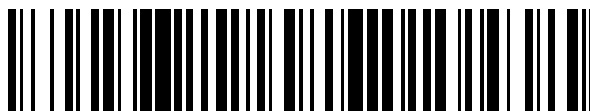


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 049**

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2015** **PCT/GB2015/051250**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015** **WO15166242**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2015** **E 15721027 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019** **EP 3137621**

54 Título: **Fabricación de neurotoxinas recombinantes de Clostridium botulinum**

30 Prioridad:

29.04.2014 GB 201407525

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

18.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

PALAN, SHILPA;
LIU, SAI MAN y
HACKETT, GAVIN STEPHEN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 749 049 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

Fabricación de neurotoxinas recombinantes de *Clostridium botulinum*

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para producir neurotoxinas recombinantes de *Clostridium botulinum* (C. botulinum) del serotipo A (BoNT/A).

Antecedentes de la invención

La neurotoxina botulínica (BoNT) es producida por C. botulinum en forma de un gran complejo proteico, que consiste en el propio BoNT complejoado con varias proteínas accesorias. Actualmente existen al menos siete clases diferentes de neurotoxina botulínica, a saber: serotipos de neurotoxina botulínica A, B, C1, D, E, F y G, todos los cuales comparten estructuras y modos de acción similares. Recientemente se ha informado de un posible octavo serotipo, H, pero la secuencia aún no se ha publicado. Se pueden distinguir diferentes serotipos de BoNT en función de la inactivación por antisueros neutralizantes específicos, y dicha clasificación por serotipo se correlaciona con el porcentaje de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos. Las proteínas BoNT de un serotipo dado se dividen adicionalmente en diferentes subtipos en función de la identidad de secuencia de porcentaje de aminoácidos.

Las BoNT son las toxinas más potentes conocidas, con valores de dosis letal media (LD₅₀) para ratones que varían de 0,5 a 5 ng/kg dependiendo del serotipo. Las BoNT se adsorben en el tracto gastrointestinal y, después de ingresar en la circulación general, se unen a la membrana presináptica de los terminales nerviosos colinérgicos y evitan la liberación del neurotransmisor acetilcolina. BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F y BoNT/G escinden sinaptobrevina/proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP); BoNT/C, BoNT/A y BoNT/E escinden la proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa (SNAP-25); y BoNT/C escinde la sintaxina.

En la naturaleza, las neurotoxinas clostridiales se sintetizan como un polipéptido monocatenario que se modifica después de la traducción mediante un evento de escisión proteolítica para formar dos cadenas de polipéptidos unidas por un enlace disulfuro. La escisión ocurre en un sitio de escisión específico, a menudo denominado sitio de activación, que se encuentra entre los residuos de cisteína que proporcionan el enlace disulfuro entre cadenas. Esta forma bicatenaria es la forma activa de la toxina. Las dos cadenas se denominan la cadena pesada (cadena H), que tiene una masa molecular de aproximadamente 100 kDa, y la cadena ligera (cadena L o LC), que tiene una masa molecular de aproximadamente 50 kDa. La cadena H comprende un componente de direccionamiento C-terminal (dominio H_C) y un componente de translocación N-terminal (dominio H_N). El sitio de escisión se encuentra entre la cadena L y los componentes de translocación, en una región de bucle expuesta (ver Tabla 1). Después de la unión del dominio H_C a su neurona diana y la internalización de la toxina unida a la célula a través de un endosoma, el dominio H_N transloca la cadena L a través de la membrana endosómica y al citosol, y la cadena L proporciona una función de proteasa (también conocida como una proteasa no citotóxica).

Las proteasas no citotóxicas actúan escindiendo proteolíticamente las proteínas de transporte intracelular conocidas como proteínas SNARE (por ejemplo, SNAP-25, VAMP o sintaxina), véase Gerald K (2002) "Cell and Molecular Biology" (4ª edición) John Wiley & Sons, Inc. El acrónimo SNARE deriva del término receptor de unión NSF soluble, donde NSF significa factor sensible a N-etilmaleimida. Las proteínas SNARE son integrales para la fusión de vesículas intracelulares y, por lo tanto, para la secreción de moléculas a través del transporte de vesículas desde una célula. La función de proteasa es una actividad endopeptidasa dependiente de zinc y exhibe una alta especificidad de sustrato por proteínas SNARE. En consecuencia, una vez administrada a una célula diana deseada, la proteasa no citotóxica es capaz de inhibir la secreción celular de la célula diana. Las proteasas de la cadena L de las neurotoxinas clostridiales son proteasas no citotóxicas que escinden las proteínas SNARE.

Las neurotoxinas botulínicas son bien conocidas por su capacidad de causar una parálisis muscular flácida. Dichas propiedades relajantes musculares han llevado a la utilización de neurotoxinas botulínicas (como BoNT/A) en una variedad de procedimientos médicos y cosméticos, incluido el tratamiento de líneas glabellares o líneas faciales hiperinéticas, dolor de cabeza, espasmo hemifacial, hiperactividad de la vejiga, hiperhidrosis, líneas nasolabiales, distonía cervical, blefaroespasma y espasticidad.

Tradicionalmente, la producción de BoNT se realizaba mediante cultivo de bacterias C. botulinum, seguido de aislamiento y purificación del complejo de neurotoxinas botulínicas. Sin embargo, la producción de BoNT de esta manera es ineficiente y proporciona bajos rendimientos de proteínas. Además, C. botulinum son bacterias formadoras de esporas y, por lo tanto, requieren equipos e instalaciones de cultivo especializados, que no son necesarios para el cultivo de bacterias como Escherichia coli (E. coli). El uso creciente de BoNT condujo al desarrollo de métodos alternativos para producir y purificar BoNT. En particular, se han desarrollado métodos para producir BoNT utilizando E. coli.

La purificación de CNT de la solución de fermentación (ya sea utilizando C. botulinum o E. coli) es un desafío particular, ya que las neurotoxinas están contenidas como una mezcla de polipéptidos no procesados, parcialmente procesados y totalmente procesados, todos los cuales tienen propiedades bioquímicas y físicas muy similares. Las neurotoxinas parcialmente procesadas se generan típicamente si la actividad endoproteolítica ha hidrolizado el

enlace peptídico entre la cadena ligera y el bucle, mientras que el enlace peptídico entre el bucle y el extremo N de la cadena pesada todavía está intacto. Además, la neurotoxina parcialmente procesada también se puede crear si la actividad endoproteolítica ha liberado el péptido del bucle de la cadena pesada, mientras que el enlace peptídico entre el péptido del bucle y el extremo C de la cadena ligera aún no se ha hidrolizado.

- 5 Dependiendo de las condiciones de fermentación y el tipo de neurotoxina, el polipéptido completamente procesado que carece del péptido de bucle puede contaminarse significativamente, con entre el 5% y el 90% de polipéptido parcialmente procesado o sin procesar. En algunos casos, la neurotoxina no se procesa principalmente y, antes del uso terapéutico, debe tratarse con una endopeptidasa para que sea biológicamente activa.

- 10 La técnica anterior describe varios intentos de tratar las neurotoxinas clostridiales con proteasas heterólogas para reducir la cantidad de proteína precursora no procesada o parcialmente procesada. La proteasa más utilizada para la activación de neurotoxinas clostridiales, la tripsina, a la vez que es útil para activar las neurotoxinas clostridiales de los serotipos B (BoNT/B) y E (BoNT/E), parece producir productos secundarios, presumiblemente por acción proteolítica cerca del extremo C de la subunidad pesada de BoNT/A y, por lo tanto, parece destruir la unión de toxinas a su receptor celular. Teóricamente se esperan productos de escisión más específicos a partir de proteasas endógenas, aisladas del huésped nativo, como BoNT/A que produce *C. botulinum*.

- 15 Los presentes inventores han identificado previamente varias proteasas, tales como proteasas endógenas de *C. botulinum* y proteasas exógenas, incluida la proteasa endoproteinasa Lys-C (Lys-C) (que está disponible comercialmente y puede aislarse de *Lysobacter enzymogenes*). Sin embargo, aunque la escisión de BoNT/A recombinante por esta endoproteinasa refleja con mayor precisión la escisión nativa, el uso de Lys-C plantea nuevas consideraciones prácticas. En particular, después de la escisión de BoNT/A recombinante, Lys-C puede permanecer activa en la mezcla de reacción durante días. Por lo tanto, los medios y métodos para reducir la cantidad de Lys-C en el producto final y así mejorar la calidad de las preparaciones de neurotoxinas son altamente deseables pero aún no están disponibles.

- 20 Por lo tanto, un problema técnico subyacente a la presente invención puede verse como el suministro de medios y métodos para mejorar la producción de polipéptidos de neurotoxinas al cumplir con las necesidades antes mencionadas. Específicamente, existe una necesidad en la técnica de métodos mejorados para producir BoNT recombinantes, en particular BoNT/A recombinante bicatenaria activada.

El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y en el presente documento a continuación.

30 **Compendio de la invención**

- La producción de subserotipos recombinantes de BoNT/A se puede lograr mediante la expresión en *Escherichia coli* como un polipéptido único, en el presente documento denominado proteínas de BoNT/A monocatenaria. Tras el aislamiento de esta proteína monocatenaria por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC), la proteína monocatenaria se debe escindir para formar la toxina activa, que es una proteína bicatenaria unida por un enlace disulfuro único.

- Los presentes inventores han encontrado previamente que los subserotipos de BoNT/A monocatenaria recombinantes pueden escindirse usando la proteasa endoproteinasa Lys-C (Lys-C) para producir la neurotoxina de proteína BoNT/A bicatenaria activa, es decir, un heterodímero de las cadenas ligera y pesada de BoNT/A. Se determinó que el sitio de escisión de Lys-C era idéntico a la proteína endógena mediante secuenciación N-terminal y espectrometría de masas. Por lo tanto, la producción de la proteína BoNT/A bicatenaria activa usando Lys-C es ventajosa, ya que da como resultado la producción de una BoNT/A bicatenaria activa auténtica, es decir, una BoNT/A bicatenaria activa que es esencialmente idéntica a la BoNT/A bicatenaria activa nativa. Por el contrario, la tripsina, otra proteasa común utilizada para producir proteínas BoNT bicatenarias activas, escinde al menos un sitio adicional dentro de la secuencia de BoNT/A monocatenarias. Esta división adicional reduce la potencia de la proteína BoNT/A bicatenaria activa producida.

Una vez que la proteína BoNT/A monocatenaria ha sido escindida por Lys-C, la proteína BoNT/A bicatenaria activa requiere purificación para eliminar las proteínas de la célula huésped restantes y la proteasa Lys-C para producir el producto puro final.

- 50 En particular, a partir de las pruebas de escisión de la endoproteinasa Lys-C, los inventores han descubierto que Lys-C escinde BoNT/A1 recombinante (rBoNT/A1) en concentraciones muy bajas y permaneció activa durante un período de días. En consecuencia, es importante desarrollar un método que pueda purificar esta proteasa lejos de la toxina activada.

- Los presentes inventores han desarrollado un método eficiente para eliminar la proteasa activadora de Lys-C y las proteínas de la célula huésped del BoNT/A después de la activación mediante el uso de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Los presentes inventores encontraron sorprendentemente que la HIC maximiza no solo la cantidad de BoNT/A bicatenaria activa recuperada en la purificación, sino que también mejora significativamente la resolución de Lys-C, es decir, la eliminación de la proteasa de Lys-C. Las propiedades ventajosas de HIC son contraintuitivas

cuando se considera que las características biofísicas de Lys-C y rBoNT/A; basado en el punto isoeléctrico (pI) y la carga neta de BoNT/A y Lys-C, se predice que la cromatografía de intercambio iónico (IEX) resolvería las dos proteínas en lugar de HIC.

5 La presente invención resuelve uno o más de los problemas mencionados anteriormente, proporcionando métodos como se especifica en las reivindicaciones.

En consecuencia, la presente invención proporciona un método para producir proteína BoNT/A bicatenaria soluble, que comprende:

a) proporcionar una proteína BoNT/A monocatenaria soluble;

b) poner en contacto dicha proteína BoNT/A con endoproteinasa Lys-C (Lys-C) en solución; y

10 c) separar la proteína soluble BoNT/A de la Lys-C poniendo en contacto la solución que contiene proteína soluble BoNT/A y Lys-C con una superficie hidrófoba, en donde la proteína soluble BoNT/A se une preferiblemente a la superficie hidrófoba.

15 La proteína BoNT/A monocatenaria soluble se puede producir en una célula huésped, mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica dicha proteína BoNT/A monocatenaria en un sistema de expresión, en donde opcionalmente el sistema de expresión es un sistema de expresión bacteriano, preferiblemente en donde el sistema de expresión bacteriano es un sistema de expresión de E. coli y la célula huésped es una célula de E. coli. Dicha proteína soluble BoNT/A monocatenaria puede expresarse en el citoplasma de dicha célula huésped, o en un sistema libre de células. La proteína BoNT/A monocatenaria soluble puede expresarse a un nivel de al menos 5 mg/L de cultivo. Dicho método puede comprender la lisis de la célula huésped para proporcionar un homogeneizado de la célula huésped que contiene dicha proteína BoNT/A monocatenaria soluble (preferiblemente, la BoNT/A monocatenaria soluble está presente a una concentración de al menos 5 mg/L del homogeneizado de célula huésped).

20 La superficie hidrófoba utilizada en el método de la presente invención puede ser una matriz inerte a la que se une un ligando que consiste en grupos arilo o alquilo, en donde opcionalmente el ligando se selecciona del grupo que consiste en: ligandos butilo, fenilo u octilo. En una realización, se usa una superficie hidrófoba de alto rendimiento.

La invención proporciona además un método para la producción de una composición farmacéutica, que comprende las etapas del método mencionado anteriormente y la etapa adicional de formular la BoNT/A bicatenaria purificada como una composición farmacéutica.

Los siguientes aspectos se describen adicionalmente aquí:

30 - una proteína BoNT/A bicatenaria activa obtenible por el método de la invención;

- una composición que comprende dicha proteína BoNT/A bicatenaria activa; en donde dicha composición está sustancialmente libre de endoproteinasa Lys-C. Preferiblemente, dicha composición contiene menos de 400 pg de endoproteinasa Lys-C (Lys-C) por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 300 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 200 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 100 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 50 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A. Dichas composiciones son adecuadas para su uso en tratamientos terapéuticos y cosméticos;

40 - una composición farmacéutica líquida que comprende: una proteína BoNT/A bicatenaria activa obtenible por el método de la invención; un agente estabilizante no proteico que es un tensioactivo; y agua; en donde dicha composición farmacéutica líquida no comprende un agente estabilizante de proteínas; y en donde dicha composición farmacéutica líquida está sustancialmente libre de endoproteinasa Lys-C (Lys-C). Preferiblemente, dicha composición farmacéutica líquida contiene menos de 400 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 300 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 200 pg de Lys-C por 100 ng de BoNT/A, o menos de 100 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 50 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A. Dicha composición farmacéutica líquida puede comprender además: cloruro de sodio, un tampón para mantener el pH entre 5,5 y 7,5, y un disacárido; en donde el agua es agua estéril;

45 - una proteína, composición o composición farmacéutica líquida BoNT/A bicatenaria activa, como se describe en el presente documento, para uso en terapia;

- el uso de una proteína BoNT/A bicatenaria activa, composición o composición farmacéutica líquida, como se describe en el presente documento, en la fabricación de un medicamento; y

50 - un método de tratamiento que comprende la administración de una proteína BoNT/A bicatenaria activa, composición o composición farmacéutica líquida, como se describe en el presente documento, a un paciente que lo necesite.

Descripción detallada de la invención**Toxina botulínica serotipo A (BoNT/A)**

El término “BoNT” significa neurotoxina botulínica y se refiere a la neurotoxina obtenible de *C. botulinum* como BoNT de serotipo A, B, C1, D, E, F o G. También está abarcada por el término “CNT” y “BoNT” la neurotoxina recombinante y modificada que comprende una o más modificaciones que incluyen modificación química o modificación genética. La expresión “modificación genética” significa la delección, sustitución o adición de uno o más residuos de ácido nucleico que dan como resultado la delección, sustitución o adición de una o más bases de aminoácidos, o la delección, sustitución o adición de dichos uno o más residuos de aminoácidos.

El serotipo BoNT/A se divide en al menos ocho subserotipos (también conocidos como subtipos), BoNT/A1 a BoNT/A8, que comparten al menos el 84% hasta el 98% de identidad de secuencia de aminoácidos; las proteínas BoNT/A dentro de un subtipo dado comparten una identidad de secuencia en porcentaje de aminoácidos más alta. La Tabla 1 (a continuación) muestra el precursor, la neurotoxina bicatenaria nativa de los subtipos de BoNT/A e identifica el bucle expuesto (bucle de activación) que comprende la secuencia de aminoácidos escindida por Lys-C.

Tabla 1:

Toxina	bucle expuesto (activación)	LC	H _N	H _{CN}	H _{CC}
BoNT/A1 (P10845)	SEQ ID NO: 2	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A2 (A2I2R5)	SEQ ID NO: 3	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A2 (A2I2R5)	SEQ ID NO: 4	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A3 (B1L2G5)	SEQ ID NO: 3	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A3 (B1L2G5)	SEQ ID NO: 4	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A3 (Q3LRX9)	SEQ ID NO: 5	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A4 (Q3LRX8)	SEQ ID NO: 6	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A5 (C7BEA8)	SEQ ID NO: 7	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A6 (C9WWY7)	SEQ ID NO: 2	M1-K438	A449-N872	I873-S1093	N1094-L1297
BoNT/A7 (K4LN57)	SEQ ID NO: 13	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A8 (A0A0A7PDB7)	SEQ ID NO: 14	M1-K438	A449-N872	I873-S1093	N1094-Q1297

En referencia a la Tabla 1, las posiciones de aminoácidos (residuos) indicadas para las regiones LC, H_N, H_{CN} y H_{CC} corresponden a las posiciones de aminoácidos para dichas regiones en una secuencia de proteína BoNT/A de longitud completa. Los números de acceso UniProt dados en la Tabla 1 son ejemplos de los diferentes subserotipos de BoNT/A. Por lo tanto, en una realización, las posiciones de aminoácidos de las regiones LC, H_N, H_{CN} y H_{CC} indicadas en la Tabla 1 corresponden a las posiciones de aminoácidos en las secuencias de proteína BoNT/A de longitud completa identificadas por el número de acceso.

Usando los métodos de la presente invención, ahora es posible obtener composiciones de BoNT/A bicatenaria con una contaminación significativamente menor por BoNT/A sin procesar o parcialmente procesada, ya que esos contaminantes se procesan eficientemente en BoNT/A bicatenaria. Los métodos de la presente invención también permiten la eliminación efectiva de la enzima Lys-C utilizada para procesar la proteína BoNT/A monocatenaria en la doble cadena activa. En un aspecto, la BoNT/A bicatenaria es una neurotoxina bicatenaria nativa, en la que el extremo C de la cadena ligera y el extremo N de la cadena pesada son idénticos a la correspondiente BoNT/A bicatenaria completamente procesada aislada de *Clostridia* de tipo salvaje.

De acuerdo con la presente invención, se puede producir una doble cadena de BoNT/A activa, que incluye una doble cadena de BoNT/A recombinante, como un polipéptido monocatenario, que se escinde para formar la forma bicatenaria activa de la proteína.

Los presentes métodos pueden usarse para producir la cadena doble de cualquier subtipo de BoNT/A o un homólogo o derivado del mismo, que incluye, por ejemplo, el polipéptido de la SEQ ID NO: 1 y derivados del mismo. El término “derivado”, como se usa con respecto a este y otros aspectos de la invención, comprende mutaciones de aminoácidos tales como adición, sustitución, delección o truncamiento de uno o más residuos de aminoácidos.

La proteína monocatenaria BoNT/A puede comprender una secuencia de polipéptidos como se muestra en GenBank no: CBZ04958.1, YP_002805603.1, ZP_02994746.1, YP_001788403.1, YP_001782718.1, ZP_02616437.1, ZP_02614241.1, YP_001392361.1, YP_001255575.1. La proteína monocatenaria BoNT/A puede comprender una secuencia de polipéptidos como se muestra en:

- 5 • Subserotipo A1: número de acceso UniParc UPI0000ED909E (número de acceso UniProt P10845, versión 159), número de acceso UniParc UPI0000EF85BD (número de acceso UniProt S8B1U4, versión 3, o número de acceso UniProt A2I2R4, versión 41), número de acceso UniParc UPI0001A954C8 (número de acceso UniProt C6K838, versión 11), número de acceso UniParc UPI0000001386 (número de acceso UniProt A5HZZ9, versión 57), número de acceso UniParc UPI000003409D (número de acceso UniProt A2I2U2, versión 36), número de acceso UniParc UPI00016529B7 (número de acceso UniProt B1A2D5, versión 21), número de acceso UniParc UPI00027EE164 (número de acceso UniProt J7FGZ9, versión 6);
- 10 • Subserotipo A2: número de acceso UniParc UPI0000EF84BD (número de acceso UniProt A2I2R5, versión 28), número de acceso UniParc UPI0001C0B376 (número de acceso UniProt D2KCK3, versión 15), número de acceso UniParc UPI0001C32E84 (número de acceso UniProt3 D3IV23, versión 10), número de acceso UniParc UPI0001F3B30D (número de acceso UniProt E5F1I1, versión 11), número de acceso UniParc UPI000016EA88 (número de acceso UniProt Q45894, versión 116 o número de acceso UniProt Q58GH1, versión 51), número de acceso UniParc UPI000067C53E (número de acceso UniProt Q2PPK6, versión 33), número de acceso UniParc UPI000290BEB1 (número de acceso UniProt K4GGE0, versión 6);
- 15 • Subserotipo A3: número de acceso UniParc UPI00005B712C (número de acceso UniProt Q3LRX9, versión 38), número de acceso UniParc UPI00016DBC11 (número de acceso UniProt B1L2G5, versión 38 o número de acceso UniProt D3IV24, versión 11), número de acceso UniParc UPI000290C3D0 (número de acceso UniProt K4G3L3, versión 7);
- 20 • Subserotipo A4: número de acceso UniParc UPI00005B712D (número de acceso UniProt Q3LRX8, versión 35), número de acceso UniParc UPI00019DB885 (número de acceso UniProt C3KS13, versión 29);
- 25 • Subserotipo A5: número de acceso UniParc UPI0001AE7D6A (número de acceso UniProt C7BEA8, versión 14), número de acceso UniParc UPI000198BDAE (número de acceso UniProt E8ZMW0, versión 18 o número de acceso UniProt C1IPK2, versión 20); o
- Subserotipo A6: número de acceso UniParc UPI0001B7D251 (número de acceso UniProt C9WWY7, versión 13).
- Subserotipo A7: número de acceso UniParc UPI000290B995 (número de acceso UniProt K4LN57).
- 30 • Subserotipo A8: número de acceso UniParc UPI000559A469 (número de acceso UniProt A0A0A7PDB7); número de acceso UniParc UPI0003C9D2A1 (número de acceso UniProt V5N8R1).

La proteína monocatenaria BoNT/A puede comprender una secuencia de polipéptidos que es un homólogo o derivado que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con una de las secuencias de polipéptidos de BoNT/A mencionadas anteriormente.

- 35 En un aspecto, la cadena polipeptídica de dicha proteína monocatenaria BoNT/A comprende una secuencia seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 7 o 13 o 14. En un aspecto más particular, la cadena polipeptídica de dicha proteína monocatenaria BoNT/A comprende una secuencia seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 7 o 13 o 14 y en la que el segundo polipéptido es escindido C-terminal a un residuo de aminoácido básico dentro de dicha secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 7 o 13 o 14. Dichas secuencias representan
- 40 secuencias de aminoácidos de sustratos conocidos de la proteína monocatenaria BoNT/A de la presente invención.

