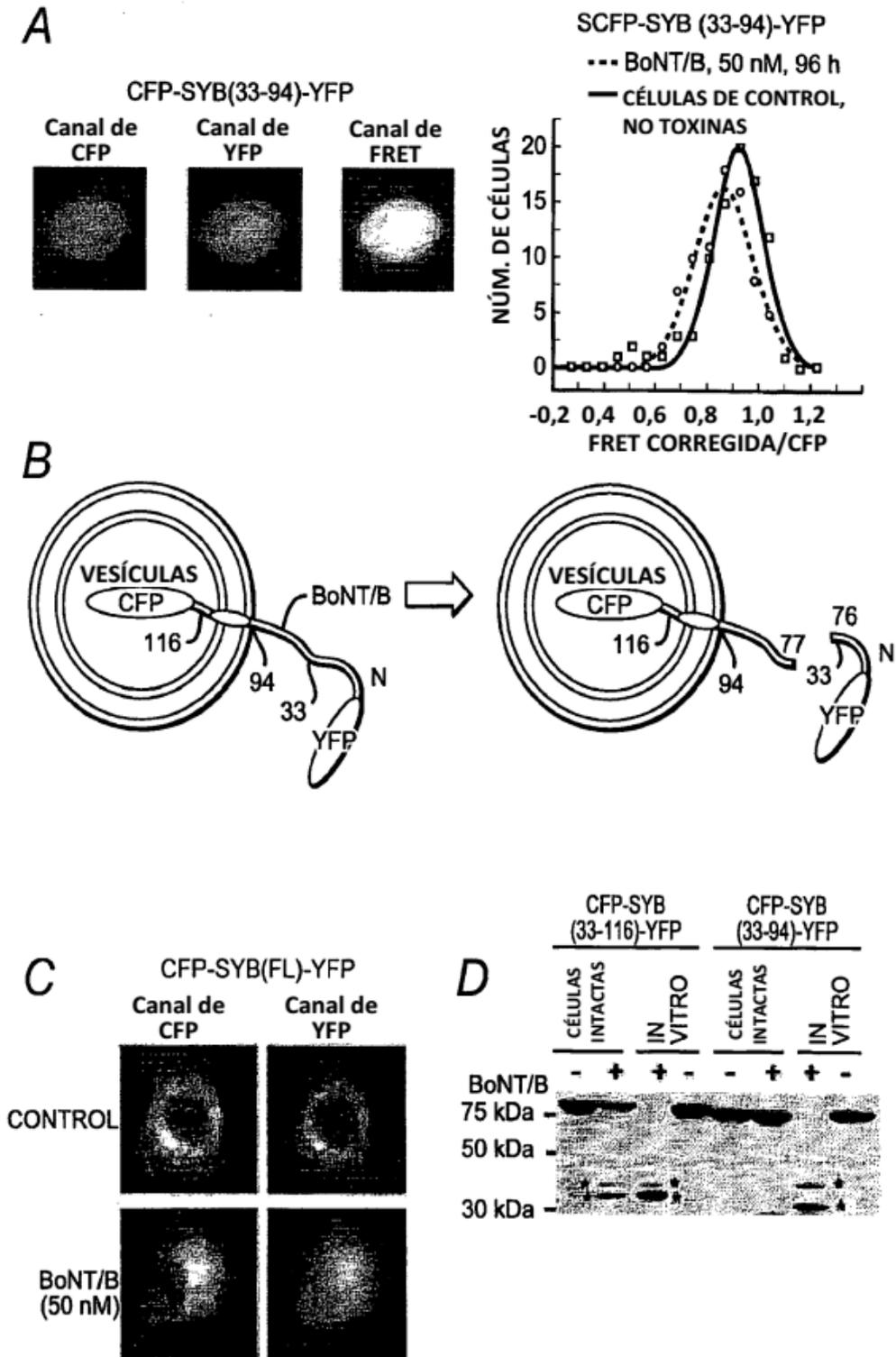


Figura 9

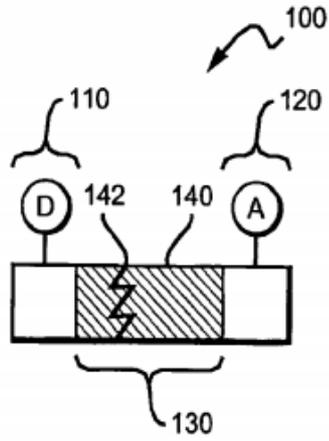


Figura 10
TÉCNICA ANTERIOR

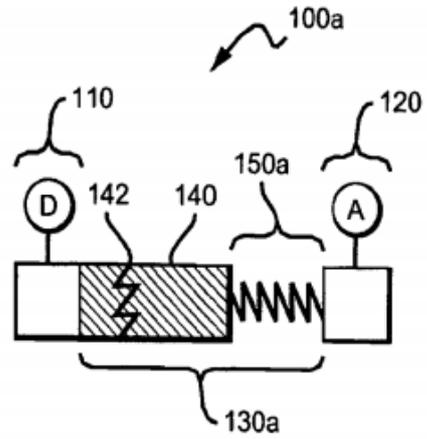


