

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 723 723**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/195** (2006.01)

**C07K 14/33** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2006** **E 17154062 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019** **EP 3181578**

54 Título: **Vehículo dirigido a dianas de células nerviosas**

30 Prioridad:

**26.04.2005 DE 102005019302**

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

**30.08.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RUMMEL, ANDREAS;  
WEIL, TANJA y  
GUTCAITS, ALEKSANDRS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 723 723 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

Vehículo dirigido a dianas de células nerviosas

La presente descripción se refiere a una proteína transportadora que se une a las neuronas con una afinidad más alta o baja que la de la neurotoxina formada por *Clostridium botulinum*. La proteína transportadora es captada preferiblemente mediante endocitosis mediada por receptor. Esta proteína tiene utilidad como transportador que transloca otras sustancias químicas (por ejemplo, proteasas) desde el compartimento endosómico ácido hasta el citosol de las neuronas, que fisiológicamente son incapaces de entrar en el citosol de las células nerviosas a través de la membrana plasmática. En particular, la presente descripción se refiere al uso de una proteína transportadora para introducir inhibidores de la liberación de neurotransmisores.

Las células nerviosas liberan sustancias transmisoras mediante exocitosis. Por exocitosis se entiende la fusión de las membranas de vesículas intracelulares con la membrana plasmática. Durante este proceso, el contenido vesicular se libera simultáneamente en la hendidura sináptica. La fusión de las dos membranas está regulada por el calcio, que reacciona con la proteína sinaptotagmina. Junto con otros cofactores, la sinaptotagmina controla el estado de tres proteínas denominadas de fusión, SNAP-25, sinaptobrevina 2 y sintaxina 1A. Aunque la sintaxina 1A y la sinaptobrevina 2 están integradas en la membrana plasmática o vesicular, SNAP-25 está unida débilmente a la membrana plasmática. En caso de aumentar la concentración de calcio intracelular, las tres proteínas se unen entre sí, aproximándose ambas membranas y finalmente se fusionan. En el caso de neuronas colinérgicas, se libera acetilcolina que causa contracciones musculares, sudoración y otras reacciones mediadas por agentes colinérgicos.

Las proteínas de fusión mencionadas anteriormente son las moléculas diana (sustratos) de la cadena ligera (LC) de las neurotoxinas clostridiales que están formadas por las bacterias. *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* y *C. tetani*.

La bacteria anaerobia grampositiva *C. botulinum* produce siete serotipos diferentes de neurotoxinas clostridiales. Estas se conocen como las neurotoxinas botulínicas (BoNT/A a BoNT/G). Entre ellas, BoNT/A y BoNT/B en particular causan una enfermedad neuromuscular en humanos y animales que se denomina botulismo. Las esporas de *C. botulinum* se encuentran en la tierra, pero se pueden desarrollar también en conservas alimenticias mal esterilizadas y cerradas de producción casera, que son responsables de muchos de los casos de botulismo.

BoNT/A es la más activa de todas las sustancias biológicas conocidas. Tan solo 5-6 pg de BoNT/A purificada representan una MLD (Median Letal Dosis; dosis letal media, por sus siglas en inglés). Una unidad (en inglés, unit, U) de BoNT/A es definida como la MLD que después de una inyección intraperitoneal, mata la mitad de ratones Swiss Webster hembra con un peso de 18-20 g cada uno. Se han caracterizado siete BoNT inmunológicamente diferentes. Tienen las designaciones Bo/NTA, B, C1, D, E, F y G y se pueden diferenciar mediante una neutralización con anticuerpos específicos de serotipo. Los diferentes serotipos de BoNT se diferencian en las especies de animales afectados en cuanto a la gravedad y la duración de la parálisis causada. Por tanto, por ejemplo, BoNT/A es 500 veces más activa en la rata en cuanto a la parálisis que BoNT/B. A esto se añade que BoNT/B en los primates, en una dosificación de 480 U/kg de peso corporal, mostró que no era tóxica. La misma cantidad de BoNT/A es equivalente a 12 veces la dosis letal de esta sustancia en los primates. Por otro lado, en los ratones, la duración de la parálisis después de una inyección de BoNT/A es 10 veces más larga que después de una inyección de BoNT/E.

Las BoNT se emplean para el tratamiento de disfunciones neuromusculares que se caracterizan por una hiperactividad en los músculos esqueléticos, causada por nervios periféricos patológicamente hiperactivos. BoNT/A ha sido aprobada por la U.S. Food and Drug Administration para el tratamiento de blefaroespasmos, estrabismo, hiperhidrosis, arrugas y espasmos hemifaciales. En comparación con BoNT/A, los demás serotipos de BoNT poseen obviamente una actividad menor y una duración más corta de la actividad. Los efectos clínicos de BoNT/A administrada por vía intramuscular periférica se presentan usualmente al cabo de una semana. La duración de la supresión de los síntomas con una sola inyección intramuscular de BoNT/A suele ser normalmente de aproximadamente tres a seis meses.

Las neurotoxinas clostridiales hidrolizan específicamente diferentes proteínas del aparato de fusión. BoNT/A, C1 y E escinden SNAP-25, mientras que BoNT/B, D, F, G, así como la neurotoxina tetánica (TeNT) atacan la proteína de membrana, asociada con la vesícula (VAMP)2 - también denominada sinaptobrevina 2 -. BoNT/C1 escinde además la sintaxina 1A.

Las bacterias clostridiales liberan las neurotoxinas como polipéptidos de cadena única, cada uno con 1251 a 1315 aminoácidos. A continuación, unas proteasas endógenas escinden cada una de estas proteínas en un sitio determinado en 2 cadenas en cada caso ('corte'), permaneciendo, sin embargo, ambas cadenas unidas entre sí mediante un puente disulfuro. Estas proteínas de cadena doble se denominan holotoxinas (véase Shone et al. (1985), Eur. J., Biochem. 151, 75-82). Las dos cadenas tienen diferentes funciones. Mientras que la parte más pequeña representa la cadena ligera (en inglés: light chain = LC), una endoproteasa dependiente de  $Zn^{2+}$ , la unidad mayor (en inglés: heavy chain = HC) es el transportador de la cadena ligera. Mediante un tratamiento de la HC con endopeptidasas se producían dos fragmentos de 50 kDa (véase Giménez et al. (1993), J. Protein Chem. 12, 351-363). La mitad amino terminal (fragmento H<sub>N</sub>) se integra en caso de un valor de pH bajo, en las membranas y transloca la LC en el citosol de la célula nerviosa. La mitad carboxilo terminal (fragmento H<sub>C</sub>) se une a polisialogangliósidos complejos que solo

5 existen en las membranas de las células nerviosas, y en receptores de proteínas identificados hasta la fecha solo de manera parcial (Halpern et al. (1993), *Curr Top Microbiol Immuno.* 195, 221-241). Esto explica la gran neuroselectividad de las neurotoxinas clostridiales. Las estructuras cristalinas confirman que BoNT/A posee tres dominios que pueden explicar las tres etapas del mecanismo de acción (véase Lacy et al. (1998), *Nat. Struct. Biol.* 5, 898-902).  
 10 Estos datos permiten además llegar a la conclusión de que dentro del fragmento H<sub>C</sub> existen dos subunidades autónomas (subdominios) de 25 kDa cada uno. La primera prueba de la existencia de los dos subdominios funcionales se proporcionó con la mitad amino terminal (H<sub>CN</sub>) y la mitad carboxilo terminal (H<sub>CC</sub>) del fragmento H<sub>C</sub> de TeNT, que se expresaban de manera recombinante y que permitieron reconocer que el dominio H<sub>CC</sub>, pero no el dominio H<sub>CN</sub>, se une a las neuronas (véase Herreros et al. (2000), *Biochem. J.* 347, 199-204). En un momento posterior se localizó un único sitio de unión de gangliósido dentro de los dominios H<sub>CC</sub> de BoNT/A y B y se caracterizó (véase Rummel et al. (2004), *Mol. Microbiol.* 51, 631-643). El sitio para la unión de la sinaptotagmina I y II identificadas como receptor proteico para BoNT/B y G se podía limitar también a la región de los dominios H<sub>CC</sub> de BoNT/B y G (véase Rummel et al. (2004), *J. Biol. Chem.* 279, 30865-70). El documento no describe, sin embargo, los aminoácidos relevantes para el bolsillo de unión de BoNT/B y G.

15 En condiciones fisiológicas, la HC con el fragmento H<sub>C</sub> se une a gangliósidos neuronales, es absorbida en el interior de la célula mediante endocitosis mediada por receptor y llega a través del compartimiento endosómico al ciclo vesicular natural. En el medio ácido de los endosomas tempranos, el fragmento H<sub>N</sub> penetra en la membrana vesicular y forma un poro. Toda sustancia (X) que está unida con la HC a través de un puente disulfuro será separada de la HC mediante sistemas redox intracelulares que tienen acceso al puente disulfuro y lo reducirán. Finalmente, X aparecerá en el citosol.

20 En el caso de las neurotoxinas clostridiales, la HC es la portadora de una LC que escinde en la etapa final su sustrato específico en el citosol. El ciclo de formación y disociación de complejos de las proteínas de fusión es interrumpido y con ello se inhibe la liberación de acetilcolina. Como consecuencia de ello se paralizan los músculos estriados y las glándulas sudoríparas detienen su secreción. La duración de la acción de los respectivos serotipos de BoNT es diferente y depende de la presencia de LC intactas en el citosol. Como todas las neuronas poseen receptores para neurotoxinas clostridiales, no es solo la liberación de acetilcolina la que puede estar afectada, sino potencialmente también la liberación de la sustancia P, de noradrenalina, GABA, glicina, endorfina y otros transmisores y hormonas.

25 El bloqueo preferencial de la transmisión colinérgica se puede explicar por la entrada de la HC en la periferia en la neurona. Las sinapsis centrales están protegidas por la barrera hematoencefálica, que las proteínas no pueden atravesar.