Las proteínas monocatenarias BoNT/A se escinden en el extremo C-terminal a un residuo de aminoácido básico contenido en la secuencia, comparar la Tabla 1, columna LC y H_N. En un aspecto preferido, dicha proteína monocatenaria BoNT/A comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 2 a 7 y 13-14 (por ejemplo, serotipo BoNT/A1, SEQ ID NO: 2).

- 45 La proteína monocatenaria BoNT/A puede comprender un derivado de cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 7 o 13 o 14, o de la SEQ ID NO: 1, o una de las secuencias de polipéptidos correspondientes a los números de acceso identificado en el presente documento, en donde dicho derivado tiene una o más mutaciones puntuales y/o uno o más residuos de aminoácidos adicionales. En otro aspecto, dicho derivado tiene hasta 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, hasta 10, hasta 15 mutaciones puntuales. Al usar el ensayo de actividad
- 50 para determinar la actividad de la proteasa, como se describe aquí, la persona experta puede determinar si un derivado dado es procesado por Lys-C.

El derivado puede contener una mutación puntual que cambia un residuo de aminoácido básico en un residuo de aminoácido no básico. El derivado puede tener al menos un 50% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 7 o 13 o 14, SEQ ID NO: 1, o una de las secuencias de polipéptidos correspondientes a los

- 55 números de acceso identificados aquí. Dicho derivado o un polipéptido que comprende el derivado puede ser un

sustrato de Lys-C y ser escindible proteolíticamente por Lys-C. Un ejemplo típico es un derivado de SEQ ID NO: 1 que comprende, por ejemplo, una o más mutaciones puntuales en la cadena ligera o pesada.

Dicha proteína monocatenaria BoNT/A puede comprender (a) una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 30% de identidad de secuencia, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o más con la secuencia de SEQ ID NO: 1 (BoNT/A de ATCC 3502, acceso a Genbank AAA23262), o con una de las secuencias de polipéptidos correspondientes a los números de acceso identificados aquí. La proteína monocatenaria BoNT/A puede comprender la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 15, o una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 30% de identidad de secuencia, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o más con la secuencia de SEQ ID NO: 15.

La expresión "identidad de secuencia", como se usa en el presente documento, se refiere a la determinación de la identidad entre una secuencia de aminoácidos de referencia y una secuencia de consulta en la que las secuencias están alineadas de modo que se obtiene la coincidencia de orden más alto, y que puede calcularse usando técnicas publicadas o métodos codificados en programas de ordenador tales como, por ejemplo, BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul 1990, J Mol Biol 215:403). Los valores de porcentaje de identidad se pueden calcular sobre la secuencia de aminoácidos completa o sobre una región de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, para la proteína BoNT/A monocatenaria, la identidad de secuencia se puede calcular sobre una longitud de secuencia de hasta 50 residuos de aminoácidos (aa), hasta 100aa, hasta 150aa, hasta 250aa, 300aa, 350aa, 400aa, 450aa, 500aa, 550aa, 600aa, 650aa, 700aa, 750aa, 800aa, 850aa, 900aa, 950aa, 1000aa, 1050aa, 1100aa, 1150aa, 1200aa, 1250aa o más residuos, hasta la proteína BoNT/A de cadena completa de longitud completa secuencia. La identidad de secuencia puede calcularse sobre al menos 50aa residuos, al menos 100aa, al menos 150aa o al menos 250aa residuos.

Una serie de programas basados en una variedad de algoritmos está disponible para el experto en la técnica para comparar diferentes secuencias. En este contexto, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith and Waterman dan resultados particularmente confiables. Para llevar a cabo las alineaciones de secuencia y calcular los valores de identidad de secuencia que se mencionan aquí, se utilizó el programa comercialmente disponible DNASTAR Lasergene MegAlign versión 7.1.0 basado en el algoritmo Clustal W en toda la región de secuencia con los siguientes ajustes: parámetros de alineación por pares: penalización de brecha: 10.00, penalización por longitud de espacio: 0.10, matriz de peso de proteína Gonnet 250 que, a menos que se especifique lo contrario, siempre se utilizará como configuración estándar para alineaciones de secuencia.

Al menos el 30% significa al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o más hasta el 100%. La identidad de secuencia de dicha secuencia de proteína monocatenaria BoNT/A que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1 puede determinarse en base a la posición de aminoácidos 420 a 466 de la SEQ ID NO: 1, o dicha secuencia la identidad puede determinarse en función de cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 7 o 13 o 14. En otras palabras, una proteína monocatenaria BoNT/A puede comprender una secuencia de polipéptidos que tiene, por ejemplo, al menos el 30% de identidad de secuencia con la secuencia de polipéptidos encontrada entre las posiciones de aminoácidos 420 a 466 de la proteína monocatenaria BoNT/A o al menos el 30% de identidad de secuencia con la secuencia de polipéptidos de cualquiera de las proteínas monocatenarias BoNT/A, incluyendo cualquiera de las secuencias de polipéptidos que corresponden a los números de acceso identificados en el presente documento. Un polipéptido de acuerdo con esta definición se puede obtener, por ejemplo, de *C. botulinum*, *C. tetani* o *C. sporogenes*. Dicha proteína monocatenaria BoNT/A puede ser, por ejemplo, una neurotoxina natural o un derivado de la misma que comprende una o más mutaciones de aminoácidos tales como la adición, sustitución, delección o truncamiento de uno o más residuos de aminoácidos. Están abarcados, por ejemplo, los derivados que carecen, por ejemplo, del dominio nativo de neurotoxina H_C o partes del mismo o derivados con otros residuos de aminoácidos que reemplazan el dominio de neurotoxina H_C, así como derivados con una cadena ligera adicional u otra molécula de carga proteica fusionada en forma N-terminal a la cadena ligera de BoNT.

La proteína monocatenaria BoNT/A puede contener residuos de aminoácidos adicionales en el término N o C o en una posición interna. Los residuos de aminoácidos adicionales pueden estar flanqueados por uno o más sitios de escisión de proteasa. La secuencia de aminoácidos adicional puede funcionar como una marca detectable y/o permite la unión a un soporte sólido. Un ejemplo es una marca His o una marca GST. Otro ejemplo es la secuencia de aminoácidos VPPTPGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 12) que contiene el Streptag, preferiblemente agregado al término C.

En otro aspecto, la actividad biológica de dicha proteína monocatenaria BoNT/A puede ser modulada por la escisión proteolítica. Los expertos en la técnica saben bien que la función de muchos polipéptidos puede modularse mediante procesamiento proteolítico. "Modulada" como se usa en el presente documento significa aumentada o disminuida, activada o inactivada. Por ejemplo, la actividad biológica de muchas neurotoxinas clostridiales aumenta o se desencadena al procesar proteolíticamente una neurotoxina monocatenaria en una neurotoxina bicatenaria, en donde la neurotoxina bicatenaria está compuesta por una cadena de polipéptidos ligera y pesada, que están unidas covalentemente a través de un puente disulfuro. La actividad biológica de la neurotoxina abarca al menos tres

actividades separadas: la primera actividad es una “actividad proteolítica que reside en la cadena ligera de la neurotoxina y es responsable de hidrolizar el enlace peptídico de uno o más polipéptidos implicados en la regulación de la fusión de la membrana celular. Una segunda actividad es una “actividad de translocación”, que reside en el extremo N-terminal de la cadena pesada de la neurotoxina procesada y está implicada en el transporte de la cadena ligera a través de la membrana lisosómica y dentro del citoplasma. Una tercera actividad es una “actividad de unión al receptor”, que reside en el extremo C-terminal de la cadena pesada de la neurotoxina procesada e implica en la unión y la captación de la neurotoxina a una célula diana. En un aspecto preferido, la expresión “actividad biológica” como se usa en el presente documento significa actividad proteolítica. En un aspecto más preferido, la expresión significa actividad proteolítica incrementada.

La actividad biológica de la neurotoxina clostridial se puede medir mediante varias pruebas, todas las cuales son conocidas por el experto en la técnica. Estas pruebas permiten determinar una o más de las actividades mencionadas anteriormente. Por ejemplo, el ensayo LD₅₀ de ratón o el ensayo ex vivo de hemidiafragma del nervio frénico de ratón (MPN) según lo descrito por Pearce et al., 1994 (Pearce LB, Borodic GE, First ER, MacCallum RD (1994), *Toxicol Appl Pharmacol* 128:69-77) y Habermann et al., 1980 (Habermann E, Dreyer F, Bigalke H. (1980), *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 311:33-40) permiten determinar el efecto tóxico de una preparación de neurotoxina dada en un organismo vivo o una preparación neuromuscular aislada. Para establecer el efecto tóxico en un ensayo de LD₅₀, la neurotoxina debe ser biológicamente activa en cada una de las tres actividades mencionadas anteriormente. Además, hay otros ensayos disponibles que permiten, por ejemplo, para determinar si una neurotoxina o la cadena ligera de la neurotoxina es proteolíticamente activa. Dichos ensayos se basan, por ejemplo, en poner en contacto BoNT/A con SNAP-25. Alternativamente, puede usarse un péptido que representa el sitio de escisión de SNAP-25, en el que el péptido puede marcarse para facilitar la detección. En un aspecto preferido, la actividad biológica se determina usando el ensayo de MPN descrito anteriormente en el presente documento.

Una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína monocatenaria BoNT/A puede usarse de acuerdo con la presente invención. Dicha molécula de ácido nucleico puede comprender opcionalmente elementos reguladores. La expresión “elementos reguladores”, como se usa en el presente documento, se refiere a elementos reguladores de la expresión génica, que incluyen la transcripción y la traducción, e incluye elementos tales como caja TATA, promotor, potenciador, sitio de unión a ribosomas, secuencia de Shine-Dalgarno, región IRES, señal de poliadenilación, estructura de límite terminal, y similares. Dicho elemento regulador puede comprender uno o más elementos reguladores heterólogos o uno o más elementos reguladores homólogos. Un “elemento regulador homólogo” es un elemento regulador de una célula de tipo salvaje, de la que se deriva la molécula de ácido nucleico, que está implicada en la regulación de la expresión génica de la molécula de ácido nucleico o el polipéptido en dicha célula de tipo salvaje. Un “elemento regulador heterólogo” es un elemento regulador que no está implicado en la regulación de la expresión génica de la molécula de ácido nucleico o el polipéptido en dicha célula de tipo salvaje. También se pueden usar elementos reguladores para la expresión inducible, tales como promotores inducibles.

La molécula de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, hnARN, ARNm, ARN, ADN, PNA, LNA y/o moléculas de ácido nucleico modificadas. La molécula de ácido nucleico puede ser circular, lineal, integrada en un genoma o episomal. También se incluyen los concatémeros que codifican proteínas de fusión que comprenden tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez polipéptidos. Además, la molécula de ácido nucleico puede contener secuencias que codifican secuencias de señal para el transporte intracelular, tales como señales para el transporte a un compartimento intracelular o para el transporte a través de la membrana celular.

Según la invención, una molécula de ácido nucleico que codifica BoNT/A puede diseñarse para proporcionar ventajosamente altos niveles de expresión en las células huésped, en particular células huésped bacterianas, preferiblemente células *E. coli*. Los métodos para diseñar moléculas de ácido nucleico para aumentar la expresión de proteínas en células huésped, en particular células huésped bacterianas, preferiblemente células *E. coli*, se conocen en la técnica e incluyen la disminución de la frecuencia (número de ocurrencias) de “codones lentos” en la secuencia de ácidos nucleicos codificante.

En un aspecto, se produce una proteína BoNT/A monocatenaria usando un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína BoNT/A monocatenaria. Un vector puede ser adecuado para la expresión in vitro y/o in vivo de dicha proteína BoNT/A monocatenaria. El vector puede ser un vector para expresión génica transitoria y/o estable. El vector puede comprender adicionalmente elementos reguladores y/o marcadores de selección. Dicho vector puede ser de origen viral, de origen de fago o de origen bacteriano. Por ejemplo, dicho vector de expresión puede ser un vector pET-26b(+).

Una molécula de ácido nucleico o un vector de expresión que codifica una proteína monocatenaria BoNT/A puede estar comprendida en una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico o el vector de la presente invención. La expresión “célula huésped”, como se usa en el presente documento, abarca células procariotas y/o eucariotas adecuadas para traducir dicha molécula de ácido nucleico o dicho vector y en particular la proteína monocatenaria BoNT/A. Dicha célula huésped puede ser una célula huésped que no expresa la proteína monocatenaria BoNT/A o un homólogo de la misma. El término “homólogo” como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al

menos el 98%, al menos el 99% o más de identidad de secuencia con una secuencia de BoNT/A, por ejemplo, la secuencia de BoNT/A de la SEQ ID NO: 1. Sin embargo, también se incluyen las células huésped, tales como células de tipo salvaje, que expresan la proteína monocatenaria BoNT/A o un homólogo de la misma. Por ejemplo, una célula huésped puede seleccionarse de *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* y *C. tetani*, como *C. botulinum* de serotipo A, B o F. La célula huésped puede ser la cepa Hall (ATCC 3502) de *C. botulinum*; la cepa productora de BoNT/A ATCC 19397, también conocida como NCTC 4587 y NCTC 7272 de *C. botulinum*; la cepa productora de BoNT/A NCTC 2916 de *C. botulinum*; la cepa productora de BoNT/A2 Kyoto-F o Mauritius/NCTC 9837 de *C. botulinum*; la cepa productora de BoNT/A3 A254 Loch Maree/NCTC 2012 de *C. botulinum*; la cepa productora de BoNT/A4 y B CDC657 de *C. botulinum*; la cepa productora de BoNT/A5 y B3' H04402 065 de *C. botulinum*; la cepa productora de BoNT/BI Okra/NCTC 7273 de *C. botulinum*; la cepa productora de BoNT/B y F CDC4013/NCTC 12265 de *C. botulinum*; o la cepa productora de BoNT/F1 Langeland/NCTC 10281 de *C. botulinum*. Dicha célula huésped puede ser *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium acetobutylicum*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. thermoproteolyticus*, *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli* o una célula de levadura. Preferiblemente, la célula huésped es una célula huésped de *E. coli*, particularmente una célula BL21 (DE3) o BLR (DE3) de *E. coli*.

En un aspecto, la proteína monocatenaria BoNT/A se modifica dentro de la célula huésped (es decir, se glicosila, se fosforila, se procesa por proteasas, etc.). La modificación también incluye la adición de cofactores no proteínicos que incluyen iones metálicos. La célula huésped puede comprender un inductor de expresión de la proteína monocatenaria BoNT/A. Tal inductor de expresión puede ser una molécula de ácido nucleico o un polipéptido o una entidad química, que incluye una pequeña entidad química, que tiene el efecto de aumentar la cantidad de la proteína monocatenaria BoNT/A en cultivos de células huésped o lisados de los mismos. El inductor de expresión puede aumentar, por ejemplo, la transcripción o traducción de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína monocatenaria BoNT/A. El inductor puede expresarse, por ejemplo, por medios recombinantes conocidos por el experto en la técnica. Alternativamente, el inductor puede aislarse de una célula, por ejemplo, una célula clostridial.

Se puede producir una proteína BoNT/A monocatenaria mediante un método que comprende introducir un vector de expresión como se describe aquí y expresar dicha proteína BoNT/A monocatenaria en dicha célula huésped. Se puede producir una proteína BoNT/A monocatenaria proporcionando una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica dicha proteína BoNT/A monocatenaria y que expresa dicha proteína BoNT/A monocatenaria en dicha célula huésped. Típicamente, la célula huésped es una célula bacteriana, preferiblemente una célula de *E. coli*. La célula huésped de *E. coli* puede ser una célula BL21 (DE3) o BLR (DE3) de *E. coli*.

Preferiblemente, la proteína monocatenaria BoNT/A se traduce en una célula. La célula puede ser una célula procariota o eucariota. En un aspecto, la celda se selecciona entre *E. coli*, *B. subtilis* o levadura; *E. coli* es una célula huésped altamente preferida. La presente invención también abarca la traducción de la proteína monocatenaria BoNT/A en una célula de tipo salvaje, es decir, una célula aislada de la naturaleza, como cualquier aislado conocido de *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium baratii* y *Clostridium tetani*. Cualquier célula huésped adecuada como se describe en el presente documento puede usarse de acuerdo con la presente invención.

Varios expertos y métodos estándar están disponibles para la persona experta para llevar una molécula de ácido nucleico o un vector a una célula huésped y para expresar la proteína monocatenaria BoNT/A como proteína recombinante en una célula. Además, la persona experta conoce muchas técnicas estándar para extraer proteínas y polipéptidos de células o lisados celulares (por ejemplo, Recombinant DNA Principles and Methodologies, J. Green, Marcel Dekker Inc., 1998; The Condensed Protocols: From Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 2006; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 2000). Cualquiera de estos medios y métodos puede usarse en los métodos de la presente invención.

Los métodos típicos para extraer las proteínas de una célula huésped o lisado de la célula huésped incluyen centrifugación (clarificación) de lisado celular, precipitación de proteínas con sulfato de amonio, resuspensión de proteínas, centrifugación de proteínas resuspendidas, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, hidrofóbica cromatografía de interacción, y similares. Según la presente invención, pueden ser útiles varias combinaciones de tales etapas, en orden diferente, para purificar la proteína monocatenaria BoNT/A.

Como se describe con más detalle a continuación, la proteína monocatenaria BoNT/A puede ponerse en contacto con Lys-C para producir la cadena doble de BoNT/A activa. Los inventores han desarrollado ahora un método ventajoso para purificar la cadena doble de BoNT/A a partir de la mezcla de reacción de BoNT/A y Lys-C.

Endoproteinasa Lys-C

Como se describe en el presente documento, una proteína BoNT/A monocatenaria se escinde para formar la forma bicatenaria activa de la proteína BoNT/A usando endoproteinasa Lys-C (Lys-C). El término "Lys-C" se refiere a la serina endoproteinasa Lys-C de 33 kDa de *Lysobacter enzymogenes* (lisil endopeptidasa, LeK, acceso a Genbank Q7M135) que escinde específicamente los enlaces peptídicos en forma C-terminal a lisina o un homólogo de la misma con al menos el 50% de identidad de secuencia. En una realización, el homólogo del mismo que tiene al

menos un 50% de identidad de secuencia con Lys-C conserva la funcionalidad (es decir, la actividad proteolítica) de Lys-C.

De acuerdo con la presente invención, la enzima Lys-C es un polipéptido proteolíticamente activo que puede comprender o consistir en una secuencia de polipéptidos que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 8. En un aspecto, la enzima Lys-C utilizada según la presente invención es un polipéptido proteolíticamente activo que consiste en una secuencia de polipéptidos como se muestra en la SEQ ID NO: 8.

Típicamente, los homólogos de Lys-C son capaces de hidrolizar una neurotoxina botulínica monocatenaria (por ejemplo, serotipo A (BoNT/A)) para producir la neurotoxina botulínica bicatenaria (por ejemplo, serotipo A (BoNT/A)). En una realización, el término "Lys-C" también abarca proteasas funcionalmente equivalentes, tales como aquellas proteasas que reconocen la misma secuencia de escisión que Lys-C e hidrolizan en el lado carboxilo de Lys. El término también abarca los homólogos de dicha proteasa que tiene al menos un 60% de identidad de secuencia.

La expresión "polipéptido proteolíticamente activo", como se usa en el presente documento, se refiere a la función catalítica del polipéptido y significa que el polipéptido es capaz de hidrolizar un enlace peptídico. En un aspecto, "polipéptido proteolíticamente activo" se refiere a un polipéptido que es capaz de hidrolizar un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 7.

La expresión "polipéptido inactivo proteolíticamente", como se usa en el presente documento, se refiere a la función catalítica del polipéptido y significa que el polipéptido es incapaz de hidrolizar un enlace peptídico.

Un experto en la técnica puede determinar si un polipéptido Lys-C de acuerdo con la definición de secuencia mencionada aquí es un polipéptido para usar de acuerdo con la presente invención, probando la actividad proteolítica de dicho polipéptido. Un sistema de ensayo o prueba para determinar la actividad proteolítica comprende poner en contacto un polipéptido Lys-C que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 8 con un sustrato de prueba.

Un sustrato de prueba es típicamente un polipéptido que se sabe que es escindible por Lys-C. Preferiblemente, el sustrato de prueba es una neurotoxina clostridial (CNT), tal como BoNT o un fragmento de la misma. El sustrato de prueba puede ser, por ejemplo, BoNT sin cortar/sin procesar, designado aquí como BoNT monocatenaria (scBoNT) y puede ser, por ejemplo, del serotipo A, B, C₁, D, E, F o G (por ejemplo, scBoNT/A, scBoNT/B, etc.) o el sustrato de prueba puede ser neurotoxina tetánica (TNT). Alternativamente, el sustrato de prueba puede ser un fragmento de neurotoxina clostridial, donde dicho fragmento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 7. El fragmento puede ser un polipéptido de 50 o más residuos de aminoácidos o un péptido de hasta 49 residuos de aminoácidos. Como se usa en toda la presente memoria descriptiva, el término "polipéptido" se refiere a moléculas con 50 o más residuos de aminoácidos, mientras que el término "péptido" se refiere a moléculas con 2 a 49 residuos de aminoácidos.

El sustrato de prueba puede ser un fragmento de neurotoxina soluble llamado LH_N que comprende el polipéptido de cadena ligera, la región peptídica del bucle expuesta y la mitad N-terminal del polipéptido de cadena pesada, el dominio de translocación H_N. El sustrato de prueba puede ser o comprender un péptido seleccionado de cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 8 (véase la Tabla 1). El sustrato de prueba puede ser una neurotoxina quimérica que comprende residuos de aminoácidos derivados de dos o más serotipos.

Un ensayo para determinar la actividad proteolítica de una enzima Lys-C, un homólogo o un derivado de la misma comprende típicamente una etapa de determinar el grado de conversión del sustrato de prueba en su(s) producto(s) de escisión. La observación de uno o más productos de escisión generados después de poner en contacto el polipéptido con el sustrato de prueba o la observación de un aumento en la cantidad de producto(s) de escisión es indicativo de actividad proteolítica del polipéptido. Dicha etapa de determinación puede implicar comparar sustrato y producto(s) de escisión. Dicha comparación puede implicar determinar la cantidad de sustrato y/o la cantidad de uno o más productos de escisión y también puede implicar calcular la proporción de sustrato y producto(s) de escisión. Además, el ensayo para determinar la actividad proteolítica puede comprender una etapa de comparación de una muestra de prueba con una muestra de referencia, en donde la muestra de referencia típicamente comprende (a) un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 8 y que se sabe que es proteolíticamente activo y (b) un sustrato de prueba que se separa por el polipéptido de (a).

El ensayo para determinar la actividad proteolítica puede comprender la separación del sustrato (por ejemplo, proteína monocatenaria BoNT/A) y el producto o los productos de escisión (por ejemplo, doble cadena de BoNT/A activa) por electroforesis o por cromatografía en columna y, opcionalmente, un análisis espectrométrico. Puede ser conveniente etiquetar el sustrato de prueba con una o más etiquetas para detectar más fácilmente la disminución del sustrato de prueba y/o el aumento de los productos. El término "etiqueta", como se usa en el presente documento, significa un marcador detectable e incluye, por ejemplo, una etiqueta radiactiva, un anticuerpo y/o una etiqueta fluorescente. La cantidad de sustrato de prueba y/o producto de escisión puede determinarse, por ejemplo, por métodos de autorradiografía o espectrometría, incluidos los métodos basados en la transferencia de resonancia de

energía entre al menos dos etiquetas. Alternativamente, se pueden usar métodos inmunológicos tales como transferencia Western o ELISA para la detección.