Figura 11a

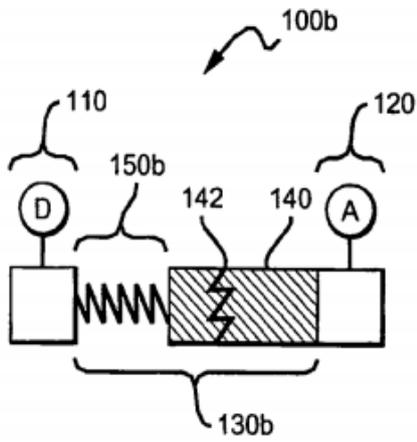


Figura 11b

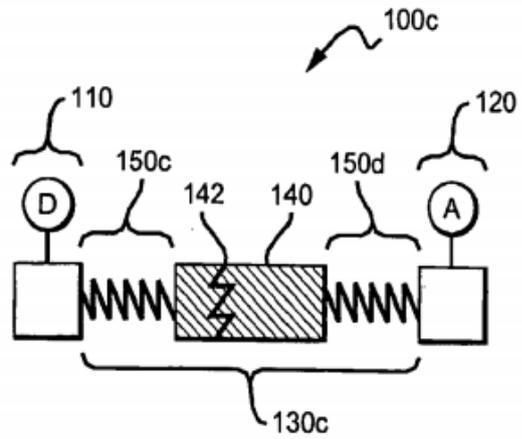


Figura 11c

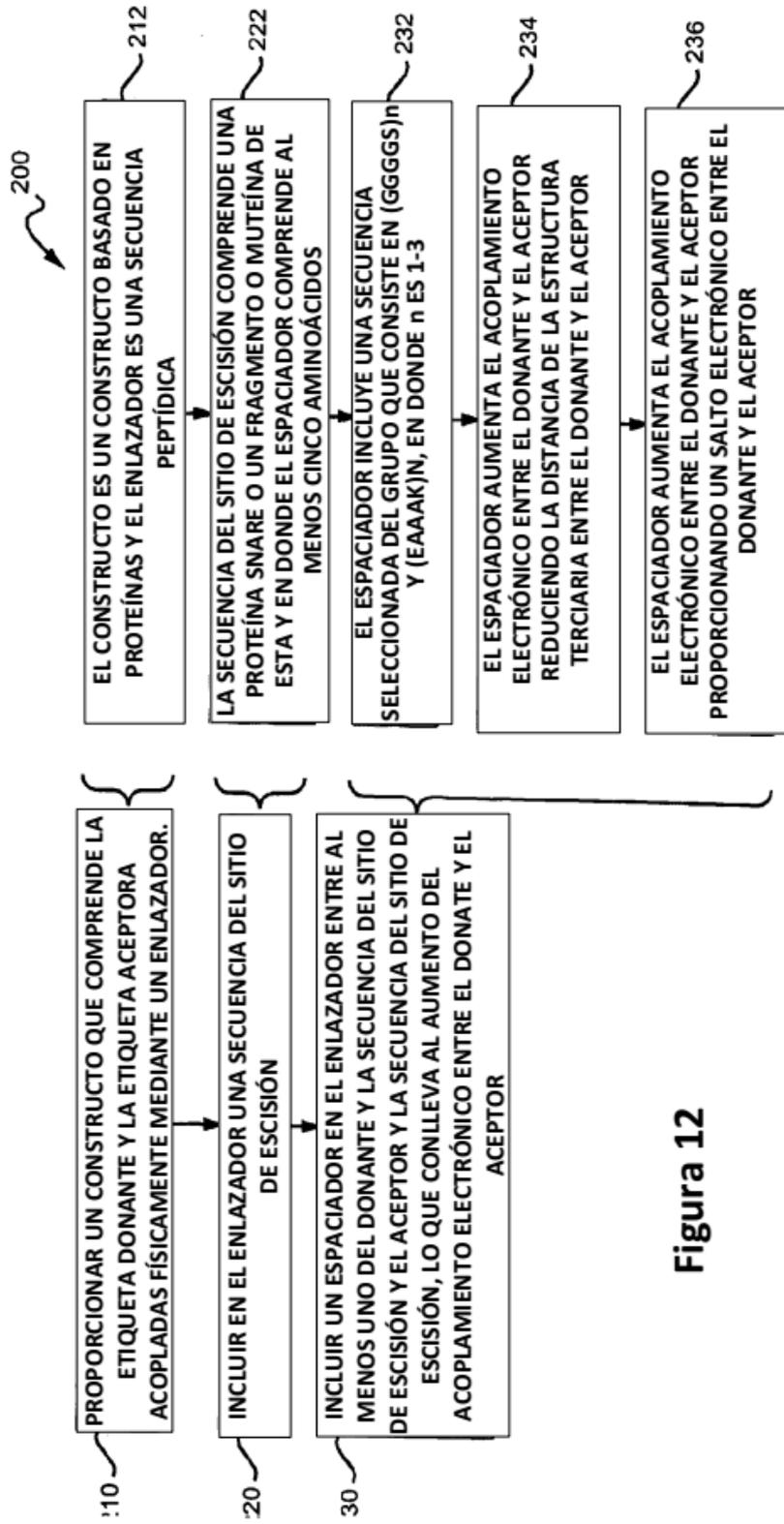


Figura 12