30 En un estudio de ligando-receptor, ciertos residuos de aminoácidos dentro de los dominios H<sub>CC</sub> de BoNT/B y G se intercambiaron para identificar y caracterizar el bolsillo de unión del receptor de proteína, para alterar de este modo la afinidad hacia el receptor de proteína. La afinidad de los fragmentos H<sub>C</sub> mutados de BoNT/B y G se determinó en experimentos de extracción de proteínas a base de glutatión S-transferasa (GST) con sinaptotagmina. A continuación, la HC con las mismas mutaciones se acopló a LC-B o LC-G, respectivamente. La potencia de estas estructuras artificiales se analizó con la ayuda de la preparación de nervio-músculo aislada del ratón (ensayo de hemidiafragma, Hemi-Diafragma-Assay = HDA, por sus siglas en inglés). En esta preparación se encuentra el *nervio frénico* que consiste en neuronas motoras colinérgicas y representa la diana fisiológica más importante de las neurotoxinas clostridiales. Posteriormente, en el dominio H<sub>CC</sub> de BoNT/A en una depresión ubicada en un sitio análogo a los bolsillos de unión del receptor de proteína en BoNT/B y G, se intercambiaron aminoácidos individuales. Los mutantes aislados de BoNT/A de longitud completa también se analizaron a continuación en el HDA para analizar una potencia alterada, lo que indicaría una evidencia de interacciones alteradas entre el ligando-receptor de proteína.

35 El complejo BoNT/A, denominado también toxina progenitora A, se ha empleado en el pasado reciente para el tratamiento de distonías motoras, así como para atenuar una actividad simpática excesiva (véase, Benecke et al. (1995), *Akt. Neurol.* 22, 209ss) y para aliviar el dolor y la migraña (véase, Sycha et al. (2004), *J. Neurol.* 251, 19-30). Este complejo consiste en la neurotoxina, diferentes hemaglutininas y una proteína no tóxica, no hemaglutinante. A pH fisiológico, el complejo se disocia en pocos minutos. La neurotoxina que surge a raíz de ello es el único componente del complejo que es terapéuticamente relevante y que causa un alivio de los síntomas. Dado que la enfermedad neurológica subyacente no se cura, es necesario volver a inyectar el complejo en intervalos de tres a cuatro meses. Dependiendo de la cantidad de proteína extraña inyectada, algunos pacientes forman anticuerpos específicos de BoNT/A. Estos pacientes se vuelven resistentes a la neurotoxina. Una vez que células sensibles al antígeno detectan la neurotoxina y forman anticuerpos, las células de memoria respectivas se conservarán durante años. Por esto es importante tratar a los pacientes con preparaciones de actividad máxima en una dosificación lo más baja posible. Las preparaciones no deberían contener, además, otras proteínas de origen bacteriano, ya que estas podrían actuar como adyuvantes inmunológicos. Esas sustancias atraen a los macrófagos que reconocen tanto los adyuvantes inmunológicos como también las neurotoxinas y los presentan a los linfocitos, los cuales responden en seguida con la formación de inmunoglobulinas. En consecuencia, en la terapia se deberían usar únicamente productos de pureza máxima, que no contengan proteínas extrañas. La resistencia de los pacientes frente a la neurotoxina se basa, a nivel molecular, predominantemente en la presencia de anticuerpos neutralizantes.

40 Santos-Buelga et al. (1998), *Current Microbiology*, 37:312-318 describen la caracterización de los genes que codifican el complejo de neurotoxina botulínica en una cepa de *Clostridium botulinum*, que produce las neurotoxinas de

tipo B y F. Rummel et al. (2004), *Molecular Microbiology*, 51:631-643, descubrieron que el dominio H<sub>CC</sub> de las neurotoxinas botulínicas A y B tiene un único sitio de unión a gangliósidos que muestra una interacción con carbohidratos específica de serotipo. Hutson et al. (1994), *Current Microbiology*, 28:101-110 describen la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la neurotoxina de *Clostridium botulinum* de tipo B no proteolítica, y proporcionan una comparación con otras neurotoxinas clostridiales. El documento US 2003/0215468 describe el aislamiento de polipéptidos derivados de las neurotoxinas de *Clostridium botulinum* y su uso como agentes inmunógenos.

Con la presente descripción, se presenta a continuación una proteína transportadora (Trapo), que puede superar los problemas descritos anteriormente de los métodos conocidos hasta la fecha.

La invención se define por las reivindicaciones. Los aspectos/ejemplos de la presente descripción que constituyen la invención, se definen mediante las reivindicaciones.

Esta tarea se resolvió con una nueva proteína transportadora, obtenible mediante una modificación de la cadena pesada de la neurotoxina formada por *Clostridium botulinum*, en donde

(i) la proteína se une a las células nerviosas con una afinidad mayor o menor que la neurotoxina natural;

(ii) la proteína presenta una neurotoxicidad mayor o menor en comparación con la neurotoxina natural; preferiblemente, la neurotoxicidad se determina en el ensayo de hemidiafragma; y/o

(iii) la proteína presenta una menor afinidad hacia los anticuerpos neutralizantes que en comparación con la neurotoxina natural.

De acuerdo con un ejemplo preferido de la presente descripción, se proporciona una proteína transportadora que se une a las células nerviosas con mayor o menor afinidad que la neurotoxina natural formada por *C. botulinum*.

De acuerdo con otro ejemplo preferido de la presente descripción, se proporciona una proteína transportadora que se obtiene mediante una modificación de la HC de la neurotoxina formada por *C. botulinum*, en donde la proteína se une con mayor o menor afinidad que la neurotoxina natural, específicamente a las células nerviosas. Preferiblemente, la proteína transportadora es captada por estas células mediante endocitosis.

De acuerdo con otro ejemplo preferido, se proporciona también una proteína transportadora que se obtiene mediante una modificación de la HC de la neurotoxina formada por *C. botulinum*, en donde la proteína ya no es accesible para la unión con anticuerpos neutralizantes debido a intercambios de aminoácidos expuestos en la superficie, en particular en los bolsillos de unión a receptor de gangliósidos y proteínas.

A continuación se definen conceptos que deben ser entendidos en el contexto de la presente solicitud.

"Unión a células nerviosas con mayor o menor afinidad que la neurotoxina natural". La neurotoxina natural es en este caso la neurotoxina natural de *C. botulinum*. La neurotoxina natural es preferiblemente la neurotoxina A botulínica y/o la neurotoxina B botulínica y/o la neurotoxina G botulínica procedentes de *C. botulinum*. La neurotoxina botulínica producida de forma recombinante en *E. coli*, que contiene, entre otras, la secuencia de aminoácidos idéntica a la neurotoxina botulínica natural se comporta farmacológicamente de forma idéntica a la neurotoxina botulínica natural y se denomina neurotoxina botulínica recombinante de tipo silvestre. Las células nerviosas mencionadas en esta memoria son neuronas motoras colinérgicas. Preferiblemente, la proteína transportadora se une específicamente a las moléculas asociadas a la membrana plasmática, proteínas transmembranales, proteínas de vesículas sinápticas, una proteína de la familia sinaptotagmina o glicoproteínas de vesículas sinápticas 2 (SV2), preferiblemente sinaptotagmina I y/o sinaptotagmina II y/o SV2A, SV2B o SV2C, más preferiblemente sinaptotagmina I humana y/o sinaptotagmina II humana y/o SV2A, SV2B o SV2C humanas. La unión se determina preferentemente *in vitro*. Lo más preferible es realizar la determinación utilizando un ensayo de extracción de proteínas con GST que se detalla en los Ejemplos.

"La proteína muestra, en comparación con la neurotoxina natural, una neurotoxicidad incrementada o reducida". La neurotoxina natural es en este caso la neurotoxina natural de *C. botulinum*. Preferentemente, la neurotoxina natural en este caso es la neurotoxina A botulínica y/o la neurotoxina B botulínica y/o la neurotoxina G botulínica de *C. botulinum*. La neurotoxina botulínica producida de forma recombinante procedente de *E. coli*, que contiene, entre otras la secuencia de aminoácidos idéntica a la neurotoxina botulínica natural, se comporta farmacológicamente de forma idéntica a la neurotoxina botulínica natural y se denomina neurotoxina botulínica recombinante de tipo silvestre. Las células nerviosas mencionadas en esta memoria son neuronas motoras colinérgicas.

La neurotoxicidad se determina preferiblemente con ayuda del ensayo de hemidiafragma (HDA) conocido en la técnica. La neurotoxicidad de las muteínas se puede determinar preferiblemente tal y como se describe en Habermann et al., *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 311 (1980), 33-40.

"Anticuerpos neutralizantes". Se conocen los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra neurotoxinas botulínicas (Göschel H, Wohlfarth K, Frevert J, Dengler R, Bigalke H. *Botulinum A toxin therapy: neutralizing and nonneutralizing antibodies-therapeutic consequences*, *Exp. Neurol.* 1997 Sep; 147(1):96-102). Se ha descubierto que los anticuerpos

neutralizantes de la neurotoxina interaccionan, en particular con los centros activos como, por ejemplo, los bolsillos de unión de receptores de gangliósidos y de proteínas dentro de los dominios H<sub>CC</sub> de la neurotoxina. Si se modifican las superficies que rodean los bolsillos de unión en la neurotoxina mediante sustituciones de aminoácidos, sin afectar negativamente a su funcionalidad, los anticuerpos neutralizantes pierden sus sitios de unión y la neurotoxina mutada ya no se neutraliza.