En un aspecto preferido, un polipéptido es proteolíticamente activo, si más del 20%, preferiblemente más del 95% del sustrato de prueba se convierte en los productos de escisión como la cadena ligera y la cadena pesada en 120 minutos a 37 °C usando un tampón seleccionado de Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 o PBS (Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Se aplican las mismas condiciones, si el sustrato de prueba no es BoNT/A de longitud completa, sino que, por ejemplo, es un fragmento de BoNT/A de longitud completa o un derivado de BoNT/A. Es evidente que los productos de escisión serán diferentes en este caso. Sin embargo, el experto puede cuantificar los productos de escisión correspondientes.

- 10 Típicamente, se usan 100 ng de polipéptido Lys-C proteolíticamente activo y una relación molar de 1:100 con respecto al sustrato en el ensayo.

Se puede tomar una muestra a intervalos para seguir la actividad catalítica a lo largo del tiempo.

El ensayo puede modificarse, por ejemplo, mediante el uso de múltiples cantidades del polipéptido Lys-C proteolíticamente activo.

- 15 La SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de polipéptidos de un polipéptido inactivo proteolíticamente derivado de una cepa de *Clostridium botulinum* ATCC 3502, número de acceso de GenBank: CAL82988.1, que tiene una longitud de aminoácidos de 581 residuos. La SEQ ID NO: 8 muestra un derivado proteolíticamente activo de la SEQ ID NO: 9, que carece de los residuos de aminoácidos 1 a 248 de la SEQ ID NO: 9.

- 20 La expresión "polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 8" se refiere a un polipéptido que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 8. Además, la expresión se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 8. Dicho polipéptido puede tener aminoácidos adicionales, por ejemplo, en una posición interna o en el término N o C de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 8 o en una posición interna o en el término N o C a una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 8, en donde una metionina puede estar presente en el término N del polipéptido. Además, la expresión se refiere a un polipéptido que carece de uno o más residuos de aminoácidos, por ejemplo, en una posición interna o en el término N o C de la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 8 o en una posición interna o en el término N o C de una secuencia que es al menos un 50% idéntica en secuencia a la SEQ ID NO: 8. La expresión "identidad de secuencia" y los medios para calcular la identidad de secuencia se definen aquí en relación con BoNT/A, y las mismas definiciones y medios también se aplican al análisis de Lys-C.

- 30 Típicamente, la identidad de secuencia de la enzima Lys-C se determina en toda la longitud de la SEQ ID NO: 8 o 9, es decir, a lo largo de 333aa o 581aa, respectivamente. La expresión "al menos un 50% de identidad de secuencia" como se usa en el presente documento significa al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o el 100% de identidad de secuencia.

- El polipéptido Lys-C proteolíticamente activo puede tener el mismo número de aminoácidos que la secuencia de polipéptidos de referencia que se muestra en la SEQ ID NO: 8. Alternativamente, el polipéptido puede tener residuos de aminoácidos adicionales o menos residuos de aminoácidos. Por ejemplo, el polipéptido proteolíticamente activo de la presente invención puede consistir o comprender un mutante de truncamiento de la SEQ ID NO: 8 o 9 o de un polipéptido que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 8 o 9. El mutante de truncamiento de la SEQ ID NO: 9 puede carecer, por ejemplo, de uno o más residuos de aminoácidos N-terminales a la posición de aminoácido 249. Un mutante de truncamiento puede ser un mutante de truncamiento N-o-C-terminal y/o un mutante de truncamiento interno que es proteolíticamente activo. El mutante de truncamiento de la SEQ ID NO: 9 puede carecer de las posiciones de aminoácidos 1 a 248 de la SEQ ID NO: 9. Alternativamente, el mutante de truncamiento de la SEQ ID NO: 9 puede ser un mutante de truncamiento C-terminal. El mutante de truncamiento puede carecer de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 100, 150 o hasta 170 residuos de aminoácidos consecutivos. El polipéptido proteolíticamente activo puede tener una longitud de aminoácido de al menos 200 residuos de aminoácidos (aa), de al menos 250 residuos aa, de al menos 300 residuos aa o de al menos 333 residuos aa. Alternativamente, el polipéptido proteolíticamente activo puede tener hasta 333 residuos aa, hasta 350 residuos aa, hasta 573 residuos aa, hasta 581 residuos aa, hasta 592 residuos aa, hasta 600 residuos aa o hasta 617 residuos aa.

- El polipéptido proteolíticamente activo puede abarcar un polipéptido que comprende residuos de aminoácidos adicionales en el término N o C y/o en una posición interna de la cadena de polipéptidos de la SEQ ID NO: 8 o de una secuencia de polipéptidos que tiene al menos un 50% identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 8. Estos residuos de aminoácidos adicionales pueden comprender hasta 5, hasta 10 o incluso hasta 200, 300 o hasta 400 residuos de aminoácidos consecutivos. Los residuos de aminoácidos adicionales pueden funcionar como un inhibidor de la actividad proteolítica. Estos residuos de aminoácidos adicionales pueden eliminarse mediante una

proteasa. Alternativamente, se excluyen residuos adicionales que inhiben la actividad proteolítica del polipéptido. Los residuos de aminoácidos adicionales pueden estar flanqueados por uno o más sitios de escisión de proteasa. En otro aspecto, la secuencia de aminoácidos adicional funciona como una etiqueta detectable y/o permite la unión a un soporte sólido.

En otro aspecto, la cadena de polipéptidos de la SEQ ID NO: 8 o una de una secuencia de polipéptidos que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 se modifica intercambiando uno o más residuos de aminoácidos. El término “intercambio”, como se usa en el presente documento, significa reemplazar un aminoácido con un aminoácido diferente. Por ejemplo, pueden reemplazarse hasta 1 aminoácido (aa), 2 aa, 3 aa, 4 aa, 5 aa, 6 aa, 7 aa, 8 aa, 9 aa, 10 aa, 15 aa, 20 aa o hasta 50 aa dentro de la secuencia de polipéptidos. Los intercambios pueden implicar cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, con el objetivo, por ejemplo, al aumentar o disminuir la unión del sustrato o la actividad proteolítica del polipéptido.

Típicamente, el polipéptido proteolíticamente activo abarca un polipéptido que es capaz de hidrolizar un sustrato (por ejemplo, proteína BoNT/A monocatenaria) en dos o más productos de escisión nativos. El polipéptido de la presente invención puede hidrolizar el sustrato en dos o más productos de escisión que son iguales o diferentes de los productos de escisión nativos. Preferiblemente, los productos de escisión son los mismos que los productos de escisión nativos.

La expresión “productos de escisión nativos” o “productos nativos”, como se usa en el presente documento, se refiere a productos que son idénticos en la secuencia de aminoácidos en comparación con los productos generados a partir del mismo sustrato en cultivos de células de tipo salvaje, a partir de los cuales se origina el sustrato. En una realización preferida, el producto de escisión es la neurotoxina bicatenaria de una neurotoxina botulínica o de neurotoxina tetánica. En una realización más preferida, la neurotoxina de bicatenaria es una neurotoxina aislada de *C. botulinum* de serotipo A, B, C₁, D, E, F o G. En otro aspecto más, dicha neurotoxina de bicatenaria es una neurotoxina BoNT/A bicatenaria nativa.

Debe entenderse que las definiciones y explicaciones de los términos hechos arriba y abajo se aplican mutatis mutandis para todos los aspectos descritos en esta especificación a menos que se indique lo contrario.

Métodos de producción de BoNT

La presente invención se refiere al uso de Lys-C en un método para procesar proteolíticamente un polipéptido, específicamente una proteína monocatenaria BoNT/A, y un medio para purificar la doble cadena de BoNT/A activa producida a partir de Lys-C utilizando cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la producción de una doble cadena de BoNT/A activa, que comprende la etapa de poner en contacto: (a) Lys-C con (b) una proteína monocatenaria BoNT/A, donde dicha proteína monocatenaria BoNT/A es susceptible a la proteólisis por Lys-C, en donde dicho contacto da como resultado el procesamiento proteolítico de dicha proteína monocatenaria BoNT/A en al menos dos productos de escisión, preferiblemente incluyendo la doble cadena de BoNT/A activa, y purificar dicha doble cadena activa usando HIC.

El método de la invención puede usarse para fabricar neurotoxina clostridial procesada proteolíticamente (CNT) o neurotoxina botulínica (BoNT), específicamente BoNT/A procesada proteolíticamente, es decir, la doble cadena activa de BoNT/A, como se describe en el presente documento. Usando el método de la presente invención, ahora es posible obtener composiciones activas bicatenarias de BoNT/A con una contaminación significativamente menor por BoNT/A sin procesar o parcialmente procesada, ya que esos contaminantes se procesan eficientemente en BoNT/A bicatenaria. Los métodos de la presente invención también permiten la eliminación efectiva de la enzima Lys-C utilizada para procesar la proteína BoNT/A monocatenaria en la doble cadena activa, es decir, una purificación mejorada de la doble cadena de BoNT/A activa.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a la purificación (resolución) de la doble cadena de BoNT/A de Lys-C que comprende la separación por cromatografía de interacción hidrófoba. Por consiguiente, la invención proporciona un método para producir una proteína BoNT/A bicatenaria, que comprende proporcionar una proteína BoNT/A monocatenaria, poner en contacto dicha proteína BoNT/A con endoproteinasa Lys-C en solución y separar la proteína BoNT/A de Lys-C poniendo en contacto la solución que contiene la proteína BoNT/A y Lys-C con una superficie hidrófoba, en donde la proteína BoNT/A se une preferiblemente a la superficie hidrófoba. Típicamente, poner en contacto la proteína BoNT/A monocatenaria con Lys-C da como resultado la escisión de la proteína BoNT/A monocatenaria en una forma bicatenaria soluble. Preferiblemente, el producto de escisión de la proteína BoNT/A monocatenaria por Lys-C es el mismo que el producto de escisión de BoNT/A nativa. Típicamente, las formas tanto monocatenaria como bicatenaria de BoNT/A son solubles.

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

En una realización, en la que la invención proporciona un método (como se describió anteriormente) para producir la proteína BoNT/A bicatenaria soluble, la proteína BoNT/A monocatenaria soluble se proporciona mediante un método como se describió anteriormente para producir la proteína BoNT/A monocatenaria soluble en una célula huésped, preferiblemente una célula huésped bacteriana, con máxima preferencia, una célula huésped de *E. coli*.

Se puede usar cualquier sistema de expresión adecuado para producir la proteína BoNT/A monocatenaria soluble. Un sistema de expresión según la presente invención puede ser un sistema de expresión in vivo o in vitro (libre de células). En la técnica se conocen ejemplos de sistemas de expresión in vivo e in vitro adecuados. Como se define en el presente documento, un sistema de expresión puede comprender una célula huésped adecuada y/o un vector de expresión adecuado para su uso en dicha célula huésped. Por ejemplo, un sistema de expresión adecuado puede comprender una célula huésped bacteriana y/o un vector de expresión adecuado para expresar la proteína BoNT/A monocatenaria soluble en dicha célula huésped bacteriana.

La proteína BoNT/A monocatenaria se puede producir en cualquier célula huésped adecuada como se describe en este documento, tal como una célula bacteriana. Típicamente, se usa una célula huésped de *Escherichia coli* (*E. coli*). La proteína BoNT/A monocatenaria puede producirse mediante un método que comprende: expresar una secuencia de ácido nucleico en un sistema de expresión de célula huésped (por ejemplo, una célula de *E. coli*). Dicha expresión puede implicar la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína BoNT/A monocatenaria en dicha célula huésped, y traducir dicha molécula de ácido nucleico para producir proteína BoNT/A monocatenaria. Métodos y técnicas utilizados para expresar proteínas heterólogas en sistemas de expresión, incluyendo sistemas de expresión de *E. coli*, son bien conocidos en la técnica.

Típicamente, dicha proteína BoNT/A monocatenaria soluble se expresa en el citoplasma de dicha célula huésped de *E. coli*.

La proteína BoNT/A monocatenaria soluble puede expresarse en un nivel (concentración) de al menos 5 mg/L (por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o 500 mg/L, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml o más). Típicamente, el nivel de expresión de la proteína BoNT/A monocatenaria se refiere al nivel de BoNT/A monocatenaria en un cultivo celular. En una realización, dicho nivel de expresión se refiere al homogeneizado de la célula huésped cruda (por ejemplo, célula huésped bacteriana), es decir, un homogeneizado bruto de las células huésped (por ejemplo, células huésped bacterianas) usado para expresar la proteína BoNT/A monocatenaria. Por lo tanto, en una realización, el nivel de expresión de la proteína BoNT/A monocatenaria en el homogeneizado de la célula huésped cruda, por ejemplo, el homogeneizado de la célula huésped bacteriana cruda es de al menos 5 mg/L (como se define en el presente documento).

El método para producir la proteína BoNT/A monocatenaria soluble, como se describió anteriormente, puede comprender la lisis de la célula huésped, preferiblemente una célula huésped bacteriana, con máxima preferencia, una célula huésped de *E. coli* para proporcionar un homogeneizado de la célula huésped, más preferiblemente un homogeneizado de la célula huésped bacteriana, con máxima preferencia, un homogeneizado de la célula huésped de *E. coli* que contiene dicha proteína BoNT/A monocatenaria soluble. Métodos y técnicas utilizados para lisar células huésped, tales como células bacterianas, particularmente células huésped de *E. coli* son conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen ultrasonido o el uso de una prensa francesa.

La purificación de *C. botulinum* o proteína monocatenaria BoNT/A expresada en *E. coli* se puede hacer, por ejemplo, como se describe esencialmente en la técnica anterior (DasGupta 1984, Toxicon 22, 415; Sathyamoorthy 1985, J Biol Chemistry 260, 10461). En particular, la purificación de la neurotoxina puede contener una o más etapas de precipitación y extracción, una o más etapas de concentración y otras etapas cromatográficas distintas. La BoNT/A monocatenaria recombinante y su purificación se describen en la técnica anterior (Rummel et al., 2004, Mol Microbiol. 51:631-43).

La célula huésped bacteriana utilizada para producir la proteína monocatenaria BoNT/A, o un derivado de la misma, puede ser *C. botulinum* o *E. coli*. Para la fermentación, se puede utilizar el proceso descrito por DasGupta B. R. et al. en Toxicon, vol. 22, n.º 3, pág. 414 a 424, 1984. Por lo tanto, se agrega 0,5% de extracto de levadura y 0,6% de pasta de levadura autoclavada al 2% del medio N-Zamina tipo A, y se ajustará un pH de 7,2 con la ayuda de NaOH 4 M, y el medio preparado de tal manera luego se autoclavará. A este medio se le puede agregar glucosa autoclavada por separado (20% en peso por volumen), para llegar a una concentración final de glucosa del 0,5% en el medio. La incubación puede ocurrir, por ejemplo, a 37 °C sin agitación, en donde la fermentación se interrumpe, por ejemplo, después de 96 horas. Se puede usar fermentación discontinua, fermentación semicontinua, fermentación por lotes repetidos o fermentación continua.

Después de la fermentación real y la separación del medio de fermentación de las células, el medio de fermentación puede experimentar una primera precipitación con el objetivo de eliminar proteínas grandes. La precipitación es preferiblemente una precipitación ácida. Las condiciones de reacción para tal precipitación ácida son conocidas por los expertos en la técnica. Típicamente, se puede usar H₂SO₄ 1,5 M para acidificar el sobrenadante a un pH de 3,5. La centrifugación generalmente ocurre durante 20 minutos a 2400x g a 4 °C. El pellet recibido por centrifugación puede lavarse con agua, preferiblemente en forma repetida. Posteriormente, el pellet se puede extraer con un tampón de citrato trisódico de ácido cítrico 0,1 M, pH 5,5, por ejemplo, por una hora. Posteriormente, se puede realizar una etapa de centrifugación adicional, por ejemplo, a 9800x g durante 20 minutos a 4 °C. El pellet así obtenido opcionalmente se puede extraer otra vez como se describió con anterioridad. El sobrenadante de la extracción, y ambos sobrenadantes en caso de repetición de la extracción, pueden someterse a precipitación con sulfato de protamina. La precipitación puede continuar durante la noche, por ejemplo, a 8 °C. Posteriormente, el

precipitado se puede centrifugar, por ejemplo, durante 20 minutos a 4 °C y a 12000xg. El sobrenadante de centrifugación puede estar sujeto a una precipitación tal como una precipitación con sulfato de amonio, por lo que se pueden eliminar otras proteínas más grandes. Después de la etapa de precipitación con sulfato de amonio, puede agregarse otra etapa de centrifugación y, posteriormente, el pellet así obtenido puede redisolverse y, opcionalmente, someterse a diálisis. El extracto que preferiblemente se dializa y centrifuga nuevamente, puede someterse a una sucesión de etapas de cromatografía con el objetivo de purificar la neurotoxina. Cada una de las etapas de la cromatografía sirve para eliminar contaminantes como el sulfato de protamina, el ADN restante, partes de proteínas más pequeñas y proteínas de tamaño mediano, así como las hemaglutininas del complejo proteico de la neurotoxina botulínica. Para este propósito, se pueden usar una o más etapas de cromatografía en una realización preferida. Opcionalmente, el eluato de, por ejemplo, la última etapa de cromatografía puede filtrarse para eliminar microorganismos. Opcionalmente, el eluato se puede diluir antes de la filtración y se pueden agregar adyuvantes adecuados. Durante las etapas posteriores, se puede llevar a cabo otra filtración estéril después de la adición de los adyuvantes. En un aspecto, la filtración se lleva a cabo en recipientes de reacción que luego pueden estar sujetos a una etapa de liofilización.

La proteína monocatenaria BoNT/A puede ponerse en contacto con Lys-C después de que se haya aislado de la célula huésped o del lisado de la célula huésped y luego se haya sometido al método de la presente invención.

Cuando la proteína BoNT/A monocatenaria de la invención se pone en contacto con Lys-C, la acción proteolítica de Lys-C escinde la proteína monocatenaria en un sitio entre el componente de proteasa de cadena L y el componente de translocación para producir una proteína bicatenaria, donde las dos cadenas están unidas por un puente disulfuro. Por ejemplo, las dos cadenas formadas después de la escisión de BoNT/A1, A2 y A4-A6 monocatenaria en el sitio de activación son una primera cadena de residuos de aminoácidos 1-438 y una segunda cadena de residuos de aminoácidos 449-1296 (excepto en A6, en donde la segunda cadena tiene residuos de aminoácidos 449-1297), con los residuos 439-447 eliminados por el evento de escisión. Las dos cadenas formadas después de la escisión de BoNT/A3 monocatenaria en el sitio de activación son una primera cadena de residuos de aminoácidos 1-434 y una segunda cadena de residuos de aminoácidos 445-1292, con los residuos 435-444 eliminados por el evento de escisión. Por lo tanto, Lys-C se puede usar para activar el polipéptido monocatenario al convertirlo en la forma de cadena doble activa. Ventajosamente, por lo tanto, el uso de Lys-C significa que no es necesario diseñar un sitio de escisión exógeno (no nativo) en una BoNT/A, y también permite la producción de la doble cadena de BoNT/A nativa.

En una realización, la referencia a Lys-C abarca enzimas similares a Lys-C y variantes que se escinden en el mismo sitio de escisión de proteasa que Lys-C, como se describe en el presente documento.

La expresión “poner en contacto”, como se usa en el presente documento, se refiere a poner al menos dos compuestos diferentes en proximidad física para permitir la interacción física y/o química de dichos compuestos. De acuerdo con el método de esta invención, dichos dos compuestos diferentes son una proteína monocatenaria BoNT/A y Lys-C, que están comprendidos en una solución. El contacto se lleva a cabo en condiciones y durante un tiempo es suficiente para permitir la interacción de la proteína monocatenaria BoNT/A y Lys-C.

La expresión “ser susceptible a proteólisis” se refiere a una característica o requisito de la proteína monocatenaria BoNT/A y se usa en el presente documento, lo que significa que dicha proteína monocatenaria BoNT/A es escindible proteolíticamente por Lys-C. En otras palabras, la expresión “ser susceptible a proteólisis” significa que la proteína monocatenaria BoNT/A comprende un sitio de escisión y reconocimiento de proteasas que le permite funcionar como un sustrato de la Lys-C. Como se describe en el presente documento, la proteína monocatenaria BoNT/A es un sustrato de Lys-C y se procesa proteolíticamente en dos o más productos de escisión (preferiblemente solo dos péptidos: la cadena L o fragmento de la misma y la cadena H o fragmento de la misma unidos juntos a través de un enlace disulfuro). Usando el ensayo descrito anteriormente en el presente documento, la persona experta puede probar si una proteína monocatenaria BoNT/A dada es un sustrato del primer polipéptido y, por lo tanto, un “segundo polipéptido” según la definición de la presente invención. La expresión “al menos dos productos de escisión” incluye, por ejemplo, hasta dos, tres, cuatro, cinco y hasta seis productos de escisión.

Este método puede usarse, por ejemplo, para preparar una composición farmacéutica que comprende una doble cadena de BoNT/A o para generar fragmentos de polipéptidos usados en un método de espectrometría de masas. Lys-C y la proteína monocatenaria BoNT/A pueden ponerse en contacto en varias etapas en el proceso de producción de la doble cadena de BoNT/A. Por ejemplo, la etapa de poner en contacto Lys-C y la proteína monocatenaria BoNT/A puede estar dentro de una célula, tal como mediante la expresión de Lys-C y la proteína monocatenaria BoNT/A en dicha célula.

Alternativamente, dicha etapa de puesta en contacto está en un lisado celular o en un lisado celular purificado. Esto incluye agregar Lys-C al lisado o al lisado purificado. Lys-C se puede agregar en varias etapas durante la purificación de la proteína monocatenaria BoNT/A del lisado celular. Por ejemplo, Lys-C se puede agregar antes o después de: precipitación de proteínas, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y/o cromatografía de exclusión por tamaño.

La etapa de contactar requiere la incubación en condiciones y durante un tiempo suficiente para que Lys-C escinda la proteína monocatenaria BoNT/A. Las condiciones de ejemplo pueden comprender la adición de un tampón

seleccionado del grupo que consiste en Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 o PBS (Na₂HPO₄, 150 mM, pH 7,4 mM). Las condiciones de tampón preferidas incluyen Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. El "tiempo suficiente para escindir" puede determinarse usando el ensayo descrito anteriormente en el presente documento. En un aspecto, dicho "tiempo suficiente para escindir" depende del grado de escisión que el polipéptido procesado proteolíticamente o una composición que lo comprenda debería tener. En un aspecto, el método comprende una etapa de incubación de la proteína monocatenaria BoNT/A y Lys-C durante al menos 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos o al menos 240 minutos. En otro aspecto, la proteína monocatenaria BoNT/A y Lys-C se incuba durante hasta 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos, 240 minutos, 480 minutos o hasta 600 minutos. En otro aspecto, el método comprende una etapa de incubación de la proteína monocatenaria BoNT/A y Lys-C a 4 °C o a 37 °C. En otro aspecto, el método comprende una etapa de incubación de hasta 1 h, hasta 2 h, 4 h, 6 h, 10 h o hasta 16 h.