La expresión "modificación de la cadena pesada de la neurotoxina formada por *C. botulinum*". Las secuencias de aminoácidos y/o de ácido nucleico de la cadena pesada (HC) de la neurotoxina formada por *C. botulinum* se pueden obtener generalmente a partir de bases de datos disponibles públicamente para cada uno de los serotipos conocidos A a G (véase también la Tabla 1). Una modificación de la misma comprende que al menos un aminoácido está deletado, añadido, insertado en la secuencia de aminoácidos, o que al menos un aminoácido de la neurotoxina natural está sustituido por otro aminoácido de origen natural o no natural y/o un aminoácido en la secuencia de aminoácidos dada se modifica después de la traducción. Las modificaciones postraduccionales incluyen en este caso glicosilaciones, acetilaciones, acilaciones, desaminaciones, fosforilaciones, isoprenilaciones, glicosilfosfatidilinositolaciones y otras modificaciones conocidas por los expertos en la técnica.

La HC de la neurotoxina formada por *C. botulinum* comprende tres subdominios, a saber, el dominio de translocación H<sub>N</sub> amino terminal con un tamaño de 50 kDa, el dominio H<sub>CN</sub> adyacente con un tamaño de 25 kDa y el dominio H<sub>CC</sub> en la posición carboxilo terminal de 25 kDa. Juntos, los dominios H<sub>CN</sub> y H<sub>CC</sub> se denominan fragmento H<sub>C</sub>. Las secciones de aminoácidos correspondientes de los respectivos subdominios aparecen en la Tabla 1 para cada uno de los serotipos y sus variantes

"Receptor de gangliósidos"

Las HC de las neurotoxinas botulínicas tienen una alta afinidad hacia las células nerviosas periféricas, que está mediada principalmente por la interacción con polisialogangliósidos complejos - que son glicolípidos que consisten en más de un ácido siálico - (Halpern et al. (1995), Curr. Top. Microbiol. Immunol. 195, 221-41; documento WO 2006/02707). A continuación, las LC unidas a los mismos solo llegan a ese tipo de células y se vuelven activas solo en esas células. BoNT/A y B se unen solo a una molécula de gangliósido GT1b.

En el caso de BoNT/B y BoNT/G, los receptores de proteínas son sinaptotagmina I y sinaptotagmina II. En el caso de BoNT/A, los receptores de proteínas son las glicoproteínas de vesículas sinápticas 2 (SV2), preferiblemente SV2A, SV2B y SV2C.

En la actualidad, se conocen 13 isoformas de la familia de sinaptotagminas. Todas se caracterizan por dos dominios C2 que se unen a Ca<sup>2+</sup> carboxilo terminales, un dominio transmembranal medio (TMD) que ancla la sinaptotagmina a la membrana de la vesícula sináptica, y un extremo amino terminal con diferentes longitudes. Después del influjo de Ca<sup>2+</sup> se inicia la fusión de la vesícula sináptica con la membrana plasmática, con lo que el extremo amino intraluminal de la sinaptotagmina se presenta de manera extracelular y está disponible como un ancla de receptor para BoNT/B y G. De manera similar, el cuarto dominio luminal de las isoformas de SV2 después de la exocitosis está disponible extracelularmente para la interacción con BoNT/A.

A través de una mutagénesis dirigida a la diana, se alteraba el carácter de aminoácidos individuales del bolsillo de unión de tal manera que se dificultaba o impedía la unión a un receptor de proteína. Para ello, se expresaron en *E. coli* y se aislaron los fragmentos H<sub>C</sub> de BoNT/B y BoNT/G en el bolsillo de unión postulado en forma recombinante como tipo silvestre o con sustituciones de aminoácidos individuales (mutaciones/sustituciones). Para un ensayo de extracción de proteínas a base de GST para estudiar *in vitro* la interacción entre BoNT/B y BoNT/G, así como sinaptotagmina I y sinaptotagmina II, se incubó la proteína de fusión GST-sinaptotagmina respectiva con diferentes cantidades de los respectivos fragmentos H<sub>C</sub> de BoNT/B o BoNT/G y se llevó a cabo una separación de fases. El fragmento H<sub>C</sub> libre permanecía en el material sobrenadante separado, mientras que el fragmento H<sub>C</sub> de BoNT unido era detectable en la fase sólida junto con la proteína de fusión GST-sinaptotagmina. La sustitución de los fragmentos H<sub>C</sub> respectivos por BoNT/B y G de longitud completa en el ensayo de extracción de proteínas a base de GST, proporcionaba los mismos resultados.

Se encontró con ello que el tipo silvestre de BoNT/B se une solo en presencia de gangliósidos complejos y sinaptotagmina I con el dominio transmembranal, mientras que la sinaptotagmina II se une con o sin dominio transmembranal, así como en presencia o ausencia de gangliósidos complejos. Mediante una sustitución dirigida de los aminoácidos en el sitio de unión del receptor de proteína de BoNT/B, se podía aumentar o disminuir significativamente la interacción con ambas moléculas de sinaptotagmina (Figura 1).

Además, para el tipo silvestre de BoNT/G se mostró que tanto en presencia como en ausencia de gangliósidos complejos, la unión a sinaptotagmina I y sinaptotagmina II se produce con o sin dominio transmembranal, respectivamente. Mediante una sustitución dirigida de aminoácidos homólogos a BoNT/B dentro del sitio de unión del receptor de proteína de BoNT/G, se podía aumentar o disminuir significativamente la interacción con ambas moléculas de sinaptotagmina (Figura 2).

La potencia de la forma de longitud completa de los tipos silvestres de BoNT/A, B y G se determinó en el HDA mediante una curva de dosis-respuesta (Figuras 3 y 6). Posteriormente, se determinó la potencia de las diversas formas

de longitud completa de mutantes individuales de BoNT/A, B y G en el HDA (Figura 6) y se relacionó con la potencia de los tipos silvestres de BoNT/B y G mediante una función de la potencia aplicada (Figuras 4 y 5). A modo de ejemplo, el intercambio de los aminoácidos valina 1118 por aspartato o de lisina 1192 por glutamato en BoNT/B, conduce a una reducción drástica de la potencia a <2%. En contraposición, la mutación de la tirosina 1183 a leucina o arginina, respectivamente, aumenta significativamente la potencia de BoNT/B (Figura 4). La modificación de la tirosina 1256 a fenilalanina en BoNT/G también produce un aumento en la potencia, mientras que la mutación de glutamina 1200 a glutamato, lisina o tirosina, causa una fuerte disminución en la potencia de BoNT/G (Figura 5). En el caso de BoNT/A, la modificación de la serina 1207 a arginina o tirosina, produce un aumento de la potencia, mientras que la mutación de la lisina 1260 a glutamato, causa una reducción drástica de la potencia de BoNT/A (Figura 6).

De acuerdo con un ejemplo preferido, la proteína transportadora muestra al menos un 15% más de afinidad o al menos un 15% menos de afinidad que la neurotoxina natural. Preferiblemente, la proteína transportadora muestra al menos un 50% más o menos de afinidad, más preferiblemente al menos un 80% más o menos, y especialmente al menos 90% más o menos de afinidad que la neurotoxina natural.

De acuerdo con un ejemplo preferido, la modificación de la HC tiene lugar en la región del fragmento H<sub>C</sub> de la neurotoxina dada. Siempre que la modificación comprenda una sustitución, delección, inserción o adición, esta se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante una mutagénesis dirigida, en donde los procedimientos para ello son conocidos por el experto en la materia. Los aminoácidos presentes en la neurotoxina natural se alteran de este modo mediante aminoácidos de origen natural o no natural. Básicamente, los aminoácidos se dividen en diferentes grupos fisicoquímicos. Entre los aminoácidos cargados negativamente se incluyen aspartato y glutamato. Entre los aminoácidos cargados positivamente se incluyen histidina, arginina y lisina. Entre los aminoácidos polares se incluyen asparagina, glutamina, serina, treonina, cisteína y tirosina. Entre los aminoácidos no polares se incluyen glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina y triptófano. Grupos laterales aromáticos se encuentran en los aminoácidos histidina, fenilalanina, tirosina y triptófano. En general, se prefiere que un aminoácido se reemplace por otro aminoácido que pertenezca a otro grupo fisicoquímico.

De acuerdo con un ejemplo preferido de la descripción, la proteína transportadora es una neurotoxina botulínica con serotipo A a G. En esta memoria, las secuencias de aminoácidos de las neurotoxinas naturales están disponibles en bases de datos disponibles públicamente de la siguiente manera:

**Tabla 1:** Números en la base de datos de las secuencias de aminoácidos y distribución de los subdominios de las siete neurotoxinas botulínicas.

BoNT	N° en la base de datos de la secuencia de proteína	Número de aminoácidos	HC		
			H <sub>N</sub>	H <sub>C</sub>	
				H <sub>CN</sub>	H <sub>CC</sub>
BoNT/A	AAA23262 AAM75961 AAQ06331 BTCLAB	1296	449-866	867-1091	1092-1296
	P10845	1296	449-866	867-1091	1092-1296
	CAA36289	1296	449-866	867-1091	1092-1296
	CAA51824 140645 Q45894	1296	449-866	867-1091	1092-1296
	AAL11499 AAL11498	1291	442-855	866-1078	1079-1291
	CAA73968 AAK971.32	1291	442-855	866-1078	1079-1291
BoNT/B	A48940 AAA23211 P10844	1291	442-855	866-1078	1079-1291

ES 2 723 723 T3

	BAC22064	1291	442-855	866-1078	1079-1291
	CAA50482 I40631	1291	442-855	866-1078	1079-1291
BoNT/C1	A49777 BAA14235 BAB71749 CAA51313 S46431	1291	450-863	864-1092	1093-1291
	P18640	1291	450-863	864-1092	1093-1291
	BAA08418	1280	450-863	864-1083	1084-1280
	BAA89713	1280	450-863	864-1083	1084-1280
BoNT/D	CAA38175 P19321 S11455	1276	446-859	860-1079	1080-1276
	AAB24244	1276	446-859	860-1079	1080-1276
	BAA07477 S70582	1285	446-859	860-1088	1089-1285
	BAA90661	1285	446-859	860-1088	1089-1285
BoNT/E	BAB86845 CAA44558 S21178	1252	423-842	843-1066	1067-1252
	CAA43999 Q00496	1251	423-842	843-1066	1067-1251
	CAA43998 JH0256 P30995	1251	423-842	843-1066	1067-1251
BoNT/F	1904210A AAA23263 I40813 P30996	1274	440-860	861-1086	1087-1274
	CAA73972	1280	440-861	862-1087	1088-1280
	AAA23210 CAA57358	1278	440-861	862-1084	1085-1278
	CAA48329 S33411	1268	432-853	854-1075	1076-1268
BoNT/G	CAA52275 Q60393 S39791	1297	447-860	861-1086	1087-1297

Con respecto al fragmento H<sub>C</sub> de estas neurotoxinas botulínicas, para una modificación se prefieren los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de

867 hasta 1296 de la neurotoxina de serotipo A de *C. botulinum*,

866 hasta 1291 de la neurotoxina de serotipo B de *C. botulinum*,

5 864 a 1291 o 1280 de la neurotoxina de serotipo Cl de *C. botulinum*,

860 a 1276 o 1285 de la neurotoxina de serotipo D de *C. botulinum*,

843 a 1251 o 1252 de la neurotoxina de serotipo E de *C. botulinum* o *C. butyricum*,

861 a 1274, 862 a 1280 y 1278 y 854 a 1268 de la neurotoxina de serotipo F de *C. botulinum* o *C. baratii*,

861 a 1297 de la neurotoxina de serotipo G de *C. botulinum*.

10 Por lo tanto, se prefiere que al menos un aminoácido en las posiciones mencionadas anteriormente se modifique después de la traducción, y/o se añada y/o se deleccione y/o se inserte y/o se sustituya por un aminoácido que tiene un origen natural o no natural.

De acuerdo con un ejemplo preferido, la neurotoxina es la neurotoxina botulínica de serotipo A. Preferiblemente en este caso, en al menos un aminoácido en las posiciones de treonina 1195, asparagina 1196, glutamina 1199, lisina 1204, isoleucina 1205, leucina 1206, serina 1207, leucina 1209, aspartato 1213, leucina 1217, fenilalanina 1255, asparagina 1256, isoleucina 1258 y/o lisina 1260 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina botulínica de serotipo A se modifica de forma postraducciona y/o se añade y/o se delecciona y/o se inserta y/o se sustituye por un aminoácido que tiene origen natural o no tiene origen natural. Particularmente preferidas son las posiciones asparagina 1196, glutamina 1199, serina 1207, fenilalanina 1255, isoleucina 1258 y/o lisina 1260 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina botulínica de serotipo A. En particular, se prefieren las posiciones serina 1207 sustituida por arginina o tirosina, y lisina 1260 sustituida por glutamato.

De acuerdo con un ejemplo preferido, la neurotoxina es neurotoxina botulínica de serotipo B. Preferiblemente en este caso, en al menos un aminoácido en las posiciones de lisina 1113, aspartato 1114, serina 1116, prolina 1117, valina 1118, treonina 1182, tirosina 1183, fenilalanina 1186, lisina 1188, glutamato 1191, lisina 1192, leucina 1193, fenilalanina 1194, fenilalanina 1204, fenilalanina 1243, glutamato 1245, lisina 1254, aspartato 1255 y tirosina 1256 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina botulínica de serotipo B se modifica de forma postraducciona y/o se añade y/o se delecciona y/o se inserta y/o se sustituye por un aminoácido que tiene origen natural o no tiene origen natural. Particularmente preferidas son las posiciones valina 1118, tirosina 1183, glutamato 1191, lisina 1192, glutamato 1245 y tirosina 1256 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina botulínica de serotipo B. En particular, se prefieren las posiciones tirosina 1183 y glutamato 1191, que están reemplazadas por leucina.

De acuerdo con otro ejemplo preferido, la neurotoxina es neurotoxina botulínica de serotipo G. Preferiblemente en este caso, en al menos un aminoácido en las posiciones de fenilalanina 1121, lisina 1123, alanina 1124, serina 1125, metionina 1126, valina 1190, leucina 1191, serina 1194, glutamato 1196, treonina 1199, glutamina 1200, leucina 1201, fenilalanina 1202, fenilalanina 1212, fenilalanina 1248, lisina 1250, aspartato 1251 y tirosina 1262 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina botulínica de serotipo G se modifica de forma postraducciona y/o se añade y/o se delecciona y/o se inserta y/o se sustituye por un aminoácido que tiene origen natural o no tiene origen natural. Particularmente preferidas son las posiciones metionina 1126, leucina 1191, treonina 1199, glutamina 1200, lisina 1250 y tirosina 1262 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina botulínica de serotipo G. En particular, se prefiere la posición tirosina 1262, que se reemplaza por fenilalanina.

40 La proteína transportadora proporcionada en la presente descripción muestra una afinidad específica incrementada o reducida de su dominio de unión a proteínas, en particular a moléculas de la familia de las sinaptotagminas o de glicoproteínas 2 de vesículas sinápticas.

Otro ejemplo de la presente descripción se refiere a una composición que contiene una proteína transportadora de acuerdo con la descripción y al menos una molécula intermedia (X). La molécula intermedia puede ser una molécula orgánica pequeña, un péptido o una proteína; preferiblemente se une covalentemente a la proteína transportadora a través de un enlace peptídico, un enlace éster, un enlace éter, un enlace sulfuro, un enlace disulfuro o un enlace carbono-carbono.

La molécula intermedia comprende además todas las sustancias terapéuticamente activas conocidas. En esta memoria se da preferencia a los agentes citostáticos, antibióticos, viroestáticos, pero también a las inmunoglobulinas.

50 En un ejemplo preferido, la proteína es una proteasa que escinde una o varias proteínas del aparato de liberación de neurotransmisores, en donde la proteasa se selecciona a partir del grupo de neurotoxinas que consiste en la LC de la neurotoxina de *C. botulinum*, en particular del serotipo A, B, Cl, D, E, F y G o un fragmento proteolíticamente activo de la LC de una neurotoxina de *C. botulinum*, en particular una neurotoxina del serotipo A, B, Cl, D, E, F y G, en donde el fragmento comprende al menos el 0,01% de la actividad proteolítica de la proteasa natural, preferiblemente

al menos el 5%, más preferiblemente al menos el 50%, especialmente al menos el 90%. Preferiblemente, la proteína transportadora y la proteasa proceden del mismo serotipo de neurotoxina de *C. botulinum*, especialmente preferido el dominio H<sub>N</sub> de la proteína transportadora y la proteasa proceden del serotipo A de la neurotoxina de *C. botulinum*. A las secuencias de las proteasas se puede acceder generalmente desde las bases de datos y los números de la base de datos se muestran en la Tabla 1. La actividad proteolítica de las proteasas está determinada por la cinética de escisión del sustrato (véase Binz et al. (2002), *Biochemistry* 41(6), 1717-23).

De acuerdo con otro ejemplo de la presente descripción, se proporciona un procedimiento para preparar la proteína transportadora. En una primera etapa, en esta memoria se proporciona un ácido nucleico que codifica la proteína transportadora. El ácido nucleico codificante puede ser ARN, ADN o mezclas de los mismos. El ácido nucleico también se puede modificar con respecto a su resistencia a la nucleasa, tal como, por ejemplo, mediante la incorporación de enlaces fosforotioato. El ácido nucleico se puede preparar a partir de un ácido nucleico inicial, en donde el ácido nucleico de partida es accesible, por ejemplo, por clonación a partir de genotecas genómicas o de ADNc. Además, el ácido nucleico se puede preparar directamente mediante síntesis en fase sólida. Los procedimientos adecuados son conocidos por los expertos en la técnica. Siempre que se parta de un ácido nucleico inicial, se puede realizar una modificación dirigida mediante una mutación dirigida al sitio, por ejemplo, que produce al menos una adición, inserción, delección y/o sustitución a nivel de aminoácidos. El ácido nucleico se une luego de manera funcional a un promotor adecuado. Los promotores adecuados para la expresión en sistemas de expresión conocidos son conocidos por los expertos en la técnica. La elección del promotor depende del sistema de expresión utilizado para la expresión. En general, se prefieren los promotores constitutivos, pero también se pueden utilizar los promotores inducibles. La estructura artificial preparada de ese modo comprende al menos parte de un vector, en particular elementos reguladores, en donde el vector se selecciona, por ejemplo, entre derivados de  $\lambda$ , adenovirus, baculovirus, virus vaccinia, virus SV40 y retrovirus. El vector preferiblemente es capaz de expresar el ácido nucleico en una célula hospedadora dada.

Además, la descripción proporciona células hospedadoras que contienen el vector y que son adecuadas para la expresión del vector. En la técnica anterior se conocen numerosos sistemas de expresión procariotas y eucariotas, seleccionándose las células hospedadoras, por ejemplo, a partir de células procariotas tales como *E. coli* o *B. subtilis*, a partir de células eucariotas tales como *S. cerevisiae* y *P. pastoris*. Aunque se pueden usar células eucariotas superiores, como células de insecto o células de mamífero, también se prefieren las células hospedadoras que, como *C. botulinum*, no tienen aparato de glicosilación.

De acuerdo con un ejemplo preferido, el ácido nucleico codifica el fragmento H<sub>C</sub> de la neurotoxina de *C. botulinum*. Este ácido nucleico contiene sitios de escisión para endonucleasas que flanquean el ácido nucleico que codifica el fragmento H<sub>C</sub>, en donde los sitios para las endonucleasas son compatibles con los de otros fragmentos H<sub>C</sub> de las neurotoxinas de *C. botulinum*, para permitir un intercambio modular sencillo en el gen que codifica la proteína transportadora, a la vez que se conserva la similitud de la secuencia de aminoácidos.