En una realización, en la que la invención proporciona un método (como se describió anteriormente) para producir proteína BoNT/A bicatenaria soluble, el método comprende separar la proteína BoNT/A soluble de la Lys-C poniendo en contacto la solución que contiene proteína BoNT/soluble y Lys-C con una superficie hidrófoba, en donde la proteína soluble BoNT/Lys-C se une preferiblemente a la superficie hidrófoba.

Los presentes inventores han encontrado que se pueden obtener altos rendimientos de la proteína BoNT/A bicatenaria activada mediante el uso de un proceso de purificación hidrófoba para separar el polipéptido bicatenario activado de Lys-C. Sorprendentemente, este proceso proporciona una purificación superior a la purificación estándar mediante cromatografía de intercambio iónico, que los presentes inventores han encontrado que es menos eficaz para separar el polipéptido bicatenario activado de Lys-C. Además, el proceso proporciona ventajosamente una proteína BoNT/A bicatenaria activada que está libre de la proteasa activadora y, por lo tanto, adecuada para su uso en terapia, como parte de un proceso de purificación general.

Como se describe en el presente documento, la producción de BoNT/A recombinante activa requiere una etapa proteolítica que escinde la molécula en la forma bicatenaria activa. Esta escisión se puede lograr mediante una etapa de activación in vitro utilizando la endoproteinasa Lys-C. Después de la etapa de activación, es importante eliminar la Lys-C del producto final, lo que también evita cualquier escisión no específica de BoNT/A.

Como se muestra en la Tabla 2 a continuación, los puntos isoeléctricos calculados (pI) de Lys-C y BoNT/A son 6,70 y 6,05, respectivamente, lo que indica que la separación de las dos proteínas debe lograrse mediante cromatografía de intercambio iónico (IEX), explotando la diferencia de carga entre las dos moléculas. La carga neta de una proteína se ve afectada por el pH de su entorno y se cargará de manera más positiva o negativa dependiendo de si gana o pierde protones. El pI es el valor de pH en el que una molécula no lleva carga eléctrica y, por lo tanto, no interactuará con un medio de IEX cargado. Esto significa que si una proteína está a un pH por encima de su pI, entonces llevará una carga negativa neta y se unirá a un medio cargado positivamente, como un intercambiador de aniones. De manera similar, si el pH del tampón está por debajo de pI, la proteína llevará una carga positiva neta y no se unirá a un intercambiador de aniones.

Además, como se ilustra en la Tabla 2, BoNT/A y Lys-C tienen hidropatías medias similares, pero grandes diferencias de carga a pH 4,5 y 8,0. En base a este principio, se esperaría que la cromatografía de intercambio iónico (IEX) se pudiera usar para resolver (separar) BoNT/A y Lys-C. IEX es un método de cromatografía simple y económico, ya que no requiere que la proteína cargada en la columna esté en un tampón con alto contenido de sal, lo que puede provocar pérdidas de proteínas por precipitación.

Los presentes inventores han probado una variedad de columnas de intercambio aniónico, utilizando grupos funcionales fuertes y débiles unidos a perlas de agarosa reticuladas, a pH 8. En comparación con la elución de BoNT/A, se descubrió que, inesperadamente, Lys-C se eluyó a una fuerza iónica similar (Tabla 3; Figuras 7 a 10), lo que indica que Lys-C no se separó como se predijo y estaría presente en el producto de BoNT/A purificado final con la posibilidad adicional de una mayor degradación de BoNT/A.

Los presentes inventores han resuelto el problema anterior. Con más detalle, los inventores han identificado sorprendentemente que la separación óptima de Lys-C-BoNT/A se logra mediante el uso de una superficie de separación hidrófoba (por ejemplo, mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), que separa las proteínas de acuerdo con las diferencias en su hidrofobicidad superficial utilizando una interacción reversible entre estas proteínas y la superficie hidrófoba de una matriz de HIC /resina).

Típicamente, la cadena doble activa de BoNT/A se une preferiblemente a la superficie hidrófoba de la resina/matriz de HIC (estos términos se usan de manera indistinta en el presente documento) en comparación con la unión de Lys-C a la superficie hidrófoba. La unión "preferencial" se puede definir como una unión aumentada o mejorada de la bicatenaria de BoNT/A activa a la superficie hidrófoba en comparación con la unión de Lys-C a la superficie hidrófoba. Por ejemplo, la doble cadena de BoNT/A activa puede unirse a la superficie hidrófoba con al menos dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 100 veces o más la afinidad de Lys-C a la superficie hidrófoba. En una realización preferida, la cadena doble de BoNT/A activa se une a la superficie hidrófoba con al menos cinco veces, o al menos diez veces la afinidad de Lys-C a la superficie hidrófoba.

En una realización, la superficie hidrófoba es una matriz/resina inerte a la que se une un ligando que comprende o que consiste en grupos arilo o alquilo.

El término “arilo” se refiere a grupos aromáticos, por ejemplo fenilo, naftilo, tienilo e indolilo.

- 5 El término “alquilo” se refiere a grupos alifáticos que incluyen grupos de cadena lineal, cadena ramificada, cíclicos y combinaciones de los mismos. Un grupo alquilo puede tener de 1 a 12 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a grupos tales como metilo, etilo, propilo (por ejemplo, n-propilo, isopropilo), butilo (por ejemplo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo), pentilo, hexilo, heptilo y octilo.

En una realización, la superficie hidrófoba comprende uno o más ligandos seleccionados del grupo que consiste en: ligandos butilo, fenilo u octilo.

- 10 En una realización, la superficie hidrófoba comprende ligandos butilo. En una realización, la superficie hidrófoba comprende ligandos fenilo. En una realización, la superficie hidrófoba comprende ligandos octilo.

- 15 La superficie hidrófoba puede contener cualquier matriz/resina inerte adecuada con un ligando hidrófobo apropiado unido. Por ejemplo, la matriz/resina inerte puede seleccionarse de sílice, dextrano reticulado, poliacrilamida reticulada o agarosa reticulada, y similares. También se incluyen en particular polipéptidos, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, polietilenglicol (PEG), dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabbros y magnetita. La matriz inerte es, por ejemplo, una matriz de polisacárido seleccionada del grupo que consiste en: sefarosa, sephadex, agarosa, sephacell, microcelulosa y perlas de alginato. En otro aspecto, dicha matriz/resina inerte puede consistir en perlas de vidrio y/o matrices de polipéptidos.

- 20 La matriz/resina inerte puede tener cualquier configuración o disposición estructural adecuada. Por ejemplo, la matriz/resina puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la matriz puede ser irregular o plana, como una lámina o tira de prueba.

- 25 Los presentes inventores han descubierto que se obtienen resultados particularmente preferibles para separar Lys-C de BoNT/A con HIC usando matrices de cromatografía/resinas que contienen grupos alquilo o arilo, por ejemplo ligandos butilo, fenilo y octilo, acoplados a un inerte matriz/resina, como perlas de agarosa reticulada o de poliestireno (Tabla 4; Figuras 1 a 3).

El uso de HIC proporciona una resolución mejorada de Lys-C a partir de la doble cadena de BoNT/A activa en comparación con la cromatografía de intercambio iónico (IEX).

- 30 Las resinas/matrices de cromatografía HIC de “flujo rápido” pueden usarse de acuerdo con la presente invención. Una resina/matriz de “flujo rápido” puede definirse como una resina/matriz con un tamaño de partícula promedio más uniforme que una resina/matriz HIC estándar y utilizará partículas más pequeñas. Específicamente, una resina/matriz de “flujo rápido” tendrá un intervalo más estrecho de tamaños de partículas más pequeños. El tamaño de partícula puede cuantificarse de cualquier manera apropiada conocida en la técnica, por ejemplo, en términos de diámetro medio de partícula. Típicamente, una resina/matriz de “flujo rápido” comprenderá partículas (por ejemplo, perlas) de un diámetro promedio de menos de 100 μm , menos de 95 μm , menos de 90 μm o menos. En una realización preferida, el diámetro promedio de una resina/matriz de “flujo rápido” es inferior a 90 μm . Típicamente, la dispersión promedio de partículas de una resina/matriz de “flujo rápido” será de aproximadamente 20 a aproximadamente 180 μm , de aproximadamente 30 a aproximadamente 170 μm , de aproximadamente 40 a aproximadamente 170 μm , de aproximadamente 40 a aproximadamente 165 μm . En una realización preferida, la dispersión media de partículas de una resina/matriz de “flujo rápido” es de aproximadamente 44 a aproximadamente 165 μm .

- 45 En una realización preferida, se usan resinas de HIC de alto rendimiento, tales como resinas de fenilo de alto rendimiento (PhHP) o de butilo de alto rendimiento (BuHP). Dichas matrices/resinas de HIC de alto rendimiento suelen proporcionar una resolución mejorada de Lys-C de la doble cadena de BoNT/A activa en comparación con la cromatografía de intercambio iónico (IEX), incluso cuando se utilizan las matrices/resinas de IEX de alto rendimiento, como la matriz/resina de amina cuaternaria de alto rendimiento (QHP). Como se analiza en el presente documento, la principal diferencia entre las resinas/matrices de alto rendimiento y otras es que el tamaño promedio de partícula (nuevamente, esto puede cuantificarse de cualquier manera apropiada conocida en la técnica, por ejemplo, el diámetro promedio de partícula) es menor (34 frente a 90 μm) y más uniforme (24-44 vs. 44-165 μm), lo que resulta en una resolución mejorada.

- 50 Una resina/matriz de HIC de alto rendimiento generalmente tiene un tamaño de partícula promedio más uniforme que una resina/matriz de HIC estándar, o incluso una resina/matriz de “flujo rápido” como se define en el presente documento y utilizará partículas más pequeñas. Específicamente, una resina/matriz de HIC de alto rendimiento tendrá un intervalo más estrecho de tamaños de partículas más pequeños que una resina/matriz de HIC estándar, o incluso una resina/matriz de “flujo rápido” como se define en el presente documento.

Por lo tanto, la invención proporciona el uso de resinas/matrices de HIC de alto rendimiento. Típicamente, una

resina/matriz de HIC de alto rendimiento tiene un diámetro de partícula promedio de menos de 70 μm , menos de 60 μm , menos de 50 μm , menos de 40 μm , menos de 30 μm , o menos. En una realización preferida, una resina/matriz de HIC de alto rendimiento tiene un diámetro de partícula promedio de menos de 40 μm , más preferiblemente menos de 35 μm , por ejemplo, de 34 μm .

- 5 Típicamente, la dispersión promedio de partículas de una resina/matriz de HIC de alto rendimiento será de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 μm , de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 μm , de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 μm , de aproximadamente 20 a aproximadamente 44 μm . En una realización preferida, la dispersión promedio de partículas de una resina/matriz de alto rendimiento es de aproximadamente 22 a aproximadamente 44 μm .
- 10 Típicamente, el proceso de purificación hidrófoba para separar la proteína BoNT/A bicatenaria activada de Lys-C reduce la concentración de Lys-C al menos dos veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 35 veces, al menos 40 veces, al menos 45 veces o al menos 50 veces. En una realización preferida, el proceso de purificación hidrófoba para separar la proteína BoNT/A bicatenaria activada de Lys-C reduce la concentración de Lys-C al menos 10 veces.
- 15 La capacidad de la purificación hidrófoba para separar la cadena BoNT/A bicatenaria activa de Lys-C también se puede cuantificar en términos del porcentaje de la Lys-C contenida en la solución de partida que comprende la BoNT/A bicatenaria activa y Lys-C que queda después de la etapa de purificación hidrófoba. Típicamente, menos del 80%, menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 45%, menos del 40%, menos del 35%, menos del 30%, menos del 25%, menos del 20%, menos del 19%, menos del 18%, menos del 17%, menos del 16%, menos del 15%, menos del 14%, menos del 13%, menos del 12%, menos del 11%, menos del 10%, menos del 9%, menos del 8%, menos del 7%, menos del 6%, menos del 5%, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2%, menos del 1% o menos, incluyendo el 0% de Lys-C queda en el producto de BoNT/A bicatenaria después de la etapa de purificación hidrófoba. Preferiblemente, menos del 50%, más preferiblemente, menos del 25%, incluso más preferiblemente menos del 10% de Lys-C queda en el producto de BoNT/A bicatenaria después de la etapa de purificación hidrófoba.
- 20
- 25 Los aspectos relacionados también se describen aquí:
 - una proteína BoNT/A bicatenaria activa obtenible por un método (como se describió con anterioridad) para producir proteína BoNT/A bicatenaria soluble;
 - una composición que comprende una proteína BoNT/A bicatenaria activa (como se describió con anterioridad), en donde dicha composición está sustancialmente libre de Lys-C.
- 30 Por lo tanto, la composición está, de modo ventajoso, sustancialmente libre de proteasa Lys-C (utilizada para activar el polipéptido monocatenario mediante la conversión a la forma bicatenaria activa), evitando así la escisión no específica no deseada de la proteína BoNT/A.

- 35 Cuando la composición (como se describió anteriormente) está sustancialmente libre de Lys-C, la composición típicamente contiene menos de 400 picogramos (pg) de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A; por ejemplo, menos de 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 5, 4, 3, 2, 1 pg o menos de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A. En una realización, la composición (como se describió con anterioridad) contiene menos de 400 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 350 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 300 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 250 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 200 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 150 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 100 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 50 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 40 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 30 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 20 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 15 pg de Lys-C por 100 ng de BoNT/A, menos de 14 pg de Lys-C por 100 ng de BoNT/A, menos de 13 pg de Lys-C por 100 ng de BoNT/A, menos de 12 pg de Lys-C por 100 ng de BoNT/A proteína, menos de 11 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 10 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 9 pg de Lys-C por 100 ng de BoNT/A proteína, menos de 8 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 7 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 6 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 5 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos. En una realización preferida, la composición (como se describió con anterioridad) contiene menos de 100 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A o menos de 50 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 20 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 15 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A o menos de 10 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A.
- 40
- 45
- 50

- 55 Los métodos para determinar la concentración de Lys-C en una composición son conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, la concentración de Lys-C en una composición de la invención puede determinarse usando ELISA en sándwich (Ensayo inmunosorbente ligado a enzima) o un ensayo colorimétrico como se describe en el presente documento.

Composiciones farmacéuticas e indicaciones terapéuticas

La presente solicitud también describe una composición obtenible por el método de la presente invención para la

producción de una doble cadena de BoNT/A. En un aspecto, dicha composición comprende una mezcla de BoNT/A procesada (cadena doble) y no procesada (cadena simple), en donde dicha mezcla puede contener menos del 5%, 4%, 3%, 2% o menos del 1% de BoNT/A sin procesar (cadena simple). En un aspecto de dicha composición, las referencias a BoNT/A abarcan un derivado del mismo como se define en el presente documento. La composición puede ser, por ejemplo, una composición líquida o sólida y puede contener uno o más portadores, adyuvantes y/o excipientes.

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método para la fabricación de un medicamento, es decir, una composición farmacéutica, que comprende las etapas del método mencionado anteriormente y la etapa adicional de formular la BoNT/A bicatenaria purificada como medicamento. Típicamente, dicho medicamento comprende una mezcla de BoNT/A procesada (cadena doble) y no procesada (cadena simple), en donde dicha mezcla contiene menos del 20%, menos del 15%, menos del 10%, menos del 5% o menos de BoNT/A sin procesar (cadena simple). En una realización preferida, la mezcla contiene menos del 5% de BoNT/A sin procesar (cadena simple), tal como menos del 5%, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2% o menos del 1% de BoNT/A sin procesar (cadena simple).

La presente solicitud también describe varios usos médicos y estéticos (cosméticos) de los compuestos y composiciones descritos en el presente documento. De acuerdo con esto, la presente solicitud describe una doble cadena de BoNT/A activa que se puede obtener mediante el método de la invención o una composición que comprende dicha doble cadena de BoNT/A activa para usar como medicamento o en una composición farmacéutica. También describe el uso de una doble cadena de BoNT/A activa obtenible por el método de la invención o una composición que comprende dicha doble cadena de BoNT/A activa en la fabricación de un medicamento.

La presente solicitud también describe una doble cadena de BoNT/A activa obtenible por el método de la invención o una composición que comprende dicha doble cadena de BoNT/A activa para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. También describe un método de tratamiento que comprende la administración de una doble cadena de BoNT/A activa obtenible por el método de la invención o una composición que comprende dicha doble cadena de BoNT/A activa a un paciente que lo necesite.

El término “composición” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier composición formulada en forma sólida, líquida, en aerosol (o gaseosa), y similares. Dicha composición comprende, por ejemplo, un compuesto terapéuticamente activo opcionalmente junto con compuestos auxiliares adecuados tales como diluyentes o portadores o ingredientes adicionales. En un aspecto, el compuesto terapéuticamente activo es la cadena de BoNT/A activa obtenible por el método de la presente invención. Típicamente, las composiciones, en particular las composiciones farmacéuticas, están sustancialmente libres de Lys-C como se define en el presente documento.

Por lo tanto, el presente método para la preparación de una composición farmacéutica puede proporcionar una composición farmacéutica sólida o líquida que comprende:

(a) una proteína BoNT/A bicatenaria activa como se describió con anterioridad, y

(b) un agente estabilizante.

En una realización, la composición (como se describió con anterioridad) está sustancialmente libre de Lys-C. Por ejemplo, la composición (como se describió con anterioridad) puede contener menos de 400 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 300 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 200 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 100 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 50 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 20 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 15 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 10 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A.

Los agentes estabilizantes que pueden usarse en estas composiciones incluyen estabilizantes de proteínas, tales como albúmina, en particular albúmina sérica humana (HSA), y estabilizantes no proteicos.

Los agentes estabilizantes no proteicos que pueden usarse en la composición incluyen tensioactivos, en particular tensioactivos no iónicos. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen polisorbato, tales como polisorbato 20 o polisorbato 80, y copolímeros de bloque tales como poloxámeros (es decir, copolímeros de polietileno y propilenglicol).

En una realización particular, la composición no comprende una proteína como agente estabilizante.

De acuerdo con una realización particular de la invención, el método para la preparación de una composición farmacéutica puede proporcionar una composición farmacéutica líquida que comprende:

(a) una proteína BoNT/A bicatenaria activa, como se describió con anterioridad;

(b) un agente estabilizante no proteico que es un tensioactivo; y

(c) agua;

en donde dicha composición farmacéutica líquida no comprende un agente estabilizante de proteínas; y en donde dicha composición farmacéutica líquida está sustancialmente libre de Lys-C, en donde “sustancialmente libre de Lys-C” es como se define en el presente documento (por ejemplo, dicha composición farmacéutica líquida contiene menos de 400 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 300 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 200 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 100 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 50 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 20 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 15 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 10 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A).

En una realización, la proteína BoNT/A bicatenaria activa está presente en la composición (como se describió con anterioridad) en una concentración de 1-1000 ng/ml o más. Por lo tanto, la proteína BoNT/A bicatenaria activa puede estar presente en la composición (como se describió con anterioridad) en una concentración de aproximadamente 1-500 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 ng/ml o más. En una realización preferida, la proteína BoNT/A bicatenaria activa está presente en una concentración de aproximadamente 100 ng/ml, 200 ng/ml, 300 ng/ml, 400 ng/ml, 500 ng/ml, 600 ng/ml o 700 ng/ml.

En una realización, el tensioactivo (como se describió anteriormente) es un polisorbato, tal como un polisorbato que tiene un grado de polimerización medio que varía de 20 a 100 unidades de monómero, y puede ser, por ejemplo, polisorbato 80. En una realización preferida, el polisorbato es de origen vegetal. La concentración del tensioactivo es preferiblemente inferior al 1% v/v, por ejemplo de aproximadamente 0,005% a 0,02% v/v en el caso del polisorbato 80.

La composición farmacéutica también puede comprender un agente cristalino.

Por agente cristalino se entiende un agente que, entre otras cosas, mantiene una estructura de torta mecánicamente fuerte frente a un complejo de neurotoxina botulínica liofilizada (tipo A, B, C₁, D, E, F o G) o una neurotoxina botulínica de alta pureza (tipo A, B, C₁, D, E, F o G). Cuando se incluyen en formulaciones sólidas, los agentes cristalinos también tienen un efecto de aumento de volumen. Los agentes cristalinos incluyen notablemente cloruro de sodio. La concentración de agente cristalino puede ser, por ejemplo, de 0,1 a 0,5 M, preferiblemente de 0,1 a 0,4 M, notablemente de aproximadamente 0,15 a 0,3 M.

La composición farmacéutica también puede comprender un tampón para mantener el pH a un nivel comprendido entre 5,5 y 7,5, o entre 6,0 y 7,0. El tampón puede ser cualquier tampón capaz de mantener el pH adecuado. Por ejemplo, el tampón para dichas composiciones se puede elegir del grupo que consiste en succinato, fosfato disódico/ácido cítrico y un aminoácido tal como histidina. La concentración del tampón puede ser, por ejemplo, de 1 a 50 mM, preferiblemente de 5 a 20 mM, con preferencia, de aproximadamente 10 mM.

La composición farmacéutica también puede comprender un disacárido.

El disacárido utilizado en dichas composiciones se puede elegir del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol y lactosa. En una realización específica, el disacárido es sacarosa. La concentración del disacárido puede ser, por ejemplo, de 5 a 50 mM, preferiblemente de 5 a 25 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM, y, con máxima preferencia, de aproximadamente 11,7 mM.

En una realización particular, el método para la fabricación de una composición farmacéutica puede proporcionar una composición farmacéutica líquida que comprende:

- (a) una proteína BoNT/A bicatenaria activa, como se describió con anterioridad;
- (b) un agente estabilizante no proteico que es un tensioactivo;
- (c) cloruro de sodio,
- (d) un tampón para mantener el pH entre 5,5 y 7,5
- (e) un disacárido, y
- (f) agua estéril,

en donde dicha composición farmacéutica líquida no comprende un agente estabilizante de proteínas; y en donde dicha composición farmacéutica líquida está sustancialmente libre de Lys-C, en donde “sustancialmente libre de Lys-C” es como se define en el presente documento (por ejemplo, dicha composición farmacéutica líquida contiene menos de 400 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 300 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 200 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 100 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 50 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 20 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, menos de 15 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 10 pg Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A).

Según una realización específica, la composición farmacéutica en forma líquida se sella en un vial o en un dispositivo listo para usar, como una jeringa, sin interfaz líquida/gaseosa, y es estable durante al menos tres meses o al menos seis meses a 23-27 °C y durante al menos doce meses a 2-8 °C. Las composiciones farmacéuticas de ejemplo se describen en los Ejemplos.

- 5 Las tasas de degradación mensuales para las composiciones o formulaciones farmacéuticas pueden ser inferiores al 5% por mes durante 12 semanas, lo que significa que la función de la proteasa BoNT bicatenaria de las composiciones o formulaciones permanece estable a 25 °C durante al menos 12 semanas.

Las composiciones farmacéuticas pueden almacenarse en forma liofilizada, secada al vacío en recipientes a presión de vacío o como líquidos estables. Antes de la liofilización, la proteína BoNT/A bicatenaria activa se puede combinar con excipientes, estabilizantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables, como la albúmina. El material liofilizado se puede reconstituir con solución salina o agua para crear una solución o composición que contenga la proteína BoNT/A bicatenaria activa para administrar a un paciente.

En este contexto, se distingue entre compuestos auxiliares, es decir, compuestos que no contribuyen a los efectos provocados por el compuesto descrito en el presente documento tras la aplicación de la composición para su propósito deseado, y otros ingredientes, es decir, compuestos que contribuyen a un efecto adicional o modular el efecto del compuesto descrito aquí. Los diluyentes y/o portadores adecuados dependen del propósito para el que se usará la composición y los otros ingredientes. El experto en la técnica puede determinar tales diluyentes y/o portadores adecuados sin más preámbulos.

El o los vehículos deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor de los mismos. El portador farmacéutico empleado puede incluir un sólido, un gel o un líquido. Los ejemplos de portadores sólidos son lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico, y similares. Los ejemplos de portadores líquidos son solución salina tamponada con fosfato, jarabe, aceite, agua, emulsiones, diversos tipos de agentes humectantes, y similares. De manera similar, el portador o diluyente puede incluir material de retardo de tiempo bien conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera. Dichos portadores adecuados comprenden los mencionados anteriormente y otros bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

Los diluyentes se seleccionan para no afectar la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank, además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros portadores, adyuvantes o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos, y similares.

En un aspecto, el método para la fabricación de una composición farmacéutica puede proporcionar una composición farmacéutica que comprende la neurotoxina biológicamente activa obtenida por el método de la presente invención (es decir, la doble cadena BoNT/A activa), opcionalmente, uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. La neurotoxina activa puede estar presente en forma líquida o liofilizada. En un aspecto, dicho compuesto puede estar presente junto con glicerol, estabilizantes de proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA)) o estabilizantes no proteicos tales como polivinilpirrolidona o ácido hialurónico. La composición farmacéutica se administra, en un aspecto, por vía tópica. La administración convencional de fármacos se realiza mediante administración intramuscular o subcutánea (típicamente cerca de las glándulas sebáceas). Sin embargo, dependiendo de la naturaleza y el modo de acción de un compuesto, la composición farmacéutica también puede administrarse por otras vías. El polipéptido de neurotoxina de doble cadena es el ingrediente activo de la composición, y en un aspecto se administra en formas de dosificación convencionales preparadas combinando el fármaco con portadores farmacéuticos estándar de acuerdo con procedimientos convencionales. Estos procedimientos pueden implicar mezclar, granular y comprimir, o disolver los ingredientes según sea apropiado para la preparación deseada. Se apreciará que la forma y el carácter del portador o diluyente farmacéuticamente aceptable está dictado por la cantidad de ingrediente activo con el que se combinará, la vía de administración y otras variables bien conocidas.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad del compuesto, la neurotoxina, que se utilizará en una composición farmacéutica que previene, mejora o trata los síntomas que acompañan a una enfermedad o afección mencionada en esta especificación. La eficacia terapéutica y la toxicidad del compuesto pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación, LD₅₀/ED₅₀.

El régimen de dosificación será determinado por el médico tratante y otros factores clínicos. Como es bien sabido en la técnica médica, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se administrará, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros medicamentos administrados simultáneamente. El progreso puede ser monitoreado por evaluación periódica. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas a las que se hace referencia en el presente documento se administran al menos una vez para tratar o mejorar o prevenir una

enfermedad o afección mencionada en esta especificación. Sin embargo, dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse más de una vez.

Como se describe en el presente documento, las proteínas BoNT/A bicatenarias activas obtenibles por el método de la invención, y las composiciones y composiciones farmacéuticas líquidas de las mismas, pueden usarse en terapia. Las terapias adecuadas pueden incluir tratamientos cosméticos y métodos de tratamiento médico.

La composición mencionada anteriormente puede ser un medicamento o una composición cosmética. En un aspecto, dicho medicamento que comprende la neurotoxina biológicamente activa (es decir, doble cadena de BoNT/A activa) puede usarse para la prevención y/o el tratamiento de al menos una de las siguientes enfermedades y trastornos: fuerza muscular voluntaria, distonía focal, incluyendo distonía cervical craneal y blefaroespasma esencial benigno, espasmo hemifacial y espasticidad focal, trastornos gastrointestinales, hiperhidrosis y corrección cosmética de arrugas, en otro aspecto también blefaroespasma, distonía oromandibular, tipo de apertura de la mandíbula, tipo de cierre de la mandíbula, bruxismo, síndrome de Meige, distonía lingual, apraxia de los párpados, distonía cervical de apertura, antecollis, retrocollis, laterocollis, tortícolis, distonía faríngea, distonía laríngea, disfonía espasmódica/de tipo aductor, disfonía espasmódica/de tipo abductor, disnea espasmódica, distonía de las extremidades, distonía del brazo, distonía de tarea específica, calambre del escritor, calambre del músico, calambre del golfista, distonía de pierna, aducción de muslo, abducción de muslo, flexión de rodilla, extensión de rodilla, flexión del tobillo, extensión del tobillo, equinovaro, deformidad, distonía del pie, dedo del pie estriado, flexión del dedo del pie, extensión del dedo del pie, distonía axial, síndrome de Pisa, distonía de bailarina del vientre, distonía segmentaria, hemidistonia, distonía generalizada, distonía en lubag, distonía en degeneración corticobasal, distonía tardía, distonía en ataxia espinocerebelar, distonía en la enfermedad de Parkinson, distonía en la enfermedad de Huntington, distonía en la enfermedad de Hallervorden Spatz, disquinesias inducidas por dopa/distonía inducida por dopa, disquinesias tardías/distonía tardía, disquinesias/distonías paroxísticas, mioclono palatal inducido por la acción kinesiogénica, no kinesiogénica, mioquimia mioclónica, rigidez, calambres musculares benignos, temblor hereditario del mentón, actividad muscular de la mandíbula paradójica, espasmos hemimasticadores, miopatía branquial hipertrófica, hipertrofia masetéica, hipertrofia tibial anterior, nistagmo, oscilopsia supranuclear, parálisis visual, epilepsia, partialis continua, planificación de la operación de tortícolis espasmódica, parálisis de la cuerda vocal abductora, disforia mutacional recalcitrante, disfunción del esfínter esofágico superior, granuloma de cuerdas vocales, tartamudeo, síndrome de Gilles de la Tourette, mioclono del oído medio, cierre laríngeo protector, poslaríngectomía, falla del habla, ptosis protectora, entropión, disfunción del esfínter de Odi, pseudoacalasia, no acalasia, trastornos motores esofágicos, vaginismo, temblor de inmovilización posoperatoria, disfunción de la vejiga, disinergia del esfínter detrusor, espasmo del esfínter de la vejiga, espasmo hemifacial, disquinesias de reinervación, uso cosmético de los pies de gateo, asimetrías faciales fruncidas, hoyuelos del mentón, síndrome de persona rígida, tétanos, hiperplasia de próstata, adiposidad, tratamiento infantil de parálisis cerebral, estrabismo, concomitante paralítico mixto, después de cirugía de desprendimiento de la retina, después de cirugía de cataratas, en afaquia, estrabismo miosítico, estrabismo miopático, desviación vertical disociada, como un complemento a la cirugía de estrabismo, esotropía, exotropía, acalasia, fisuras anales, hiperactividad de las glándulas exocrinas, síndrome de Frey, síndrome de lágrimas de cocodrilo, hiperhidrosis, rinorrea plantar palmar axilar, hiperesalivación relativa en apoplejía, en Parkinson, en condiciones espásticas de esclerosis lateral amiotrófica, en procesos de encefalitis y mielitis autoinmunes, esclerosis múltiple, mielitis transversa, síndrome de Devic, infecciones virales, infecciones bacterianas, infecciones parasitarias, infecciones fúngicas, en paraparesia espástica hereditaria, síndrome posapopléctico, infarto hemisférico, infarto del tronco encefálico, infarto de mielón, migraña, en traumatismos del sistema nervioso central, lesiones hemisféricas, lesiones del tronco encefálico, lesión de mielón, en hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia intracerebral, hemorragia subaracnoidea, hemorragia subdural, hemorragia intraespinal, en neoplasias, tumores hemisféricos, tumores del tronco encefálico, tumores de mielón, ronquidos (documento WO 2000/033863). Para detalles y síntomas, ver, por ejemplo, Jost 2007, Drugs 67(5), 669 o Dressler 2000 en Botulinum Toxin Therapy, Thieme Verlag, Stuttgart, Nueva York.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para la preparación de una composición cosmética que puede formularse como se describe para una composición farmacéutica anterior. Del mismo modo, para una composición cosmética, se prevé que el compuesto como se describe en el presente documento esté en un aspecto usado en forma sustancialmente pura. Las composiciones cosméticas son, en otro aspecto, para aplicarse por vía intramuscular. En un aspecto aún más, las composiciones cosméticas que comprenden la neurotoxina pueden formularse como una solución antiarrugas.

Clave para las SEQ ID NOs

SEQ ID NO: 1 BoNT/A de ATCC 3502, acceso a Genbank. "AAA23262"

SEQ ID NO: 2: bucle de activación de BoNT/A1

SEQ ID NO: 3: bucle de activación de BoNT/A2/A6

SEQ ID NO: 4: bucle de activación de BoNT/A3

SEQ ID NO: 5: bucle de activación de BoNT/A3

SEQ ID NO: 6: bucle de activación de BoNT/A4

SEQ ID NO: 7: bucle de activación de BoNT/A5

SEQ ID NO: 8: polipéptido proteolíticamente activo derivado de una cepa de *Clostridium botulinum* ATCC 3502, acceso a GenBank N.º: "CAL82988.1", que carece de 248 residuos de aminoácidos N-terminales

- 5 SEQ ID NO:9: polipéptido proteolíticamente inactivo derivado de una cepa de *Clostridium botulinum* ATCC 3502, acceso a GenBank N.º: "CAL82988.1"

SEQ ID NO: 10: secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 8

SEQ ID NO: 11: secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 9

SEQ ID NO: 12: secuencia de ácido nucleico "Streptag"

- 10 SEQ ID NO: 13: bucle de activación de BoNT/A7

SEQ ID NO: 14: bucle de activación de BoNT/A8

SEQ ID NO: 15: secuencia de aminoácidos de n derivado de subserotipo A1 de neurotoxina botulínica catiónica, recombinante monocatenaria (mrBoNT/A1)

Listado de Figuras

- 15 Figura 1: Perfiles de elución de la columna de fenilo de alto rendimiento (PhHP) en la que se evaluó la separación de Lys-C (barras A₄₀₅) de BoNT/A (línea de puntos A₂₈₀).

Figura 2: Perfiles de elución de la columna de alta sustitución de fenilo de flujo rápido (PhFF-Hi) en la que se evaluó la separación de Lys-C (barras A₄₀₅) de BoNT/A (línea de puntos A₂₈₀).

- 20 Figura 3: Perfiles de elución de la columna de butilo de alto rendimiento (BuHP) en la que se evaluó la separación de Lys-C (barras A₄₀₅) de BoNT/A (línea de puntos A₂₈₀).

Figura 4: Perfiles de elución de la columna sulfopropilo de alto rendimiento (SPHP) en la que se evaluó la separación de Lys-C (barras A₄₀₅) de BoNT/A (línea de puntos A₂₈₀).

Figura 5: Perfiles de elución de la columna de sulfopropilo de flujo rápido (SPFF) en la que se evaluó la separación de Lys-C (barras A₄₀₅) de BoNT/A (línea de puntos A₂₈₀).

- 25 Figura 6: Perfiles de elución de la columna de carboximetilo de flujo rápido (CMFF) en la que se evaluó la separación de Lys-C (barras A₄₀₅) de BoNT/A (línea de puntos A₂₈₀).

Figura 7: Perfiles de elución de la columna de alto rendimiento de amina cuaternaria (QHP) en la que se evaluó la separación de Lys-C (barras A₄₀₅) de BoNT/A (línea de puntos A₂₈₀).

- 30 Figura 8: Perfiles de elución de la columna de flujo rápido de amina cuaternaria (QFF) en la que se evaluó la separación de Lys-C (barras A₄₀₅) de BoNT/A (línea de puntos A₂₈₀).

Figura 9: Perfiles de elución de la columna de dietilaminopropilo (DEAP, "ANX") en la que se evaluó la separación de Lys-C (barras A₄₀₅) de BoNT/A (línea de puntos A₂₈₀).

Figura 10: Perfiles de elución de la columna de dietilaminoetilo (DEAE) en la que se evaluó la separación de Lys-C (barras A₄₀₅) de BoNT/A (línea de puntos A₂₈₀).

- 35 Figura 11: Eliminación de Lys-C de rBoNT/A1 por HP HIC de fenilo. Las fracciones tomadas de la etapa de pulido por PhHP HIC se analizaron mediante SDS-PAGE (arriba). La BoNT/A1 recombinante tiene un peso molecular de ~149 kiloDaltons (kDa) y los marcadores de peso molecular (Benchmark) están marcados en kDa. También se analizaron muestras de las mismas fracciones en el ensayo colorimétrico de Lys-C (parte inferior) donde la escisión del sustrato libera un cromóforo amarillo (en el recuadro negro).

- 40 Figura 12: Eliminación de Lys-C de rBoNT/A2(0) por HP HIC de fenilo. Las fracciones tomadas de la etapa de pulido por HP HIC de fenilo se analizaron mediante SDS-PAGE (arriba). La BoNT/A1 recombinante tiene un peso molecular de ~149 kDa y los marcadores de peso molecular (Benchmark) están marcados en kDa. También se analizaron muestras de las mismas fracciones en el ensayo colorimétrico de Lys-C (parte inferior) donde la escisión del sustrato libera un cromóforo amarillo (en el recuadro negro).

- 45 **Figura 13:** Eliminación de Lys-C de rBoNT/A5(0) por HP HIC de fenilo. Las fracciones tomadas de la etapa de pulido por HP HIC de fenilo se analizaron mediante SDS-PAGE (arriba). La BoNT/A5(0) recombinante tiene un peso molecular de ~149 kDa y los marcadores de peso molecular (Benchmark) están marcados en kDa. También se

analizaron muestras de las mismas fracciones en el ensayo colorimétrico de Lys-C (parte inferior) donde la escisión del sustrato libera un cromóforo amarillo (en el recuadro negro).

Figura 14: Eliminación de Lys-C de rBoNT/A6(0) por HP HIC de fenilo. Las fracciones tomadas de la etapa de pulido por HP HIC de fenilo se analizaron mediante SDS-PAGE (arriba). La BoNT/A6(0) recombinante tiene un peso molecular de ~149 kDa y los marcadores de peso molecular (Benchmark) están marcados en kDa. También se analizaron muestras de las mismas fracciones en el ensayo colorimétrico de Lys-C (parte inferior) donde la escisión del sustrato libera un cromóforo amarillo (en el recuadro negro).

Figura 15: Eliminación de Lys-C de mrBoNT/A1 por HP HIC de butilo. Las fracciones tomadas de la etapa de pulido por HP HIC de butilo se analizaron mediante SDS-PAGE (arriba). La mrBoNT/A1 recombinante tiene un peso molecular de ~149 kDa y los marcadores de peso molecular (Benchmark) están marcados en kDa. También se analizaron muestras de las mismas fracciones en el ensayo colorimétrico de Lys-C (parte inferior) donde la escisión del sustrato libera un cromóforo amarillo (en el recuadro negro).

Ejemplos

EJEMPLO 1 Cultivo del huésped y expresión de la proteína rBoNT/A soluble

Se utiliza una sola colonia de BoNT/A transformada en células BLR (DE3) para inocular un matraz cónico de 250 ml que contiene 100 ml de Caldo Terrific Broth modificado (mTB) suplementado con glucosamina al 0,2% y 30 g/ml de kanamicina. Este método sería igualmente aplicable cuando se utiliza una perla de Microbank o una solución madre de glicerol (10-100 µL) para inocular el matraz.

El matraz se incuba durante 16 horas a 37 °C con agitación a 250 RPM. Se usan 10 mL de este cultivo iniciador para inocular matraces cónicos de 2 litros, cada uno de los cuales contiene 1 litro suplementado con glucosamina al 0,2% y 30 µg/mL de kanamicina. Las células se cultivan a 37 °C durante 2 horas a 225 RPM hasta que se alcanza una OD₆₀₀ de 0,5. En este punto, la temperatura de cultivo se reduce a 16 °C. Después de 1 hora, se induce a las células a expresar BoNT/A mediante la adición de IPTG 1 mM durante 20 horas. Las células se cosechan por centrifugación durante 20 minutos a 4 °C, se pesan y luego se almacenan a -20 °C.

EJEMPLO 2 Extracción de la proteína BoNT/A del huésped y análisis del nivel de expresión

Las pastas celulares de expresión de rBoNT/A se descongelan a temperatura ambiente y se resuspenden pipeteando en 3 mL de tampón de resuspensión Tris-NaCl por gramo de células suplementadas con 10 µL de benzonasa. Las células se lisan por sonicación a 100 W 10x 30 s encendido + 45 s apagado. El lisado se centrifuga a 4000x g durante 1 h a 4 °C para obtener la rBoNT/A soluble en el sobrenadante.

Ensayo de Bradford para determinar la concentración de proteína total de lisados preparados

Se agrega una muestra (50 µL) de lisado de rBoNT/A diluido o estándar de BSA a cubetas desechables de 1 mL. Se añaden 450 µL de reactivo de ensayo Coomassie Bradford a cada cubeta y se deja incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de leer A₆₀₀. Los valores obtenidos para los estándares BSA se utilizan para determinar la cantidad de proteína en las muestras de lisado.

Análisis de transferencia Western semicuantitativa

Una muestra comercial de proteína BoNT/A comprada de MetabioLogics se usa para preparar los estándares de SDS-PAGE. Las muestras de SDS-PAGE de las muestras de lisado de los cultivos celulares expresados se preparan luego a una concentración de proteína total conocida. Estas muestras se cargan en un gel de poliacrilamida y se ejecutan a 200 V durante 50 minutos. Las bandas de proteínas se electrotransfieren sobre membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia libre de metanol a 0,4 mA durante 1 hora. Las membranas se bloquean durante 1 hora con 0,5% de BSA en PBS-0,1% Tween 20 y luego se sondean con un anticuerpo contra BoNT/A durante 1 hora. Las transferencias se sondean adicionalmente con un anticuerpo secundario conjugado con HRP, desarrollado con sustrato SuperSignal DuraWest, y se obtienen imágenes usando un instrumento de imagen Syngene.

EJEMPLO 3 Activación de neurotoxina A botulínica (BoNT/A) por Lys-C

BoNT/A1 recombinante monocatenaria (0,5 mg/ml) disuelta en tampón (Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 125 mM) se activó proteolíticamente por Lys-C (a una relación enzima:sustrato de 1:500 a 1:2500) a 37 °C o 4 °C, durante un período de 2-20 h, antes de que la reacción se inhibiera con 0,4 µM de AEBSF (clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)benzensulfonilo), un inhibidor específico de la serina proteasa. Esto produce la forma madura bicatenaria de BoNT/A1, donde la cadena pesada está unida a la cadena ligera por un enlace disulfuro simple (datos no mostrados).

Se determinó que el sitio de escisión era idéntico a la proteína endógena mediante secuenciación N-terminal y espectrometría de masas, confirmando que Lys-C es la enzima activadora de elección (datos no mostrados).

Las pruebas de escisión con endoproteinasa Lys-C demostraron que Lys-C escindió rBoNT/A1 a concentraciones muy bajas y permaneció activo durante un período de días (datos no mostrados).

EJEMPLO 4 Purificación de la proteína BoNT/A diana libre de la proteasa activadora

- 5 Utilizando la secuencia de proteína primaria BoNT/A, se investigaron las propiedades de BoNT/A y Lys-C (ver Tabla 2). Las propiedades predichas sugirieron que tanto Lys-C como BoNT/A tienen una hidropatía media similar (valor GRAVY), pero una gran diferencia de carga a pH 4,5 y 8 (ver Tabla 2).

Tabla 2: Propiedades predichas de Lys-C y BoNT/A

Propiedad (calculada)	Lys-C	BoNT/A
pI	6,70	6,05
% de residuos cargados (DEKR)	13	25
Valor promedio de hidropatía (GRAVY)*	-0,30	-0,37
Carga a pH 8,0	-5	-12
Carga a pH 4,5	+ 13	+72
(* GRAVY = la hidropatía media por residuo de una molécula (un valor positivo indica una molécula hidrófoba))		

- 10 Basándose solo en esta información, se predijo que la cromatografía de intercambio iónico (IEX) resolvería la Lys-C de BoNT/A. Por lo tanto, se investigaron diversos medios cromatográficos de purificación, incluida la cromatografía IEX (véase más adelante).

EJEMPLO 5 Detección de columnas de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) para separar Lys-C de BoNT/A

Purificación FPLC

- 15 Después de la activación de BoNT/A 1 con Lys-C, se probaron varias columnas de FPLC para pulir y eliminar Lys-C:
- tres columnas de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC): fenilo de alto rendimiento (PhHP), alta sustitución de fenilo de flujo rápido (PhFF-Hi) y HP de butilo (BuHP) se probaron con Tris pH 8;
 - tres columnas de cromatografía de intercambio catiónico (CEC): sulfopropilo de alto rendimiento (SPHP), sulfopropilo de flujo rápido (SPFF) y carboximetilo de flujo rápido (CMFF) se probaron con acetato de sodio pH 4,5;
 - cuatro columnas de cromatografía de intercambio aniónico (AEC): amina cuaternaria de alto rendimiento (QHP), flujo rápido de amina cuaternaria (QFF), dietilaminopropilo (DEAP, "ANX") y dietilaminoetilo (DEAE) se probaron con Tris pH 8.
- 20 y

- 25 Una vez que se cargó una muestra en una columna, la columna se lavó con tampón para eliminar cualquier molécula unida específicamente antes de aplicar un gradiente de elución lineal de concentración creciente o decreciente de sal (HIC y CEC/AEC, respectivamente).

Las condiciones de reacción y las ejecuciones de purificación varían entre los diferentes tipos de columna (véase la Tabla 3 a continuación).

Tabla 3: Condiciones de detección para todas las columnas probadas para resolución Lys-C

Columna	BoNT/A1 cargada (mg)	Lys-C cargada (µg)	Tampón	Gradiente de elución
PhHP	1,9	1,5	alto contenido de sal, Tris pH 8	1-0 M, 15 CV
BuHP	1,9	1,5	alto contenido de sal, Tris pH 8	1-0 M, 15 CV
PhFF-Hi	1,5	1,2	alto contenido de sal, Tris pH 8	1-0 M, 15 CV
SPHP	3,4	3,0	bajo contenido de sal,	0-0,5 M, 30 CV

			NaOAc pH 4,5	
SPFF	3,4	3,0	bajo contenido de sal, NaOAc pH 4,5	0-0,5 M, 30 CV
CMFF	3,4	3,0	bajo contenido de sal, NaOAc pH 4,5	0-0,5 M, 30 CV
QHP	2,7	2,0	bajo contenido de sal, Tris pH 8	0-0,5 M, 30 CV
QFF	2,7	2,0	bajo contenido de sal, Tris pH 8	0-0,5 M, 30 CV
ANX	2,7	2,0	bajo contenido de sal, Tris pH 8	0-0,5 M, 30 CV
DEAE	2,7	2,0	bajo contenido de sal, Tris pH 8	0-0,5 M, 30 CV

Las Figuras 1 a 10 muestran los perfiles de elución (A_{280}) de la proteína BoNT/A1 de las diversas columnas cromatográficas (líneas de puntos). Las diferentes condiciones de reacción y corridas de purificación utilizadas para las diferentes columnas explican las diferentes escalas utilizadas.

- 5 Las fracciones recogidas durante el gradiente de elución se analizaron con un ensayo colorimétrico para evaluar la actividad de Lys-C.

Ensayo colorimétrico de actividad de Lys-C

- 10 Este ensayo implicó escindir un sustrato incoloro para producir un cromóforo amarillo que puede detectarse fotométricamente mediante la absorción de luz de 405 nm (A_{405}). Por lo tanto, este ensayo proporcionó un método simple para determinar si Lys-C estaba presente en cada fracción.