Siempre que se proporciona una composición de acuerdo con la descripción que contiene al menos una molécula intermedia además de la proteína transportadora, y esta molécula intermedia es un péptido o una proteína funcionalizada con una cisteína carboxilo-terminal o un grupo mercapto, entonces de una manera análoga a como se ha descrito anteriormente, el péptido o la proteína se producen de forma recombinante, por ejemplo, utilizando vectores binarios o a través de diferentes células hospedadoras. Siempre que se utiliza la misma célula hospedadora para la expresión tanto de la proteína transportadora como del péptido o proteína, preferiblemente se formará un enlace disulfuro intermolecular *in situ*. Para una producción más eficaz en la misma célula hospedadora, el ácido nucleico que codifica el péptido o la proteína también se puede traducir con el de la proteína transportadora en el mismo marco de lectura, de modo que se produce un polipéptido de cadena única. En ese caso, se forma preferiblemente un enlace disulfuro intramolecular *in situ*. Para una hidrólisis simple del enlace peptídico también existente entre la proteína transportadora y el péptido o proteína, se inserta una secuencia de aminoácidos, que es reconocida o se escinde específicamente por la proteasa trombina o una endoproteasa específica de la célula hospedadora, en el extremo amino terminal de la proteína transportadora.

Sorprendentemente, se ha encontrado que la secuencia insertada CXXXZKTKSLVPRGSKBXXC (SEQ ID NO: 1), en donde X es cualquier aminoácido y Z y B se seleccionan independientemente uno de otro entre alanina, valina, serina, treonina y glicina, se escinde con una proteasa endógena de un hospedador bacteriano, preferiblemente *E. coli*, de forma eficaz *in vivo*. La inserción de la secuencia insertada entre la secuencia de aminoácidos de la proteína transportadora y otro péptido o proteína tiene, por lo tanto, la ventaja de que no se requiere un procesamiento posterior adicional, como por ejemplo con trombina. Particularmente preferida es la cepa de *E. coli*, *E. coli* K12.

La secuencia insertada forma parte preferiblemente de un bucle que contiene preferiblemente 18-20 aminoácidos.

Si esto no es posible, después de una purificación separada de la proteína transportadora y la proteína, se puede producir posteriormente un enlace de disulfuro intermolecular correspondiente mediante procesos de oxidación conocidos por el experto en la materia. El péptido o la proteína también se pueden obtener directamente mediante síntesis o condensación de fragmentos. Los procedimientos correspondientes son conocidos por los expertos en la técnica.

La proteína transportadora y el péptido o la proteína se purifican posteriormente. En ese caso, se utilizan procedimientos conocidos de los expertos, tales como procedimientos de cromatografía o electroforesis.

Otro ejemplo de la presente descripción se refiere a la composición farmacéutica que contiene la proteína transportadora o una composición y, opcionalmente, un vehículo, un diluyente y/o un aditivo farmacéuticamente aceptable.

5 La composición farmacéutica es adecuada para una administración oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular y tópica. En esta memoria se prefiere la administración intramuscular. Una unidad de dosificación de la composición farmacéutica contiene aproximadamente 0,1 pg a 1 mg de proteína transportadora y/o la composición de acuerdo con la descripción.

10 La composición farmacéutica es adecuada para el tratamiento de trastornos de la liberación de neurotransmisores y enfermedades tales como, por ejemplo, espasmos hemifaciales, tortícolis espasmódica, blefaroespasma, espasticidad, distonías, migraña, dolores, enfermedades de la columna cervical y lumbar, estrabismo, hipersalivación, cicatrización de heridas, ronquidos y depresión.

15 Otro ejemplo de la presente descripción incluye una composición cosmética que contiene una proteína transportadora y un vehículo, un diluyente y/o un aditivo cosméticamente aceptable. La composición cosmética es adecuada para el tratamiento de hiperhidrosis y arrugas faciales.

Figura 1: Análisis de la unión *in vitro* de fragmentos H<sub>C</sub> de tipo silvestre y mutantes de BoNT/B en proteínas de fusión GST-Syt I y GST-Syt II truncadas, en presencia o ausencia de gangliósidos complejos mediante un ensayo de extracción con GST.

20 Figura 2: Análisis de la unión *in vitro* de fragmentos H<sub>C</sub> de tipo silvestre y mutantes de BoNT/G en proteínas de fusión GST-Syt I y GST-Syt II truncadas, en presencia o ausencia de gangliósidos complejos mediante un ensayo de extracción con GST.

Figura 3: Curva de dosis-respuesta de tipos silvestres de BoNT/B y G en el HDA. Las funciones de la potencia aplicadas permiten una comparación relativa de los tiempos de parálisis de los mutantes individuales con los de los tipos silvestres asociados.

25 Figura 4: Disminución y aumento de la neurotoxicidad de mutantes únicos de BoNT/B en comparación con el tipo silvestre en HDA.

Figura 5: Disminución y aumento de la neurotoxicidad de mutantes únicos de BoNT/G en comparación con el tipo silvestre en HDA.

Figura 6: Curvas de dosis-respuesta de tipos silvestres de BoNT/A y de mutantes únicos de BoNT/A en el HDA.

30 En detalle, la presente descripción incluye una proteína transportadora (Trapo) obtenida al modificar la HC de la neurotoxina producida por *C. botulinum*, que preferiblemente se une específicamente a las neuronas, y preferiblemente es captada intracelularmente por endocitosis mediada por receptor y que se transloca desde el compartimento endosómico ácido al citosol de las neuronas. Esta proteína se utiliza como un transportador para introducir en las células proteasas unidas a ella y otras sustancias que no pueden atravesar fisiológicamente la membrana plasmática y entrar en el citosol de las células nerviosas. Los sustratos de las proteasas son proteínas y péptidos localizados intracelularmente, que están implicados en la liberación de un transmisor. Después de la escisión de los sustratos, se bloquean las funciones específicas de las neuronas, pero las células en sí no se dañan. Una de esas funciones es la exocitosis, que consigue la liberación del neurotransmisor. Si se inhibe la liberación de transmisores, se bloquea la transmisión de señales de célula a célula. Por ejemplo, los músculos estriados se paralizan cuando la liberación de acetilcolina se inhibe en el lugar de contacto neuromuscular. Este efecto se puede usar terapéuticamente si la proteína transportadora se aplica en las terminaciones nerviosas de músculos espásticos o distónicos. Otras sustancias activas incluyen agentes con actividad antiviral. Conjugados con la proteína transportadora, son útiles para el tratamiento de infecciones virales del sistema nervioso. La presente descripción también se refiere al uso de una proteína transportadora para inhibir la liberación de neurotransmisores.

45 Las proteínas transportadoras con menor afinidad se unen a las células nerviosas, pero no son captadas por las mismas. Esas proteínas de transporte, por lo tanto, son adecuadas como transportadores específicos hasta la superficie de las células nerviosas.

50 Cuando los pacientes son tratados con las toxinas progenitoras A y B de *C. botulinum*, entonces la inyección de estas proteínas no humanas causa, a pesar de la dosis baja, una formación de anticuerpos, de manera que la terapia queda sin efecto y se debe interrumpir, por lo tanto, para evitar finalmente un choque anafiláctico. Al aplicar una sustancia con el mismo mecanismo de acción con una mayor eficacia del transporte de la actividad enzimática, la dosis se puede reducir drásticamente y no se producirán anticuerpos. Estas propiedades se atribuyen a la proteína transportadora descrita en esta memoria.

Aunque se proporcionan ejemplos para la aplicación, generalmente el médico encargado determinará individualmen-

te el modo apropiado de administración y de dosificación. Tales decisiones las toma habitualmente cualquier médico experto en la materia. Por ejemplo, se puede seleccionar así el modo de aplicación y la dosificación de la neurotoxina de acuerdo con la descripción expuesta en el presente documento, basándose en criterios tales como la solubilidad de la neurotoxina seleccionada o la intensidad del dolor que se va a tratar.

5 En la actualidad, el intervalo de tratamiento para las toxinas progenitoras naturales A y B procedentes de *C. botulinum* es por regla general de tres a cuatro meses. Una prolongación de ese intervalo reduciría el riesgo de formación de anticuerpos y permitiría una mayor duración del tratamiento con BoNT. El aumento de LC en el citosol prolongaría su tiempo de degradación y, por lo tanto, prolongaría la duración de la acción. La proteína transportadora descrita en esta memoria tiene una afinidad y tasa de absorción más altas que la HC natural.

10 El siguiente ejemplo es solo para fines ilustrativos y no debe interpretarse como limitativo.

#### Materiales y métodos

##### Construcción de plásmidos y producción de proteínas recombinantes

15 Los plásmidos para la expresión en *E. coli* de fragmentos H<sub>C</sub> recombinantes de BoNT/B y BoNT/G así como la forma de longitud completa de BoNT/A, B y G con un marcador Strep en el extremo carboxilo terminal para la purificación por afinidad, se prepararon mediante métodos de PCR con cebadores adecuados, ADN cromosómico que codifica BoNT/A (AAA23262) BoNT/B (AAA23211) y BoNT/G (CAA52275) y el vector de expresión pQe3 (Qiagen AG) como vector de partida. Las variantes truncadas de sinaptotagmina I de rata (Syt I) (aminoácidos 1-53, aminoácidos 1-82) y de sinaptotagmina II de rata (Syt II) (aminoácidos 1-61, aminoácidos 1-90) se clonaron dentro del vector que codifica GST, pGEX- 2T (Amersham Biosciences AB). Las secuencias de ácido nucleico de todos los plásmidos se confirmaron mediante secuenciación del ADN. Los fragmentos H<sub>C</sub> recombinantes y la forma de longitud completa de BoNT se prepararon en la cepa de *E. coli* M15 [pRep4] (Qiagen) durante una inducción de 10 horas a temperatura ambiente y se purificaron en una matriz de StrepTactin (IBA GmbH) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las proteínas de fusión de GST obtenidas a partir de *E. coli* BL21 se aislaron con ayuda de glutatión inmovilizado en perlas de sefarosa. Las fracciones que contenían las proteínas deseadas se agruparon y se dializaron frente a tampón Tris-NaCl-Triton (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,5%, pH 7,2).