Cada fracción de elución se analizó utilizando dicho ensayo colorimétrico de actividad de Lys-C y se midió A_{405} nm.

La cantidad (medida en términos de A_{405}) de Lys-C en cada una de las fracciones de elución se muestra como barras en las Figuras 1 a 10.

Resultados

- 15 Al comparar los datos de A_{405} y A_{280} (en los gráficos de las Figuras 1 a 10), fue posible deducir qué columna/s proporcionan la mejor resolución de Lys-C de BoNT/A.

- 20 Los diferentes grupos alquilo/arilo (Bu y Ph) de las tres columnas HIC utilizadas proporcionan diferentes ligandos con los que diversas proteínas pueden interactuar a través del efecto hidrófobo. Esta interacción está influenciada por la densidad (grado de sustitución (Hi/Lo) y el tamaño del cordón (FF/HP)) de estos grupos hidrófobos. Para las columnas CEC, el pH de la muestra se ajusta por debajo del pI de la proteína diana para que alcance una carga positiva neta general y, por lo tanto, pueda unirse a la columna. Los diferentes ligandos presentes en cada tipo de columna proporcionan diferentes densidades de carga, y la interacción con diferentes proteínas también está influenciada por la densidad del ligando. Estas variables se aplican de manera similar a las columnas AEC donde los diferentes grupos químicos muestran distintas densidades de carga. En este caso, el pH de la muestra se ajusta por encima del pI de la proteína diana para que alcance una carga negativa neta general.

Los datos gráficos de las Figuras 1 a 10 se resumen cualitativamente en la Tabla 4.

Tabla 4: Resumen de datos cualitativos de resolución de Lys-C/BoNT

Cromatografía			Resolución de Lys-C*
Interacción hidrófoba ^a		PhHP	✓ ✓ ✓
		BuHP	✓ ✓ ✓
		PhFF-Hi	✓ ✓
Intercambio iónico ^b	Catiónico	SPHP	✓
		SPFF	✓
		CMFF	✓

	Aniónico	QHP	✓ ✓
		QFF	✓
		ANX	✓
		DEAE	✓

* Resolución aparente de Lys-C respecto de rBoNT/A1. ✓✓✓ = buena, ✓✓ = OK, ✓ = pobre

^a Fenilo de alto rendimiento (PhHP), alta sustitución de fenilo de flujo rápido (PhFF-Hi), HP de butilo (BuHP)

^b Sulfopropilo de alto rendimiento (SPHP), sulfopropilo de flujo rápido (SPFF), carboxilmetilo de flujo rápido (CMFF), amina cuaternaria de alto rendimiento (QHP), amina cuaternaria de flujo rápido (QFF), dietilaminopropilo (DEAP, "ANX"), y dietilaminoetilo (DEAE)

Porcentaje de recuperaciones de Lys-C y purificación después de la elución de cada tipo de columna

La señal total de Lys-C en cada fracción se normalizó al valor medio de A_{405} de las últimas 5 fracciones de la etapa cromatográfica. A partir de esto, se calculó el porcentaje de Lys-C presente en las fracciones de pico de proteína para indicar el grado de separación de Lys-C de la proteína en base a las fracciones de elución (Tabla 5, % de Lys-C en las fracciones de pico de proteína (normalizado)).

Con respecto a la proteína diana, se supone que toda la molécula de BoNT/A se eluye bajo el pico principal (es decir, 100% de recuperación); por lo tanto, el grado de purificación puede expresarse como el porcentaje de la proteína total cargada que no se recupera en el pico principal (Tabla 5, % de purificación).

Una buena separación de Lys-C de BoNT/A sería aquella en la que se vio un valor bajo para el porcentaje de Lys-C en las fracciones máximas de las proteínas. A partir de esto, parece que CEC es notable para resolver Lys-C de BoNT/A1. La columna AEC de alto rendimiento, QHP, mostró cierta capacidad para resolver Lys-C de BoNT/A1. Sin embargo, fue significativamente menos efectiva que las dos columnas HIC de alto rendimiento. Por lo tanto, los resultados demuestran que, comparando el tipo similar (es decir, rendimiento estándar frente a rendimiento estándar y alto rendimiento frente a alto rendimiento), las columnas HIC mostraron una mejor resolución de Lys-C de BoNT/A1 que las columnas CEC o AEC.

Los dos candidatos más prometedores involucran a HIC PhHP y BuHP. Curiosamente, estas columnas usan perlas de alto rendimiento.

La principal diferencia entre los medios de alto rendimiento y otros es que el tamaño promedio de las partículas es más pequeño (34 vs. 90 μm) y más uniforme (24-44 vs. 44-165 μm). Esto es consistente con las mejoras reportadas en el rendimiento con columnas analíticas que usan perlas de menor tamaño (tamaños medios entre 3-30 μm) (manuales de GE Healthcare 11-0004-21 y 11-0012-69 y archivos de datos 18-1172-87 AE y 18-1172-88 AD).

Tabla 5: Resumen del rendimiento de la columna

Columna	% de Lys-C en fracciones pico de proteína (normalizadas)	% de purificación
PhHP	5	11
BuHP	7	11
PhFF-Hi	43	22
SPHP	85	20
SPFF	82	11
CMFF	81	10
QHP	26	9
QFF	51	6
ANX	70	7
DEAE	74	9

Se eligió PhHP HIC como la etapa final de pulido para resolver el Lys-C de BoNT/A (véase el Ejemplo 6 a continuación).

Ejemplo 6 Activación y purificación final del subserotipo A1 de neurotoxina botulínica recombinante (rBoNT/A1)

La rBoNT/A1 monocatenaria se purificó por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) usando cromatografía de interacción hidrófoba de butilsefarosa de alto rendimiento (HP HIC de butilo) para la captura, seguida de una etapa de purificación intermedia con cromatografía de intercambio aniónico de sefarosa de amonio cuaternario de alto rendimiento (Q HP AEC). Esta molécula se incubó luego con 0,4 µg/mL de Lys-C a 37 °C durante 2 h para producir la doble cadena activa.

La Lys-C se resolvió a partir de la rBoNT/A1 activada usando cromatografía de interacción hidrófoba de fenilsefarosa de alto rendimiento (PhHP HIC). Esto implicó ajustar la mezcla de reacción con un tampón Tris con alto contenido de sal antes de cargarla en la columna PhHP, seguido de un lavado con alto contenido de sal y posterior elución de proteínas con un gradiente lineal a un tampón Tris bajo en sal. Las fracciones de elución se analizaron mediante electroforesis en gel desnaturalizante (SDS PAGE, Figura 11 arriba) y un ensayo colorimétrico de actividad de Lys-C (Figura 11 abajo). Se demostró que Lys-C se eluía temprano en el gradiente (F16-F21, resaltado en el cuadro negro) antes de la molécula de BoNT activada (F21-F29). Por lo tanto, esto muestra una buena separación de la Lys-C de la rBoNT/A1. La intensidad máxima de las fracciones parece ser similar a 30 ng/ml de Lys-C, lo que sugiere que cualquier Lys-C residual presente en las fracciones de rBoNT/A1 sería menor que esta concentración.

EJEMPLO 7 Activación y purificación final de la neurotoxina botulínica negativa de endopeptidasa recombinante subserotipo A2 (rBoNT/A2(0))

La rBoNT/A2(0) monocatenaria se purificó mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) usando cromatografía de interacción hidrófoba de butilsefarosa de alto rendimiento (HP HIC de butilo) para la captura, seguida de una etapa de purificación intermedia con cromatografía de intercambio aniónico de sefarosa de amonio cuaternario de alto rendimiento (Q HP AEC). Esta molécula se incubó luego con 4 µg/mL de Lys-C a 37 °C durante 2 h para producir la doble cadena activa.

La Lys-C se resolvió a partir de rBoNT/A2(0) activada usando cromatografía de interacción hidrófoba de fenilsefarosa de alto rendimiento (PhHP HIC). Esto implicó ajustar la mezcla de reacción con un tampón Tris con alto contenido de sal antes de cargarla en la columna de HP de fenilo, seguido de un lavado con alto contenido de sal y posterior elución de proteínas con un gradiente lineal a un tampón Tris con bajo contenido de sal. Las fracciones de elución se analizaron mediante electroforesis en gel desnaturalizante (SDS PAGE) y un ensayo colorimétrico de actividad de Lys-C (Figura 12), esto mostró que la Lys-C se eluyó temprano en el gradiente (F5-F11) justo antes de la molécula de BoNT activada (F12- F15). Por lo tanto, esta columna muestra una buena separación de la Lys-C de la rBoNT/A2(0).

EJEMPLO 8 Activación y purificación final del subserotipo A5 de neurotoxina botulínica recombinante negativa para endopeptidasa (rBoNT/A5(0))

La rBoNT/A5(0) monocatenaria se purificó por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) usando cromatografía de interacción hidrófoba de butilsefarosa de alto rendimiento (HP HIC de butilo) para la captura, seguida de una etapa de purificación intermedia con cromatografía de intercambio aniónico de sefarosa de amonio cuaternario de alto rendimiento (Q HP AEC). Esta molécula se incubó luego con 2,5 µg/mL de Lys-C a 37 °C durante 2 h para producir la doble cadena activa. La Lys-C se resolvió a partir de rBoNT/A5(0) activada usando cromatografía de interacción hidrófoba de fenilsefarosa de alto rendimiento (HP HIC de fenilo). Esto implicó ajustar la mezcla de reacción con un tampón Tris con alto contenido de sal antes de cargarla en la columna de HP de fenilo, seguido de un lavado con alto contenido de sal y posterior elución de proteínas con un gradiente lineal a un tampón Tris con bajo contenido de sal. Las fracciones de elución se analizaron mediante electroforesis en gel desnaturalizante (SDS PAGE) y un ensayo colorimétrico de actividad de Lys-C (Figura 13) que mostró que Lys-C se eluyó temprano en el gradiente (F10-F39) antes de la molécula de BoNT activada (F51-F65) Por lo tanto, esta columna muestra una buena separación de Lys-C de rBoNT/A5(0).

EJEMPLO 9 Activación y purificación final del subserotipo A6 de neurotoxina botulínica recombinante negativa para endopeptidasa (rBoNT/A6(0))

La rBoNT/A6(0) monocatenaria se purificó primero mediante precipitación con sulfato de sodio y resolubilización en acetato de sodio antes de la captura con cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) usando cromatografía de intercambio catiónico de sulfopropilsefarosa de alto rendimiento (SP HP CEC) seguido de intercambio de tampón en tampón Tris a pH 8. Esta molécula se incubó luego con 0,3 µg/ml de Lys-C a 37 °C durante 2 h para producir la doble cadena activa. La Lys-C se resolvió a partir de rBoNT/A6(0) activada usando cromatografía de interacción hidrófoba de fenilsefarosa de alto rendimiento (HP HIC de fenilo). Esto implicó ajustar la mezcla de reacción con un tampón Tris con alto contenido de sal antes de cargarla en la columna de HP de fenilo, seguido de un lavado con alto contenido de sal y posterior elución de proteínas con un gradiente lineal a un tampón Tris con bajo contenido de sal. Las fracciones de elución se analizaron mediante electroforesis en gel desnaturalizante (SDS PAGE) y un ensayo colorimétrico de actividad de Lys-C (Figura 14) que mostró que Lys-C se eluyó temprano en el gradiente (F6-F13) antes de la molécula BoNT activada (F16-F27) Esto muestra una excelente separación de la Lys-C de la rBoNT/A6(0).

EJEMPLO 10 - Purificación de un derivado del subserotipo A1 de neurotoxina botulínica recombinante, catiónica, monocatenaria (mrBoNT/A1)

La mrBoNT/A1 monocatenaria (SEQ ID NO: 15) se purificó por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) usando cromatografía de intercambio catiónico de sulfopropilsefariosa de alto rendimiento (SPHP CEX) para captura. Se empleó una etapa de purificación intermedia usando cromatografía de interacción hidrófoba de butilsefariosa de alto rendimiento (BuHP HIC) para eliminar adicionalmente las proteínas de la célula huésped. Las fracciones de elución de BuHP se analizaron mediante SDS-PAGE y las que contenían mrBoNT/A1 monocatenaria se agruparon como mrBoNT/A1 monocatenaria purificada.

EJEMPLO 11 Activación y purificación final de un derivado del subserotipo A1 de neurotoxina botulínica recombinante, catiónica (mrBoNT/A1)

Se incubó mrBoNT/A1 monocatenaria (SEQ ID NO: 15) con 0,4 µg/mL de Lys-C a 37 °C durante 2 h para producir la doble cadena activa. Lys-C se resolvió a partir de mrBoNT/A1 activada usando cromatografía de interacción hidrófoba de butilsefariosa de alto rendimiento (BuHP HIC). Esto implicó ajustar la mezcla de reacción con un tampón Bis-Tris con alto contenido de sal antes de cargarla en la columna BuHP, seguido de un lavado con alto contenido de sal y posterior elución de proteínas con un gradiente lineal a un tampón Bis-Tris con bajo contenido de sal. Las fracciones de elución se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 15 arriba) y un ensayo colorimétrico de actividad de Lys-C (Figura 15 abajo). Lys-C eluyó en el flujo de la columna y temprano en el gradiente de elución (F1-6, resaltado en el cuadro negro, Figura 15 abajo) antes de la molécula BoNT activada (F10-F12). Por lo tanto, esto muestra una buena separación de Lys-C de mrBoNT/A1.

Ejemplo 12 Formulación que comprende BoNT/A bicatenaria activa sustancialmente libre de Lys-C

Se preparan las siguientes seis composiciones líquidas que comprenden BoNT/A bicatenaria activa (Tabla 6).

Tabla 6: Formulaciones de BoNT/A de ejemplo

	1	2	3	4	5	6
Polysorbato 80	0,10 mg/mL	0,10 mg/mL	0,10 mg/mL	0,10 mg/mL	-	-
Poloxámero	-	-	-	-	0,04 mg/mL	0,04 mg/mL
Sacarosa	4,0 mg/mL	-	4,0 mg/mL	-	4,0 mg/mL	-
Manitol	-	4,0 mg/mL	-	4,0 mg/mL	-	4,0 mg/mL
Cloruro de sodio	8,76 mg/mL	8,76 mg/mL	8,76 mg/mL	8,76 mg/mL	8,76 mg/mL	8,76 mg/mL
pH	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Tampón	L-Histidina / ácido clorhídrico	L-Histidina / ácido clorhídrico	Fosfato disódico / ácido cítrico anhidro	Fosfato disódico / ácido cítrico anhidro	L-Histidina / ácido clorhídrico	L-Histidina / ácido clorhídrico
BoNT/A bicatenaria	20 ng/mL	20 ng/mL	20 ng/mL	20 ng/mL	20 ng/mL	20 ng/mL
Agua MilliQ	c. s. para 1 mL	c. s. para 1 mL	c. s. para 1 mL	c. s. para 1 mL	c. s. para 1 mL	c. s. para 1 mL

Las seis composiciones se almacenan a 25 °C durante 12 semanas. La estabilidad de la función de proteasa de BoNT/A bicatenaria se evalúa durante ese período usando un ensayo de endopeptidasa libre de células.

Ejemplo 13 Ensayo de actividad de Lys-C de alta sensibilidad

La determinación cuantitativa de la concentración final de Lys-C en muestras purificadas de BoNT/A se realizó midiendo la escisión de un sustrato de péptido fluorescente. El sustrato fluorescente (sal de trifluoroacetato Tos-GPK-7-amino-4, también llamado Tos-GPK-AMC) se reconstituyó en DMSO para dar una solución madre de 20 mg/ml (32,7 mM). Esto se diluyó adicionalmente a 10 mM con agua y alícuotas preparadas y almacenadas a -20 °C. El día del ensayo, se tomó una cantidad apropiada de sustrato y se diluyó adicionalmente con Tris 25 mM pH 8, NaCl 125 mM para dar una solución de trabajo de Lys-C 0,5 mM; luego se prepararon patrones de Lys-C (concentraciones conocidas) diluyendo la solución de trabajo en tampón de ensayo (Tris 25 mM, NaCl 125 mM, BSA 0,1 mg/ml, pH 8). Los estándares, los blancos (solo tampón de ensayo) y las muestras de prueba (lotes de rBoNT/A

5 purificada) se dispensaron en placas negras OptiPlate, por triplicado (180 μ L por pocillo) y se equilibraron a 37 °C durante 10-15 minutos. A continuación, se añadieron 20 μ L de sustrato y la placa se transfirió inmediatamente a un lector de placas donde se realizó una lectura cinética. La placa se leyó usando filtros de excitación/emisión 360/40 y 485/20, a 37 °C, cada 20 minutos durante 5 horas. Los datos se trazaron como tiempo en minutos (eje x) frente a absorbancia/fluorescencia (eje y). Los valores de pendiente para cada concentración de Lys-C se usaron para generar una curva estándar para la concentración de Lys-C. Las muestras de rBoNT/A purificadas se trataron de la misma manera y la concentración de Lys-C en cada muestra de rBoNT/A se interpoló a partir de la curva estándar. Con base en el análisis de cuatro lotes independientes o rBoNT/A, se midió la concentración promedio de Lys-C en el material final en $7,3 \pm 1,5$ pg de Lys-C por 100 ng de BoNT/A.

10 SEQ ID NO:1

Met	Pro	Phe	Val	Asn	Lys	Gln	Phe	Asn	Tyr	Lys	Asp	Pro	Val	Asn	Gly
1				5					10					15	
Val	Asp	Ile	Ala	Tyr	Ile	Lys	Ile	Pro	Asn	Ala	Gly	Gln	Met	Gln	Pro
			20					25					30		
Val	Lys	Ala	Phe	Lys	Ile	His	Asn	Lys	Ile	Trp	Val	Ile	Pro	Glu	Arg
		35					40					45			
Asp	Thr	Phe	Thr	Asn	Pro	Glu	Glu	Gly	Asp	Leu	Asn	Pro	Pro	Pro	Glu
	50					55					60				
Ala	Lys	Gln	Val	Pro	Val	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ser	Thr
65					70					75					80
Asp	Asn	Glu	Lys	Asp	Asn	Tyr	Leu	Lys	Gly	Val	Thr	Lys	Leu	Phe	Glu
			85						90					95	
Arg	Ile	Tyr	Ser	Thr	Asp	Leu	Gly	Arg	Met	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Val
			100					105					110		
Arg	Gly	Ile	Pro	Phe	Trp	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Asp	Thr	Glu	Leu	Lys
		115					120					125			
Val	Ile	Asp	Thr	Asn	Cys	Ile	Asn	Val	Ile	Gln	Pro	Asp	Gly	Ser	Tyr
	130					135					140				
Arg	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Leu	Val	Ile	Ile	Gly	Pro	Ser	Ala	Asp	Ile
145					150					155					160
Ile	Gln	Phe	Glu	Cys	Lys	Ser	Phe	Gly	His	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Thr
			165						170					175	
Arg	Asn	Gly	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln	Tyr	Ile	Arg	Phe	Ser	Pro	Asp	Phe
		180						185					190		
Thr	Phe	Gly	Phe	Glu	Glu	Ser	Leu	Glu	Val	Asp	Thr	Asn	Pro	Leu	Leu
		195					200					205			
Gly	Ala	Gly	Lys	Phe	Ala	Thr	Asp	Pro	Ala	Val	Thr	Leu	Ala	His	Glu
	210					215					220				
Leu	Ile	His	Ala	Gly	His	Arg	Leu	Tyr	Gly	Ile	Ala	Ile	Asn	Pro	Asn
225					230					235					240
Arg	Val	Phe	Lys	Val	Asn	Thr	Asn	Ala	Tyr	Tyr	Glu	Met	Ser	Gly	Leu
			245						250					255	
Glu	Val	Ser	Phe	Glu	Glu	Leu	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	His	Asp	Ala	Lys
		260						265					270		
Phe	Ile	Asp	Ser	Leu	Gln	Glu	Asn	Glu	Phe	Arg	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Asn
	275						280					285			
Lys	Phe	Lys	Asp	Ile	Ala	Ser	Thr	Leu	Asn	Lys	Ala	Lys	Ser	Ile	Val
	290					295					300				
Gly	Thr	Thr	Ala	Ser	Leu	Gln	Tyr	Met	Lys	Asn	Val	Phe	Lys	Glu	Lys
305					310					315					320
Tyr	Leu	Leu	Ser	Glu	Asp	Thr	Ser	Gly	Lys	Phe	Ser	Val	Asp	Lys	Leu
			325						330					335	
Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Lys	Met	Leu	Thr	Glu	Ile	Tyr	Thr	Glu	Asp
		340						345					350		
Asn	Phe	Val	Lys	Phe	Phe	Lys	Val	Leu	Asn	Arg	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn
		355					360					365			
Phe	Asp	Lys	Ala	Val	Phe	Lys	Ile	Asn	Ile	Val	Pro	Lys	Val	Asn	Tyr
	370					375					380				
Thr	Ile	Tyr	Asp	Gly	Phe	Asn	Leu	Arg	Asn	Thr	Asn	Leu	Ala	Ala	Asn
385					390					395					400
Phe	Asn	Gly	Gln	Asn	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Met	Asn	Phe	Thr	Lys	Leu
			405						410					415	
Lys	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Phe	Glu	Phe	Tyr	Lys	Leu	Leu	Cys	Val	Arg
		420						425					430		
Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys	Ser	Leu	Asp	Lys	Gly	Tyr	Asn	Lys
	435						440					445			
Ala	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys	Ile	Lys	Val	Asn	Asn	Trp	Asp	Leu	Phe	Phe
	450					455					460				

```

Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
465                               470                               475                               480
Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
                               485                               490                               495
Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
                               500                               505                               510
Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
515                               520                               525
Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
530                               535                               540
Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
545                               550                               555                               560
His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu
                               565                               570                               575
Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
580                               585                               590
Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
595                               600                               605
Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
610                               615                               620
Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
625                               630                               635                               640
Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
645                               650                               655
Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
660                               665                               670
Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
675                               680                               685
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
690                               695                               700
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
705                               710                               715                               720
Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
725                               730                               735
Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
740                               745                               750
Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
755                               760                               765
Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
770                               775                               780
Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
785                               790                               795                               800
Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
805                               810                               815
Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
820                               825                               830
Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
835                               840                               845
Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
850                               855                               860
Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
865                               870                               875                               880
Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
885                               890                               895
Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn
900                               905                               910
Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu
915                               920                               925
Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser
930                               935                               940

```

```

Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn
945          950          955          960
Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
          965          970          975
Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu
          980          985          990
Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser
          995          1000          1005
Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg
1010          1015          1020
Leu Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln
1025          1030          1035
Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile
1040          1045          1050
Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp
1055          1060          1065
Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu
1070          1075          1080
Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys
1085          1090          1095
Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met
1100          1105          1110
Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val
1115          1120          1125
Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val
1130          1135          1140
Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr
1145          1150          1155
Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile
1160          1165          1170
Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn
1175          1180          1185
Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu
1190          1195          1200
Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser
1205          1210          1215
Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn
1220          1225          1230
Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly
1235          1240          1245
Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala
1250          1255          1260
Ser Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu
1265          1270          1275
Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu
1280          1285          1290
Arg Pro Leu
1295

```

SEQ ID NO: 2

```

Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly
1          5          10          15
Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys
          20          25

```

SEQ ID NO: 3

Cys	Val	Arg	Gly	Ile	Ile	Pro	Phe	Lys	Thr	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Gly
1				5					10					15	
Tyr	Asn	Lys	Ala	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys							
			20					25							

SEQ ID NO: 4

Cys	Val	Arg	Gly	Ile	Ile	Pro	Phe	Lys	Thr	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Gly
1				5					10					15	
Tyr	Asn	Lys	Ala	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys							
			20					25							

SEQ ID NO: 5

Cys	Val	Arg	Gly	Ile	Ile	Pro	Phe	Lys	Thr	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Gly
1				5					10					15	
Tyr	Asn	Lys	Ala	Leu	Asn	Tyr	Leu	Cys							
			20					25							

SEQ ID NO: 6

Cys	Val	Arg	Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Gly
1				5					10					15	
Tyr	Asn	Lys	Ala	Leu	Asn	Glu	Leu	Cys							
			20					25							

SEQ ID NO: 7

Cys	Val	Arg	Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Gly
1				5					10					15	
Tyr	Asn	Lys	Ala	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys							
			20					25							

SEQ ID NO: 8

Val	Gln	Gly	Gln	Ser	Val	Lys	Gly	Val	Gly	Lys	Thr	Ser	Leu	Asp	Gly
1				5					10					15	
Leu	Val	Asn	Ile	Asp	Val	Thr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Leu	Lys
			20					25						30	
Asp	Ser	Asn	Lys	Asn	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Leu	Lys	Asn	Gln	Val	Asp
			35				40					45			
Glu	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Ser	Arg	Pro	Asn	Tyr	Lys	Gln	Ile
	50					55					60				
Leu	Met	Ser	Lys	Ser	Glu	Leu	Ile	Ser	Asn	Tyr	Asn	Asn	Asn	Phe	Ile
65					70					75					80
Ala	Asn	Asn	Gln	Val	Asn	Ser	Val	Asp	Ala	Tyr	Val	Asn	Thr	Asn	Lys
			85						90					95	
Thr	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Lys	Leu	Asn	Arg	Asn	Ser	Ile	Asp	Asn
			100					105					110		

```

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

```

SEQ ID NO: 9

```

Met Lys Ser Lys Lys Leu Leu Ala Thr Val Leu Ser Ala Val Ile Thr
1    5                10                15
Phe Ser Thr Val Ser Ala Val Tyr Ala Ala Pro Val Gly Lys Glu Ser
    20                25                30
Lys Val Glu Pro Lys Thr Thr Thr Ile Thr Trp Glu Lys Asn Glu Gln
    35                40                45
Asn Thr Lys Lys Ala Ala Thr Asp Ile Thr Glu Lys Lys Phe Asn Asn
    50                55                60
Ser Glu Glu Ile Thr Lys Phe Phe Glu Lys Asn Ile Ser Lys Phe Gly
65    70                75                80
Val Gln Lys Gly Ser Leu Lys Asn Thr Lys Thr Val Lys Asp Glu Lys
    85                90                95
Gly Lys Thr Asn Tyr His Met Ile Tyr Glu Val Glu Gly Ile Pro Val
    100                105                110
Tyr Tyr Gly Arg Ile Val Phe Thr Thr Glu Lys Asp Ser Ser Met Asp
    115                120                125
Ser Ile Asn Gly Arg Ile Asp Thr Val Phe Glu Asn Gly Asn Trp Lys
    130                135                140
Asn Lys Ile Lys Leu Ser Lys Glu Asp Ala Ile Ala Lys Ala Lys Asn
145    150                155                160
Asp Ile Lys Asp Glu Lys Ala Thr Ser Lys Lys Thr Asp Leu Tyr Leu
    165                170                175
Tyr Asn Phe Glu Gly Lys Pro Tyr Val Val Tyr Leu Val Asp Leu Ile
    180                185                190
Thr Asp Asn Gly Ser Trp Thr Val Phe Val Asn Ala Glu Asp Gly Ser
    195                200                205

```

Ile Val Asn Lys Phe Asn Asn Thr Pro Thr Leu Ile Asp Thr Lys Asp
 210 215 220
 Gln Lys Leu Pro Asn Ala Lys Lys Ile Lys Asp Glu Ala Lys Lys Ala
 225 230 235 240
 Ser Asn Ala Asn Asn Val Ile Asp Val Gln Gly Gln Ser Val Lys Gly
 245 250 255
 Val Gly Lys Thr Ser Leu Asp Gly Leu Val Asn Ile Asp Val Thr Tyr
 260 265 270
 Gly Asn Gly Lys Tyr Tyr Leu Lys Asp Ser Asn Lys Asn Ile Tyr Leu
 275 280 285
 Tyr Asp Leu Lys Asn Gln Val Asp Glu Tyr Asp Leu Tyr Asn Tyr Leu
 290 295 300
 Ser Arg Pro Asn Tyr Lys Gln Ile Leu Met Ser Lys Ser Glu Leu Ile
 305 310 315 320
 Ser Asn Tyr Asn Asn Asn Phe Ile Ala Asn Asn Gln Val Asn Ser Val
 325 330 335
 Asp Ala Tyr Val Asn Thr Asn Lys Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Asn Lys
 340 345 350
 Leu Asn Arg Asn Ser Ile Asp Asn Lys Gly Met Asn Ile Asn Gly Phe
 355 360 365
 Val His Val Gly Arg Asn Tyr Gly Asn Ala Phe Trp Tyr Gly Pro Tyr
 370 375 380
 Asp Gly Met Phe Phe Gly Asp Gly Asp Gly Ile Tyr Phe Ser Ser Leu
 385 390 395 400
 Ala Lys Ser Leu Asp Val Val Gly His Glu Leu Ser His Gly Val Thr
 405 410 415
 Asn Lys Glu Ser Asn Leu Lys Tyr Glu Asn Glu Ser Gly Ala Leu Asn
 420 425 430
 Glu Ser Phe Ser Asp Ile Met Gly Val Ala Val Glu Gly Lys Asn Phe
 435 440 445
 Val Leu Gly Glu Asp Cys Trp Val Ala Gly Gly Val Met Arg Asp Met
 450 455 460
 Glu Asn Pro Ser Arg Gly Gly Gln Pro Ala His Met Lys Asp Tyr Lys
 465 470 475 480
 Tyr Lys Thr Met Asn Asp Asp Asn Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly
 485 490 495
 Ile Ile Asn His Ala Ala Tyr Leu Val Ala Asp Gly Ile Glu Lys Thr
 500 505 510
 Gly Ala Lys Asn Ser Lys Asp Ile Met Gly Lys Ile Phe Tyr Thr Ala
 515 520 525
 Asn Cys Tyr Lys Trp Asp Glu Thr Thr Asn Phe Ala Lys Cys Arg Asn
 530 535 540
 Asp Val Val Gln Val Thr Lys Glu Leu Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Tyr
 545 550 555 560
 Val Lys Ile Val Glu Lys Ala Phe Asp Gln Val Gly Ile Thr Ala Thr
 565 570 575
 Pro Gln Leu Pro Leu
 580

SEQ ID NO: 10

atggttcaag gtcaaagcgt taaaggagta ggaaaaacta gottggatgg actagtaaat 60
 attgatgtaa cttatggaaa tggaaaatac tattttaaag atagcaacaa aaatatttat 120
 ctatatgact taaaaaatca agttgatgaa tatgatctat acaattatct tagtagacct 180
 aactataaac aaatattaat gagcaaatct gaattaatat ctaattacaa taataatttt 240
 atagccaaca atcagggttaa ttctgtagat gcttatgtaa acacaaataa aacctatgat 300
 tattataaaa acaaattaaa tagaaacagt attgataata agggatatgaa tattaatggg 360
 tttgttcacg taggtagaaa ttatggtaat gctttttggt acggtccata tgatgggatg 420
 ttctttggcg atggcgacgg aatatacttc tcttccottg caaaatcttt agatgttgta 480

```

ggccacgaat taagtcatgg tgtaacaaat aaagagtcta atcttaaata tgaaaatgaa 540
tctggtgccc taaatgaatc tttctcagat attatgggag tagctgttga gggtaaaaac 600
tttgtagtag gtgaagattg ctgggttgct ggaggagtaa tgagagatat ggaaaatcca 660
tcagaggagg gccaacccag ccatatgaaa gattataaat acaaaaactat gaatgacgat 720
aacgggtggtg ttcatatacaa ttccaggtata ataaaccatg ctgcttattt agttgcagat 780
ggaatagaaa aaactggtgc aaaaaatagt aaagatatata tgggaaaaat attctataca 840
gctaattgct ataaatggga tgaacaaca aattttgcta agtgcagaaa tgatgtagtc 900
caagttacta aagaacttta tggcgaaaat agcaactatg taaaaattgt tgaaaaagct 960
tttgaccaag ttggaataac tgctacacct caattaccat tataa 1005

```

SEQ ID NO: 11

```

atgaaaagta aaaaattatt agctacagtg ctaagtgcog tgatcacttt ttctactgtt 60
tctgcagttt atgtcgcgcc tgtaggaaaa gaaagtaaag ttgaaccaa aactacaaca 120
ataacttggg aaaaaaatga acaaaatact aaaaaagctg ctactgatat aactgaaaag 180
aaatttaaca attctgagga gataactaaa ttctttgaaa aaaatatatc taaatttggg 240
gtacaaaaag gttctcttaa aaacaccaag actgtaaaag acgaaaaagg taaaactaac 300
tatcatatga tttatgaagt agaaggtata cctgtatact atggaagaat tgtttttaca 360
actgaaaaag actcctccat ggattctata aacggtagaa ttgatactgt ttttgaaaat 420
gggaattgga aaacaaaaat caaactatca aaagaagatg ctatagcaaa agctaaaaat 480
gatattaaag atgaaaaagc aactagtaaa aagaccgat tatatctgta taattttgag 540
ggcaaacctt atgtagttaa tttagtagat ctaattacag acaacgggag ttggacgggt 600
ttcgttaatg ctgaggatgg ttctatagta aataaattta ataatactcc tactttaatt 660
gatactaaag atcaaaaatt acccaatgct aaaaaaatta aagatgaagc taaaaaagct 720
agtaatgcaa ataattgta ttaggttcaa ggtcaaaagc ttaaaaggag aggaaaaact 780
agcttggatg gactagttaa tattgatgta acttatggaa atggaaaata ctatttaaaa 840
gatagcaaca aaaatattta tctatagac ttaaaaaatc aagttgatga atatgatcta 900
tacaattatc ttagtagacc taactataaa caaatattaa tgagcaaatc tgaattaata 960
tctaattaca ataataattt tatagccaac aatcagggtta attctgtaga tgcttatgta 1020
aacacaaaata aaacctatga ttattataaa aacaaattaa atagaaacag tattgataat 1080
aagggtatga atattaatgg gtttgttcat gtaggtagaa attatggtaa tgctttttgg 1140
tacgggtccat atgatgggat gttctttggc gatggcgacg gaataactt ctcttccctt 1200
gcaaaatctt tagatgttgt aggcacagaa ttaagtcatg gtgtaacaaa taaagagtct 1260
aatcttaaat atgaaaatga atctggtgcc ctaaatgaat cttctcaga tattatggga 1320
gtagctgttg agggtaaaaa ctttgtacta ggtgaagatt gctgggttgc tggaggagta 1380
atgagagata tggaaaatcc atccagagga ggccaaccag ctcatatgaa agattataaa 1440
tacaaaaacta tgaatgacga taacgggtgt gttcatataa attcaggtat aataaaccat 1500
gctgcttatt tagttgcaga tggaaataga aaaactggtg caaaaaatag taaagatatt 1560
atgggaaaaa tattctatac agctaattgc tataaatggg atgaaacaac aaattttgct 1620
aagtgcagaa atgatgtagt ccaagttact aaagaacttt atggcgaaaa tagcaactat 1680
gtaaaaattg ttgaaaaagc ttttgaccaa gttggaataa ctgctacacc tcaattacca 1740
ttataa 1746

```

SEQ ID NO: 12

Val Pro Pro Thr Pro Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5 10 15

SEQ ID NO: 13

Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly Tyr
1 5 10 15
Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys
20

SEQ ID NO: 14

Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly Tyr
1 5 10 15
Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys
20

SEQ ID NO: 15

```

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
1      5      10      15
Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
20      25      30
Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
35      40      45
Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
50      55      60
Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
65      70      75      80
Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu
85      90      95
Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
100     105     110
Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
115     120     125
Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
130     135     140
Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
145     150     155     160
Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
165     170     175
Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
180     185     190
Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
195     200     205
Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
210     215     220
Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
225     230     235     240
Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
245     250     255
Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
260     265     270
Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
275     280     285
Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
290     295     300
Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
305     310     315     320
Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
325     330     335
Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
340     345     350
Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
355     360     365
Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
370     375     380
Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
385     390     395     400
Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
405     410     415
Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg

```

				420						425					430				
Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys	Ser	Leu	Asp	Lys	Gly	Tyr	Asn	Lys				
		435					440					445							
Ala	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys	Ile	Lys	Val	Asn	Asn	Trp	Asp	Leu	Phe	Phe				
	450					455					460								
Ser	Pro	Ser	Glu	Asp	Asn	Phe	Thr	Asn	Asp	Leu	Asn	Lys	Gly	Glu	Glu				
465					470				475						480				
Ile	Thr	Ser	Asp	Thr	Asn	Ile	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Asn	Ile	Ser	Leu				
				485					490					495					
Asp	Leu	Ile	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asn	Phe	Asp	Asn	Glu	Pro				
			500					505					510						
Glu	Asn	Ile	Ser	Ile	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	Ile	Gly	Gln	Leu				
	515						520					525							
Glu	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Glu	Arg	Phe	Pro	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Glu				
	530					535					540								
Leu	Asp	Lys	Tyr	Thr	Met	Phe	His	Tyr	Leu	Arg	Ala	Gln	Glu	Phe	Glu				
545					550				555						560				
His	Gly	Lys	Ser	Arg	Ile	Ala	Leu	Thr	Asn	Ser	Val	Asn	Glu	Ala	Leu				
				565					570					575					
Leu	Asn	Pro	Ser	Arg	Val	Tyr	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser	Asp	Tyr	Val	Lys				
			580					585					590						
Lys	Val	Asn	Lys	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Met	Phe	Leu	Gly	Trp	Val	Glu				
	595						600					605							
Gln	Leu	Val	Tyr	Asp	Phe	Thr	Asp	Glu	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Thr	Thr				
	610					615					620								
Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Thr	Ile	Ile	Ile	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala				
625					630				635					640					
Leu	Asn	Ile	Gly	Asn	Met	Leu	Tyr	Lys	Asp	Asp	Phe	Val	Gly	Ala	Leu				
				645					650					655					
Ile	Phe	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Ile	Pro	Glu	Ile	Ala				
	660						665						670						
Ile	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Ala	Asn	Lys				
	675						680					685							
Val	Leu	Thr	Val	Gln	Thr	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu	Ser	Lys	Arg	Asn	Glu				
	690					695					700								
Lys	Trp	Asp	Glu	Val	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Val	Thr	Asn	Trp	Leu	Ala	Lys				
705																			

			900					905				910			
Gln	Ile	Gln	Leu	Phe	Asn	Leu	Glu	Ser	Ser	Lys	Ile	Glu	Val	Ile	Leu
		915					920					925			
Lys	Lys	Ala	Ile	Val	Tyr	Asn	Ser	Met	Tyr	Glu	Asn	Phe	Ser	Thr	Ser
	930					935					940				
Phe	Trp	Ile	Arg	Ile	Pro	Lys	Tyr	Phe	Asn	Lys	Ile	Ser	Leu	Asn	Asn
945					950					955					960
Glu	Tyr	Thr	Ile	Ile	Asn	Cys	Met	Glu	Asn	Asn	Ser	Gly	Trp	Lys	Val
			965					970						975	
Ser	Leu	Asn	Tyr	Gly	Glu	Ile	Ile	Trp	Thr	Leu	Gln	Asp	Thr	Lys	Glu
		980						985				990			
Ile	Lys	Gln	Arg	Val	Val	Phe	Lys	Tyr	Ser	Gln	Met	Ile	Asn	Ile	Ser
	995						1000					1005			
Asp	Tyr	Ile	Asn	Arg	Trp	Ile	Phe	Val	Thr	Ile	Thr	Asn	Asn	Arg	Leu
1010						1015					1020				
Asn	Lys	Ser	Lys	Ile	Tyr	Ile	Asn	Gly	Arg	Leu	Ile	Asp	Gln	Lys	Pro
1025					1030					1035					1040
Ile	Ser	Asn	Leu	Gly	Asn	Ile	His	Ala	Ser	Asn	Lys	Ile	Met	Phe	Lys
			1045					1050						1055	
Leu	Asp	Gly	Cys	Arg	Asp	Thr	His	Arg	Tyr	Ile	Trp	Ile	Lys	Tyr	Phe
		1060						1065				1070			
Asn	Leu	Phe	Asp	Lys	Glu	Leu	Asn	Glu	Lys	Glu	Ile	Lys	Asp	Leu	Tyr
	1075					1080					1085				
Asp	Asn	Gln	Ser	Asn	Ser	Gly	Ile	Leu	Lys	Asp	Phe	Trp	Gly	Asp	Tyr
1090						1095					1100				
Leu	Gln	Tyr	Asp	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Met	Leu	Asn	Leu	Tyr	Asp	Pro	Asn
1105					1110					1115					1120
Lys	Tyr	Val	Asp	Val	Asn	Asn	Val	Gly	Ile	Arg	Gly	Tyr	Met	Tyr	Leu
		1125						1130						1135	
Lys	Gly	Pro	Arg	Gly	Ser	Val	Met	Thr	Thr	Asn	Ile	Tyr	Leu	Asn	Ser
		1140						1145					1150		
Ser	Leu	Tyr	Arg	Gly	Thr	Lys	Phe	Ile	Ile	Lys	Lys	Tyr	Ala	Ser	Gly
	1155					1160						1165			
Asn	Lys	Asp	Asn	Ile	Val	Arg	Asn	Asn	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	Asn	Val
1170					1175						1180				
Val	Val	Lys	Asn	Lys	Glu	Tyr	Arg	Leu	Ala	Thr	Asn	Ala	Ser	Gln	Ala
1185					1190					1195					1200
Gly	Val	Glu	Lys	Ile	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	Ile	Pro	Asp	Val	Gly	Asn
		1205						1210						1215	
Leu	Ser	Gln	Val	Val	Val	Met	Lys	Ser	Lys	Asn	Asp	Lys	Gly	Ile	Thr
		1220						1225					1230		
Asn	Lys	Cys	Lys	Met	Asn	Leu	Gln	Asp	Asn	Asn	Gly	Asn	Asp	Ile	Gly
	1235					1240					1245				
Phe	Ile	Gly	Phe	His	Gln	Phe	Asn	Asn	Ile	Ala	Lys	Leu	Val	Ala	Ser
	1250				1255					1260					
Asn	Trp	Tyr	Asn	Arg	Gln	Ile	Glu	Arg	Ser	Ser	Arg	Thr	Leu	Gly	Cys
1265					1270					1275					1280
Ser	Trp	Glu	Phe	Ile	Pro	Val	Asp	Asp	Gly	Trp	Gly	Glu	Arg	Pro	Leu
			1285					1290						1295	

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir proteína BoNT/A bicatenaria soluble, que comprende:
 - a) proporcionar una proteína BoNT/A monocatenaria soluble;
 - b) poner en contacto dicha proteína BoNT/A con endoproteinasa Lys-C (Lys-C) en solución; y
- 5 c) separar la proteína BoNT/A soluble de la Lys-C poniendo en contacto la solución que contiene la proteína BoNT/A soluble y Lys-C con una superficie hidrófoba, en donde la proteína BoNT/A soluble se une con preferencia a la superficie hidrófoba.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde la proteína BoNT/A monocatenaria soluble se produce (i) en una célula huésped, mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica dicha proteína BoNT/A monocatenaria en un sistema de expresión; o (ii) en un sistema de expresión in vitro.
3. El método según la reivindicación 2, en donde la célula huésped es una célula huésped bacteriana y el sistema de expresión es un sistema de expresión bacteriano.
4. El método según la reivindicación 3, en donde el sistema de expresión bacteriano es un sistema de expresión de E. coli y la célula huésped es una célula de E. coli.
- 15 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde dicha proteína BoNT/A monocatenaria soluble se expresa en el citoplasma de dicha célula huésped.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde dicha proteína BoNT/A monocatenaria soluble se expresa a un nivel de al menos 5 mg/l.
- 20 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, que comprende la lisis de la célula huésped bacteriana o de E. coli para proporcionar un homogeneizado de la célula huésped bacteriana o de E. coli que contiene dicha proteína soluble BoNT/A monocatenaria.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la superficie hidrófoba es una matriz inerte a la que se une un ligando que consiste en grupos arilo o alquilo.
- 25 9. El método según la reivindicación 8, en donde el ligando se selecciona del grupo que consiste en: ligandos butilo, fenilo u octilo.
10. El método según la reivindicación 9, en donde se usa una superficie hidrófoba de alto rendimiento.
11. Un método para la producción de una composición farmacéutica o cosmética, que comprende las etapas de:
 - a) producir una proteína BoNT/A bicatenaria soluble de acuerdo con el método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;
- 30 b) formular la proteína BoNT/A bicatenaria como una composición farmacéutica o cosmética.
12. El método según la reivindicación 11, en donde dicha composición comprende menos del 5% de BoNT/A monocatenaria, preferiblemente menos del 2% de BoNT/A monocatenaria.
- 35 13. El método según la reivindicación 11 o 12, en donde dicha composición contiene endoproteinasa Lys-C (Lys-C) en una concentración de menos de 400 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 300 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 200 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 100 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 50 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 20 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 15 pg de Lys-C por 100 ng de proteína BoNT/A, o menos de 10 pg de Lys-C por 100 ng de la proteína BoNT/A.
- 40 14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde dicha composición es una composición líquida o sólida.
15. El método según la reivindicación 14, en donde dicha composición comprende un agente estabilizante, siendo dicho agente preferiblemente un agente estabilizante no proteico.