##### Ensayo de extracción con GST

30 Las proteínas de fusión con GST (0,12 nmol cada una) inmovilizadas sobre 10 µl de perlas de GT-sefarosa, se incubaron con fragmentos H<sub>C</sub> (0,1 nmol) en ausencia o presencia de una mezcla de gangliósidos de cerebro bovino (18% de GM1, 55% de GD1a, 10% de GT1b, 2% de otros gangliósidos, Calbiochem, 20 µg de cada uno) en un volumen total de 180 µl de tampón Tris-NaCl-Triton durante 2 horas a 4°C. Las perlas se recogieron por centrifugación, el material sobrenadante se eliminó y las perlas separadas se lavaron tres veces cada una con 400 µl del mismo tampón. Las fracciones de sedimento lavadas se hirvieron en tampón de muestra de SDS y se analizaron junto con las fracciones del material sobrenadante mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.

35 El tipo silvestre de BoNT/B se une solo en presencia de gangliósidos complejos y la sinaptotagmina I con dominio transmembranal, mientras que la sinaptotagmina II se une tanto con o sin dominio transmembranal, así como en presencia o ausencia de gangliósidos complejos. La sustitución dirigida de aminoácidos en el sitio de unión del receptor de proteína de BoNT/B podía aumentar significativamente la interacción con ambas moléculas de sinaptotagmina (E1191L; Y1183L) o disminuirla (V1118D; K1192E), respectivamente (Figura 1).

40 Para el tipo silvestre de BoNT/G, se mostró que la unión a sinaptotagmina I y sinaptotagmina II, con o sin dominio transmembranal, se producía tanto en presencia como en ausencia de gangliósidos complejos. Mediante una sustitución dirigida de aminoácidos homólogos a BoNT/B dentro del sitio de unión del receptor de proteína de BoNT/G, la interacción con ambas moléculas de sinaptotagmina se podía mejorar significativamente (Y1262F) o disminuir (Q1200E), respectivamente (Figura 2).

45 Mediante una comprobación de la unión de los fragmentos H<sub>C</sub> recombinantes de BoNT/B y G a gangliósidos inmovilizados e aislados, se podía excluir un daño de la función del bolsillo de unión de gangliósidos adyacente mediante las mutaciones introducidas en el bolsillo de unión de Syt y sacar conclusiones suficientes sobre una estructura terciaria intacta del fragmento H<sub>C</sub>. Estos resultados están respaldados por análisis espectroscópicos con CD así como por experimentos de desnaturalización térmica, que también muestran estructuras terciarias intactas de los fragmentos H<sub>C</sub> mutados de BoNT/B y G.

##### 50 Ensayo de hemidiafragma en ratón (HDA)

La neurotoxicidad de las mutaciones BoNT/A, B y G se determinó según lo descrito por Habermann et al., Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311 (1980), 33-40.

55 La potencia de la forma de longitud completa de los tipos silvestres de BoNT/A, B y G se determinó en el HDA mediante una curva de dosis-respuesta (Figuras 3 y 6). Posteriormente, se determinó la potencia de las diversas formas de longitud completa de mutantes únicos de BoNT/A, B y G en el HDA (Figura 6) y se relacionó con la potencia de

- los tipos silvestres de BoNT/B y G mediante una función de potencia aplicada (Figuras 4 y 5). Por lo tanto, la sustitución de los aminoácidos valina 1118 por aspartato o lisina 1192 por glutamato en BoNT/B conduce a una reducción drástica de la potencia a <2%. En contraste, la mutación de la tirosina 1183 a leucina o arginina, aumenta significativamente la potencia de BoNT/B (Figura 4). La modificación de la tirosina 1256 a fenilalanina en BoNT/G también produce un aumento de la potencia, mientras que la mutación de la glutamina 1200 a glutamato, lisina o tirosina causa una fuerte disminución de la potencia de BoNT/G (Figura 5). En el caso de BoNT/A, la modificación de la serina 1207 a arginina o tirosina produce un aumento en la potencia, mientras que la mutación de la lisina 1260 a glutamato causa una reducción drástica de la potencia de BoNT/A (Figura 6).
- Otros objetos descritos se exponen a continuación.
- 10 1. Una proteína transportadora obtenible mediante una modificación de la cadena pesada de la neurotoxina formada por *Clostridium botulinum*, en donde
    - (i) la proteína se une a las células nerviosas con una afinidad mayor o menor que la neurotoxina natural;
    - (ii) la proteína presenta una neurotoxicidad mayor o menor en comparación con la neurotoxina natural; preferiblemente, la neurotoxicidad se determina en un ensayo de hemidiafragma; y/o
    - 15 (iii) la proteína presenta una menor afinidad frente a los anticuerpos neutralizantes que en comparación con la neurotoxina natural.
  - 20 2. La proteína transportadora de acuerdo con 1, en donde el anticuerpo neutralizante evita la unión de la neurotoxina natural al receptor de proteína o al receptor de gangliósido y/o la captación de la neurotoxina en la célula nerviosa.
  3. La proteína transportadora de acuerdo con 1 o 2, en donde la proteína transportadora es captada mediante endocitosis en las células.
  4. La proteína transportadora de acuerdo con uno de 1 a 3, en donde la proteína se une específicamente a las moléculas asociadas a la membrana plasmática, proteínas transmembranales, proteínas de vesículas sinápticas, proteínas de la familia sinaptotagmina o glicoproteínas de vesículas sinápticas 2 (SV2), y/o sinaptotagmina I y/o sinaptotagmina II (motoneurona colinérgica) y/o SV2A, SV2B o SV2C, preferiblemente sinaptotagmina I humana y/o sinaptotagmina II humana y/o SV2A, SV2B o SV2C humanas.
  - 25 5. La proteína transportadora de acuerdo con uno de 1 a 4, en donde la proteína tiene al menos un 15% más de afinidad o al menos un 15% menos de afinidad que la neurotoxina natural, preferiblemente al menos un 50%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90%.
  - 30 6. La proteína transportadora de acuerdo con uno de 1 a 5, en donde el fragmento H<sub>C</sub> de la proteína transportadora tiene al menos una sustitución y/o una deleción y/o una inserción y/o una adición y/o modificaciones postraduccionales de aminoácidos que son de origen natural o no natural y que aumentan o disminuyen la afinidad hacia la neurotoxina natural.
  7. La proteína transportadora de acuerdo con uno de 1 a 6, en donde la neurotoxina es la neurotoxina botulínica con serotipo A a G.
  - 35 8. La proteína transportadora de acuerdo con 7, en donde al menos un aminoácido en las posiciones de aminoácidos
    - 867 hasta 1296 de la neurotoxina de serotipo A de *Clostridium botulinum*,
    - 866 hasta 1291 de la neurotoxina de serotipo B de *Clostridium botulinum*,
    - 864 a 1291 o 1280 de la neurotoxina de serotipo C1 de *Clostridium botulinum*,
    - 40 860 a 1276 o 1285 de la neurotoxina de serotipo D de *Clostridium botulinum*,
    - 843 a 1251 o 1252 de la neurotoxina de serotipo E de *Clostridium botulinum* o *Clostridium butyricum*,
    - 861 a 1274, 862 a 1280 y 1278 y 854 a 1268 de la neurotoxina de serotipo F de *Clostridium botulinum* o *Clostridium baratii*,
    - 861 a 1297 de la neurotoxina de serotipo G de *Clostridium botulinum*,
  - 45 está modificado después de la traducción, y/o añadido, y/o delecionado, y/o insertado y/o sustituido por aminoácidos que son de origen natural o no natural.
  9. La proteína transportadora de acuerdo con uno de 1 a 8, en donde la neurotoxina natural es una neurotoxina con serotipo A y, preferiblemente, la proteína transportadora se une a las glicoproteínas 2 de vesículas sinápticas (SV2), más preferiblemente a SV2A, SV2B o SV2C.

- 5 10. La proteína transportadora de acuerdo con 9, en la que al menos un aminoácido en las posiciones de treonina 1195, asparagina 1196, glutamina 1199, lisina 1204, isoleucina 1205, leucina 1206, serina 1207, leucina 1209, aspartato 1213, leucina 1217, fenilalanina 1255, asparagina 1256, isoleucina 1258 y/o lisina 1260 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina botulínica de serotipo A se modifica de forma postraducciona y/o se añade y/o se delecciona y/o se inserta y/o se sustituye por un aminoácido que es de origen natural o no natural.
11. La proteína transportadora de acuerdo con 10, en donde al menos un aminoácido en las posiciones de asparagina 1196, glutamina 1199, serina 1207, fenilalanina 1255, isoleucina 1258 y/o lisina 1260 se modifica postraduccionalmente, y/o se añade, y/o se delecciona, y/o se inserta, y/o se sustituye por un aminoácido que es de origen natural o no natural.
- 10 12. La proteína transportadora de acuerdo con uno de 10 u 11, en donde el aminoácido serina en la posición 1207 se reemplaza por arginina o tirosina.
13. La proteína transportadora de acuerdo con uno de 10 u 11, en donde el aminoácido lisina en la posición 1260 se reemplaza por glutamato.
- 15 14. La proteína transportadora de acuerdo con uno de 1 a 8, en donde la neurotoxina es una neurotoxina botulínica de serotipo B y, preferiblemente, la proteína transportadora se une a la sinaptotagmina I o II.
- 20 15. La proteína transportadora de acuerdo con 14, en la que al menos un aminoácido en las posiciones de lisina 1113, aspartato 1114, serina 1116, prolina 1117, valina 1118, treonina 1182, tirosina 1183, fenilalanina 1186, lisina 1188, glutamato 1191, lisina 1192, leucina 1193, fenilalanina 1194, fenilalanina 1204, fenilalanina 1243, glutamato 1245, lisina 1254, aspartato 1255 y tirosina 1256 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina botulínica de serotipo B se modifica de forma postraducciona y/o se añade y/o se delecciona y/o se inserta y/o se sustituye por un aminoácido que tiene origen natural o no natural.
- 25 16. La proteína transportadora de acuerdo con 15, en donde al menos un aminoácido en las posiciones de valina 1118, tirosina 1183, glutamato 1191, lisina 1192, glutamato 1245 y/o tirosina 1256 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina botulínica de serotipo B se modificada postraduccionalmente, y/o se añade y/o se delecciona y/o se inserta y/o se sustituye por un aminoácido, que tiene origen natural o no natural.
17. La proteína transportadora de acuerdo con 16, en donde el aminoácido tirosina en la posición 1183 está sustituido por leucina.
18. La proteína transportadora de acuerdo con 16, en donde el aminoácido glutamato en la posición 1191 está sustituido por leucina.
- 30 19. La proteína transportadora de acuerdo con uno de 1 a 8, en donde la neurotoxina es neurotoxina botulínica de serotipo G.
- 35 20. La proteína transportadora de acuerdo con 19, en donde al menos un aminoácido en las posiciones de fenilalanina 1121, lisina 1123, alanina 1124, serina 1125, metionina 1126, valina 1190, leucina 1191, serina 1194, glutamato 1196, treonina 1199, glutamina 1200, leucina 1201, fenilalanina 1202, fenilalanina 1212, fenilalanina 1248, lisina 1250, aspartato 1251 y tirosina 1262 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina botulínica de serotipo G se modifica postraduccionalmente, y/o se añade y/o se delecciona y/o se inserta y/o se sustituye por un aminoácido, que tiene origen natural o no natural.
- 40 21. La proteína transportadora de acuerdo con 20, en donde al menos un aminoácido en las posiciones de metionina 1126, leucina 1191, treonina 1199, glutamina 1200, lisina 1250 y tirosina 1262 de las secuencias de proteínas de la neurotoxina botulínica de serotipo G se modifica postraduccionalmente, y/o se añade y/o se delecciona y/o se inserta y/o se sustituye por un aminoácido, que tiene origen natural o no natural.
22. La proteína transportadora de acuerdo con 21, en donde el aminoácido tirosina en la posición 1262 está sustituido por fenilalanina.
- 45 23. Una composición que comprende una proteína transportadora de acuerdo con uno de 1 a 22 y al menos una molécula intermedia.
24. La composición de acuerdo con 23, en donde la molécula intermedia está unida covalentemente a la proteína transportadora a través de un enlace peptídico, un enlace éster, un enlace éter, un enlace sulfuro, un enlace disulfuro o un enlace carbono-carbono.
- 50 25. La composición de acuerdo con 23 o 24, en donde la molécula intermedia es una molécula orgánica pequeña, un péptido o una proteína.
26. La composición de acuerdo con 25, en donde la molécula orgánica pequeña es un agente viroestático, citostático, un antibiótico o una inmunoglobulina.

27. La composición de acuerdo con 25, en donde la proteína es una proteasa.
28. La composición de acuerdo con 27, en donde la proteasa comprende una o varias cadenas ligeras (LC) con los serotipos A, B, Cl, D, E, F y/o G de la neurotoxina de *Clostridium botulinum*.
- 5 29. La composición de acuerdo con 27, en donde la proteasa contiene un fragmento proteolíticamente activo obtenido a partir de la cadena ligera (LC) de los serotipos A, B, Cl, D, E, F y/o G de la neurotoxina de *Clostridium botulinum* y que se caracteriza porque tiene al menos el 0,01% de la actividad proteolítica de la proteasa natural, preferiblemente al menos el 50%.
30. La composición de acuerdo con 28 y 29, en donde la proteasa escinde específicamente determinados sustratos dentro de la motoneurona colinérgica.
- 10 31. La composición de acuerdo con 30, en donde los sustratos seleccionados son de proteínas implicadas en la liberación de neurotransmisores en las células nerviosas y proteínas que son capaces de reacciones catalíticas dentro de la célula nerviosa.
32. La composición de acuerdo con 28 y 29, en donde la proteasa y la proteína transportadora están unidas covalentemente a través de una secuencia de aminoácidos que es reconocida específicamente y es escindida por una endopeptidasa.
- 15 33. La composición de acuerdo con 32, en donde la secuencia de aminoácidos comprende la secuencia CXXXZKTKSLVPRGSKBXXC, en la que X es cualquier aminoácido y Z y B se seleccionan independientemente uno de otro entre alanina, valina, serina, treonina y glicina.
34. La composición de acuerdo con 32, en donde después de la escisión con la endopeptidasa, un puente disulfuro une la proteasa y la proteína transportadora, lo que a su vez conduce a la formación de una holotoxina activa.
- 20 35. Una composición farmacéutica que comprende la proteína transportadora de acuerdo con uno de 1 a 22 o la composición de acuerdo con uno de 23 a 34, así como opcionalmente un vehículo, un diluyente y/o un aditivo farmacéuticamente aceptable.
36. Uso de la composición farmacéutica de acuerdo con 35 para el tratamiento de trastornos y enfermedades para los cuales está indicada una terapia con neurotoxina botulínica.
- 25 37. Uso de acuerdo con 36, en donde el trastorno o la enfermedad es uno de los siguientes: espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica, blefaroespasmo, espasticidad, distonías, migraña, dolores, enfermedades de la columna cervical y lumbar, estrabismo, hipersalivación, ronquido, cicatrización de heridas y enfermedades depresivas.
38. Una composición cosmética que contiene la proteína transportadora de acuerdo con uno de 1 a 22 o la composición de acuerdo con uno de 23 a 34, y opcionalmente un vehículo, un diluyente y/o un aditivo cosméticamente aceptable.
- 30 39. Uso de una composición cosmética de acuerdo con 38 para el tratamiento de las indicaciones cosméticas hiperhidrosis y arrugas faciales.
40. Un procedimiento para la preparación de una proteína transportadora de acuerdo con uno de 1 a 22 o una composición de acuerdo con 23 a 34 mediante recombinación de acuerdo con procedimientos conocidos.
- 35 41. Un procedimiento para la preparación de la proteína transportadora de acuerdo con 40, en donde el gen del fragmento H<sub>C</sub> está flanqueado por dos sitios de corte de endonucleasas de restricción contenidos en ácidos nucleicos, siendo compatibles los sitios de corte de las endonucleasas de restricción con los de los otros fragmentos H<sub>C</sub> de las neurotoxinas de *Clostridium botulinum* para permitir su intercambio modular sencillo a la vez que conserva la similitud de la secuencia de aminoácidos.
- 40 42. Un procedimiento para la preparación de la composición de acuerdo con 40, en donde el gen de la proteasa está flanqueado por dos sitios de corte de endonucleasas de restricción contenidos en ácidos nucleicos, en donde los sitios de corte de las endonucleasas de restricción son compatibles con los de los otros dominios de proteasa procedentes de neurotoxinas de *Clostridium botulinum* para permitir su intercambio modular sencillo a la vez que conserva la similitud de la secuencia de aminoácidos.
- 45 43. Una célula hospedadora que contiene un vector de expresión recombinante, en donde el vector de expresión codifica una proteína transportadora de acuerdo con 1 a 22 o una composición de acuerdo con uno de 23 a 34.
44. La célula hospedadora de acuerdo con 43, en donde la célula hospedadora puede ser una célula de *Escherichia coli*, en particular *E. coli* K12, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* o *Bacillus megaterium*.
- 50 45. Un vector de expresión, en donde el vector comprende un ácido nucleico que codifica una proteína transportadora de acuerdo con uno de 1 a 22 o una composición de acuerdo con uno de 23 a 34.

**Lista de secuencias**

<110> Ipsen Bioinnovation Limited  
 <120> Vehículo dirigido a dianas de células nerviosas  
 <130> P40113EP-D2-PCT  
 5 <150> DE 20051019302  
 <151> 26-04-2005  
 <160> 1  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 10 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sitio de escisión  
 15 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (2)..(4)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente en la naturaleza  
 <220>  
 20 <221> característica\_misc  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa se puede seleccionar a partir de alanina, valina, serina, treonina y glicina  
 <220>  
 25 <221> característica\_misc  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa se puede seleccionar a partir de alanina, valina, serina, treonina y glicina  
 <220>  
 30 <221> característica\_misc  
 <222> (18)..(19)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente en la naturaleza  
 <400> 1  
 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Thr Lys Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Xaa Xaa Xaa Cys  
 20

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína transportadora, que comprende una cadena pesada modificada de la neurotoxina que tiene el número de base de datos AAA23211 que está formada por el serotipo B de *Clostridium botulinum*, en donde el aminoácido en la posición glutamato 1191 se reemplaza por leucina.
- 5 2. Una composición farmacéutica que contiene la proteína transportadora según la reivindicación 1.
3. La composición farmacéutica según la reivindicación 2 así como un vehículo, un diluyente y/o un aditivo farmacéuticamente aceptable.
4. La composición farmacéutica según la reivindicación 2 o 3, para uso en el tratamiento de trastornos y enfermedades para los que está indicada una terapia con la neurotoxina botulínica.
- 10 5. Una composición cosmética que contiene la proteína transportadora según la reivindicación 1.
6. Una composición cosmética según la reivindicación 5 así como un vehículo, un diluyente y/o un aditivo cosméticamente aceptable.
7. Uso de una composición cosmética según la reivindicación 5 o 6, para el tratamiento de las indicaciones cosméticas hiperhidrosis y arrugas faciales.
- 15 8. Un procedimiento para la preparación de una proteína transportadora según la reivindicación 1, que comprende:
  - i. poner a disposición un ácido nucleico que codifica una proteína transportadora;
  - ii. preparar una estructura artificial ligando el ácido nucleico con un promotor adecuado; y
  - iii. expresar la estructura artificial en una célula hospedadora adecuada.
- 20 9. Una célula hospedadora que contiene un vector de expresión recombinante, en donde el vector de expresión codifica una proteína transportadora según la reivindicación 1.
10. La célula hospedadora según la reivindicación 9, en donde la célula hospedadora procede de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* o *Bacillus megaterium*.
11. La célula hospedadora según la reivindicación 10, en donde la célula hospedadora es una célula de *Escherichia coli* K 12.
- 25 12. Un vector de expresión, en donde el vector comprende un ácido nucleico que codifica una proteína transportadora según la reivindicación 1.

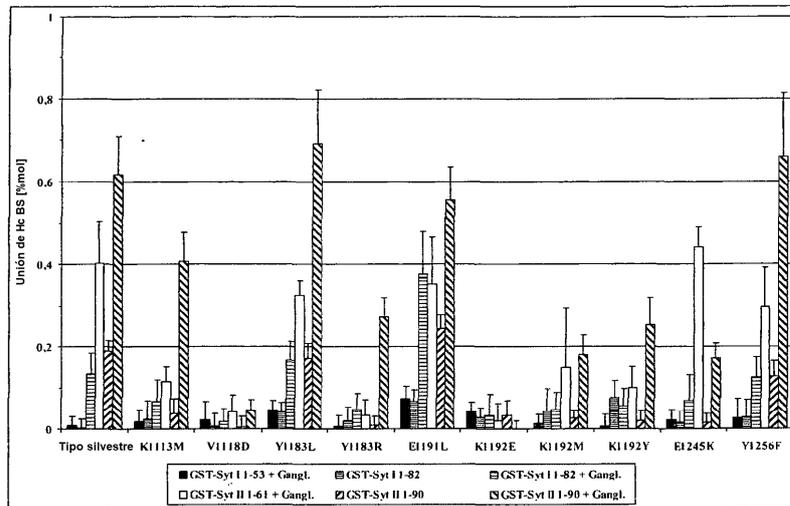


Figura 1

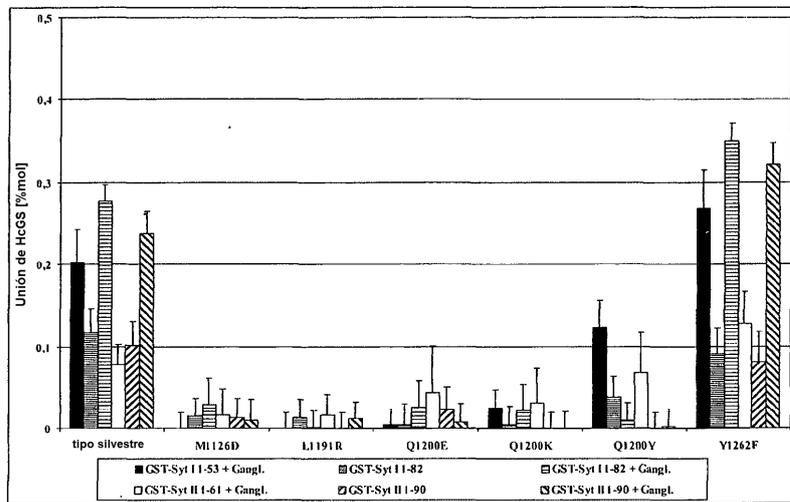


Figura 2

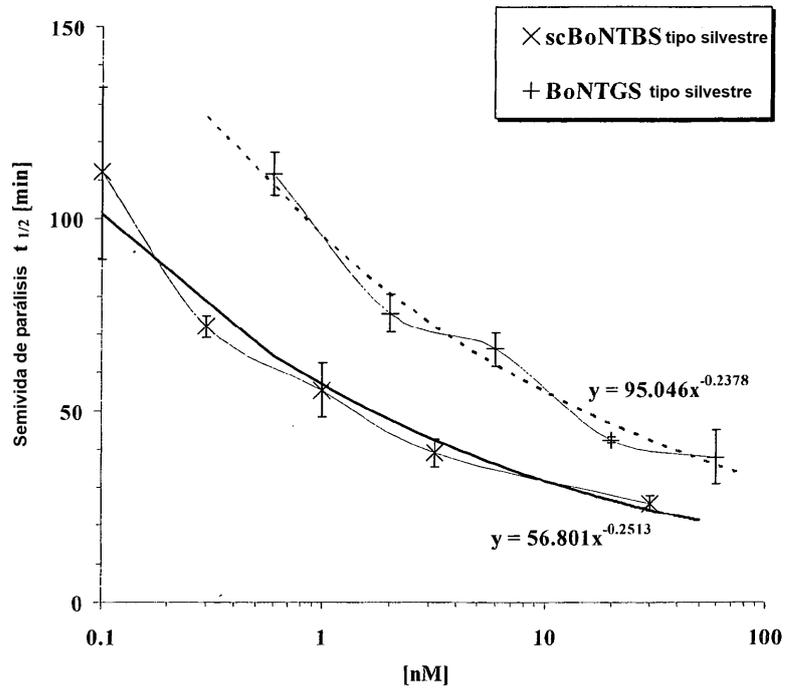
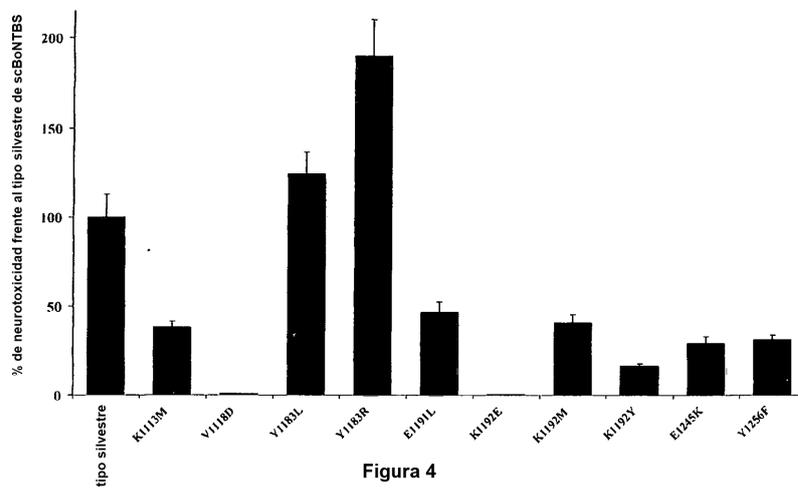


Figura 3



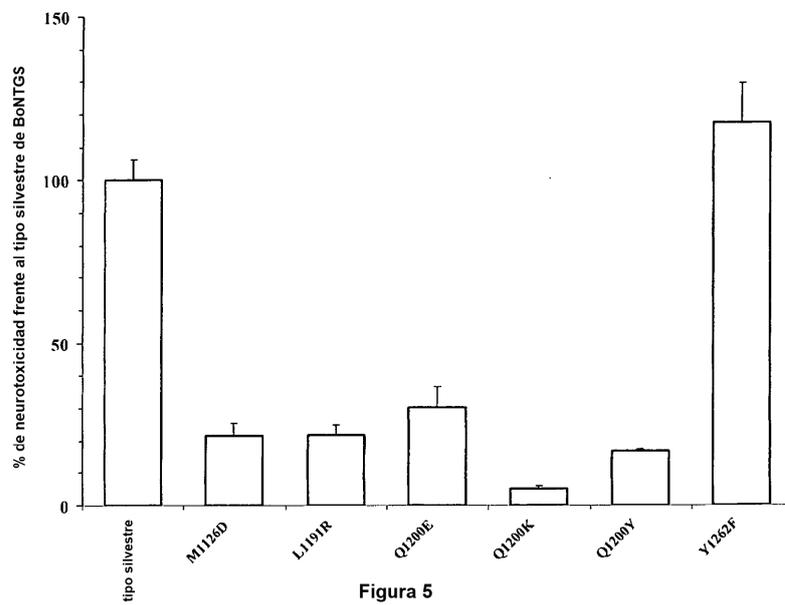


Figura 5

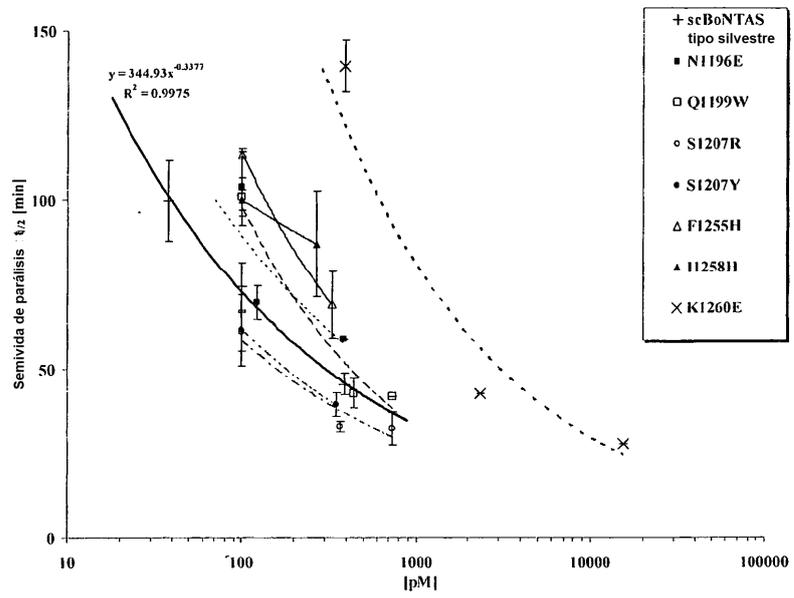


Figura 6