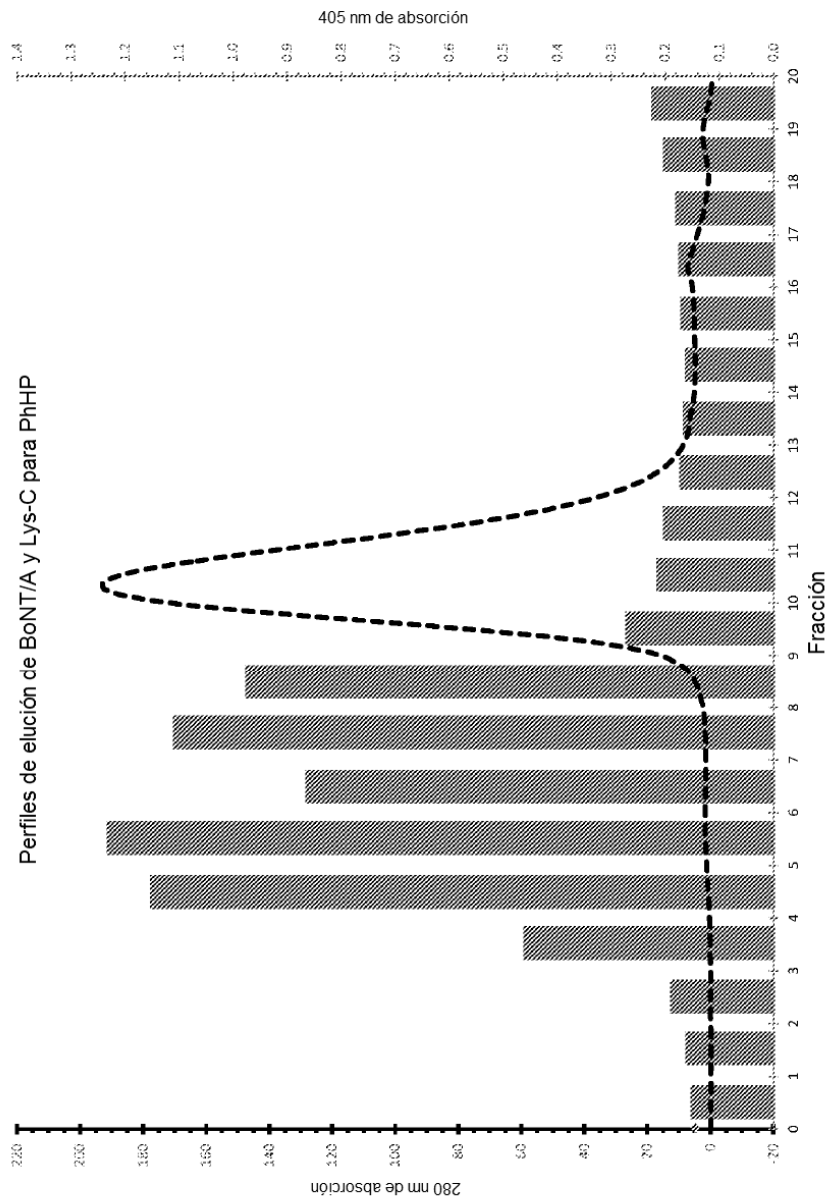
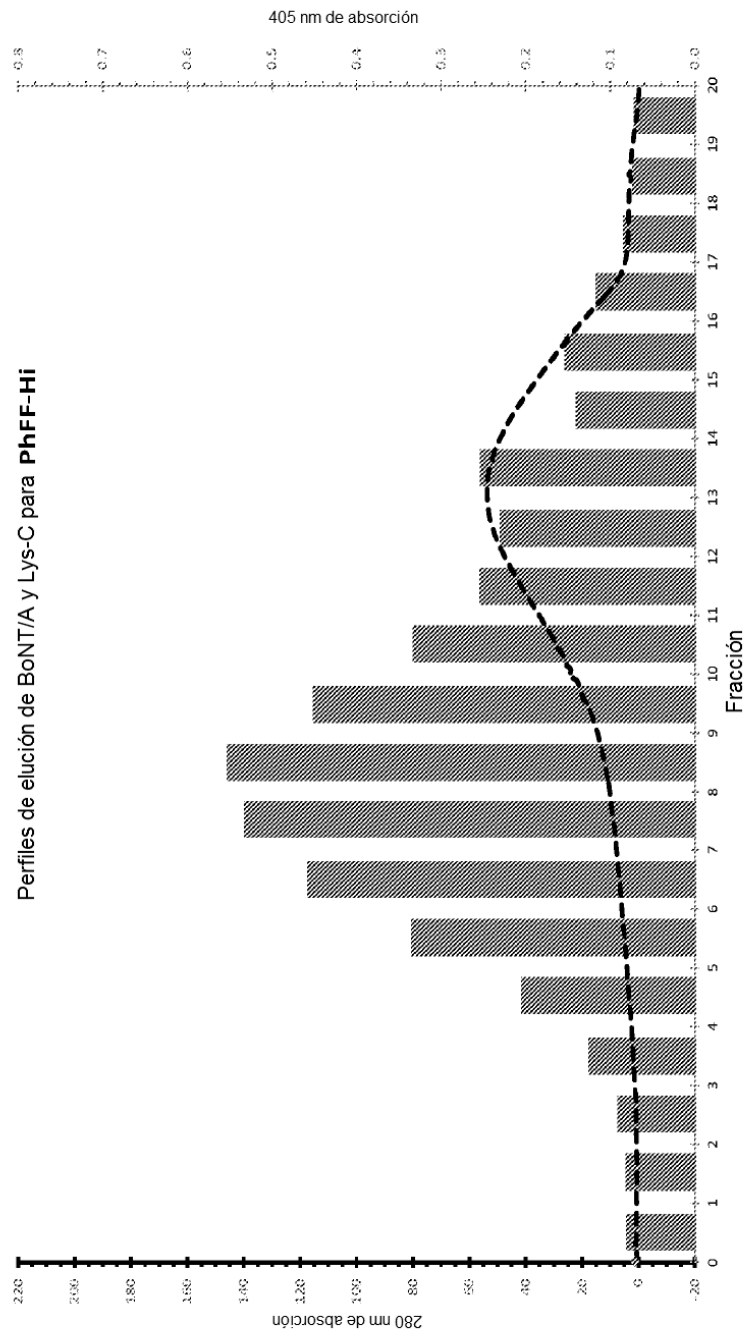


Figura 1

Figura 2



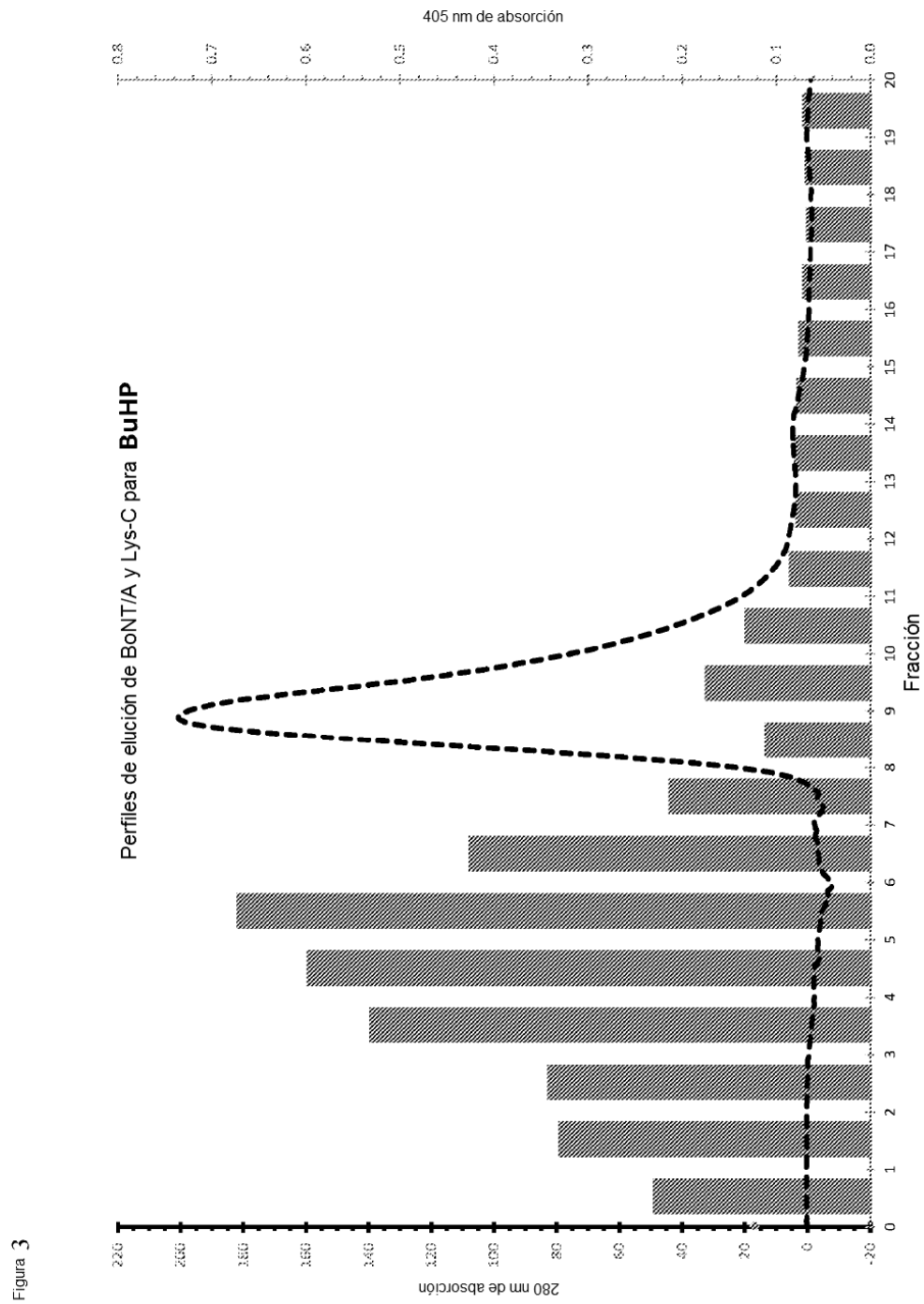
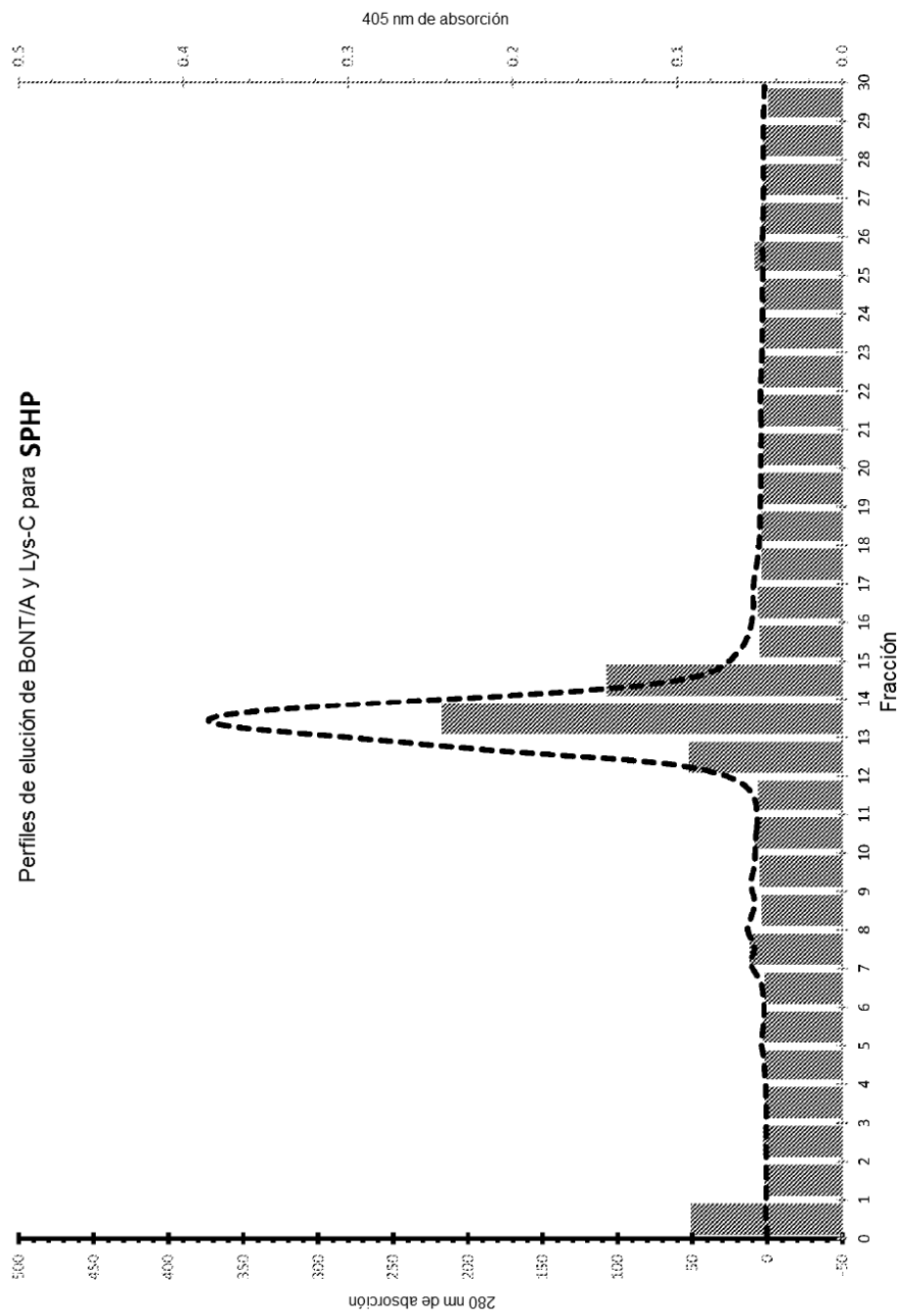
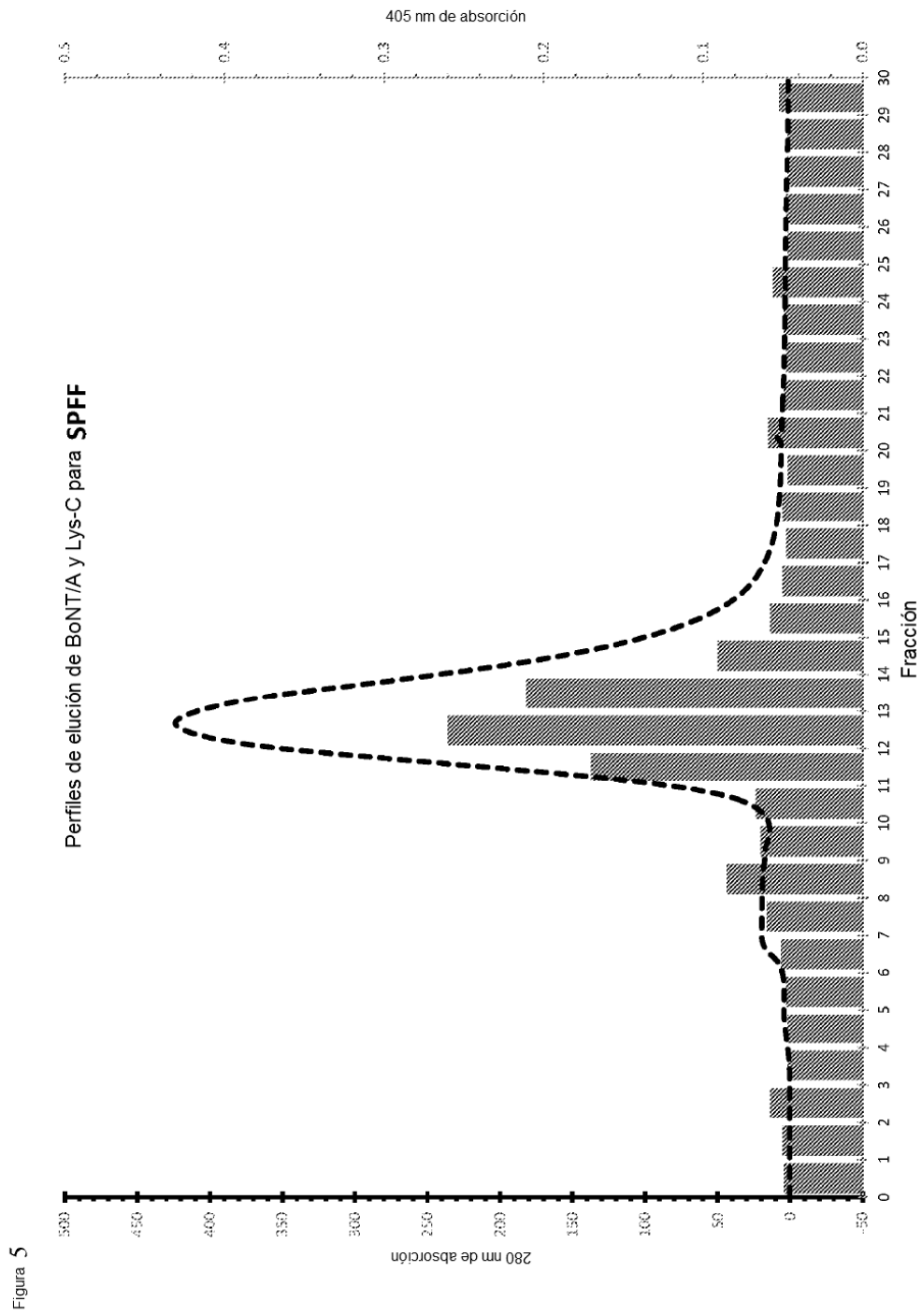
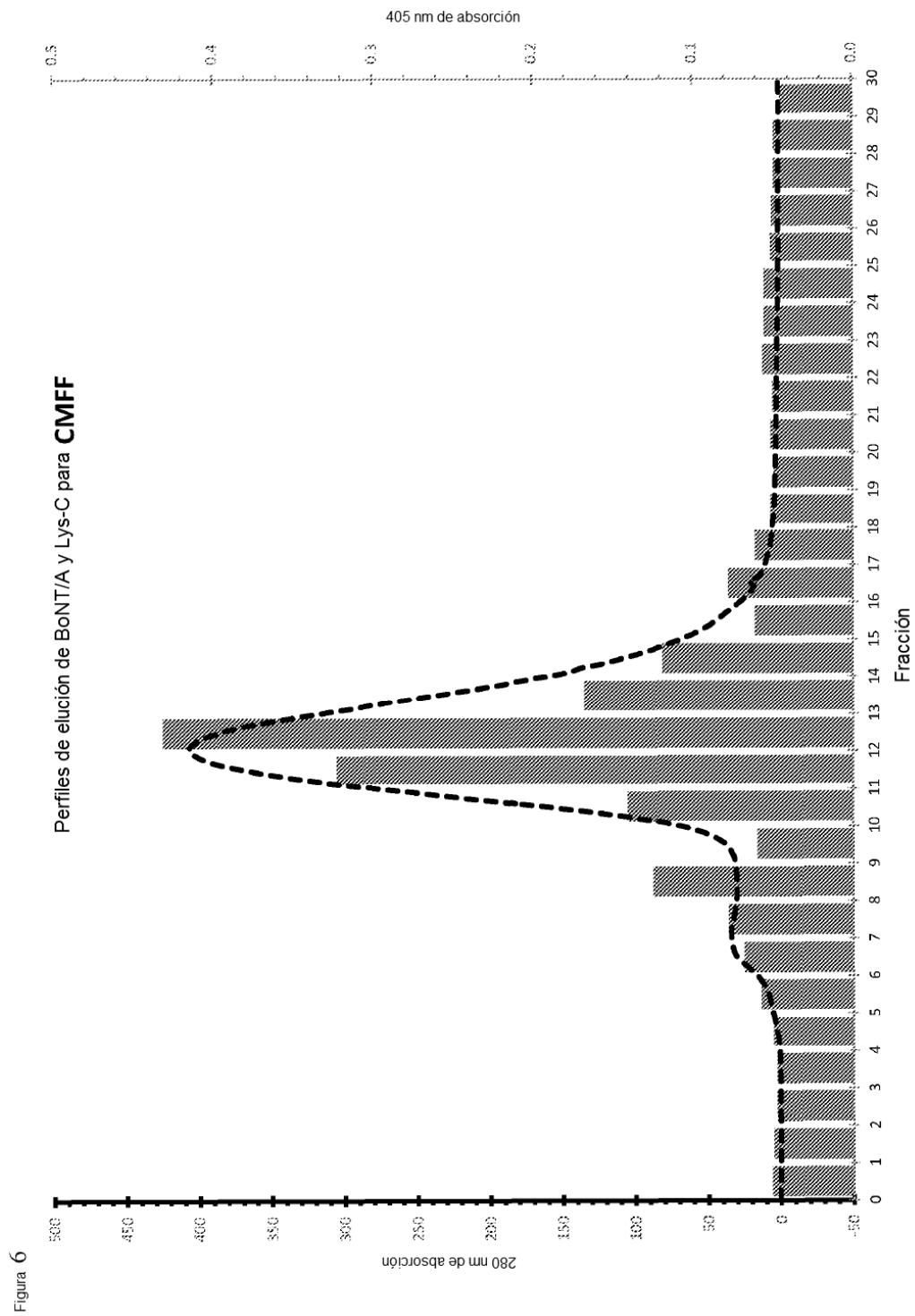


Figura 3

Figura 4







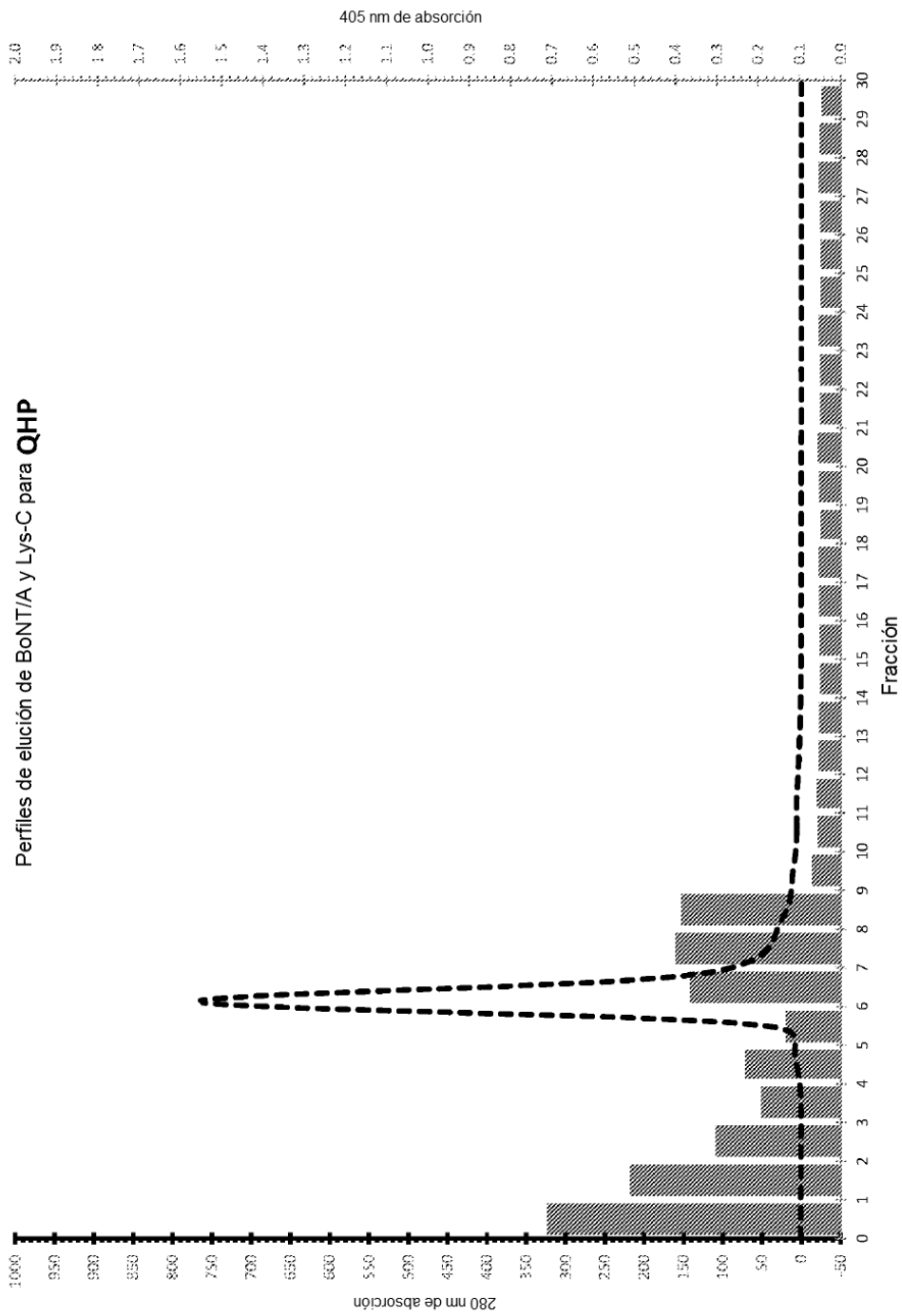
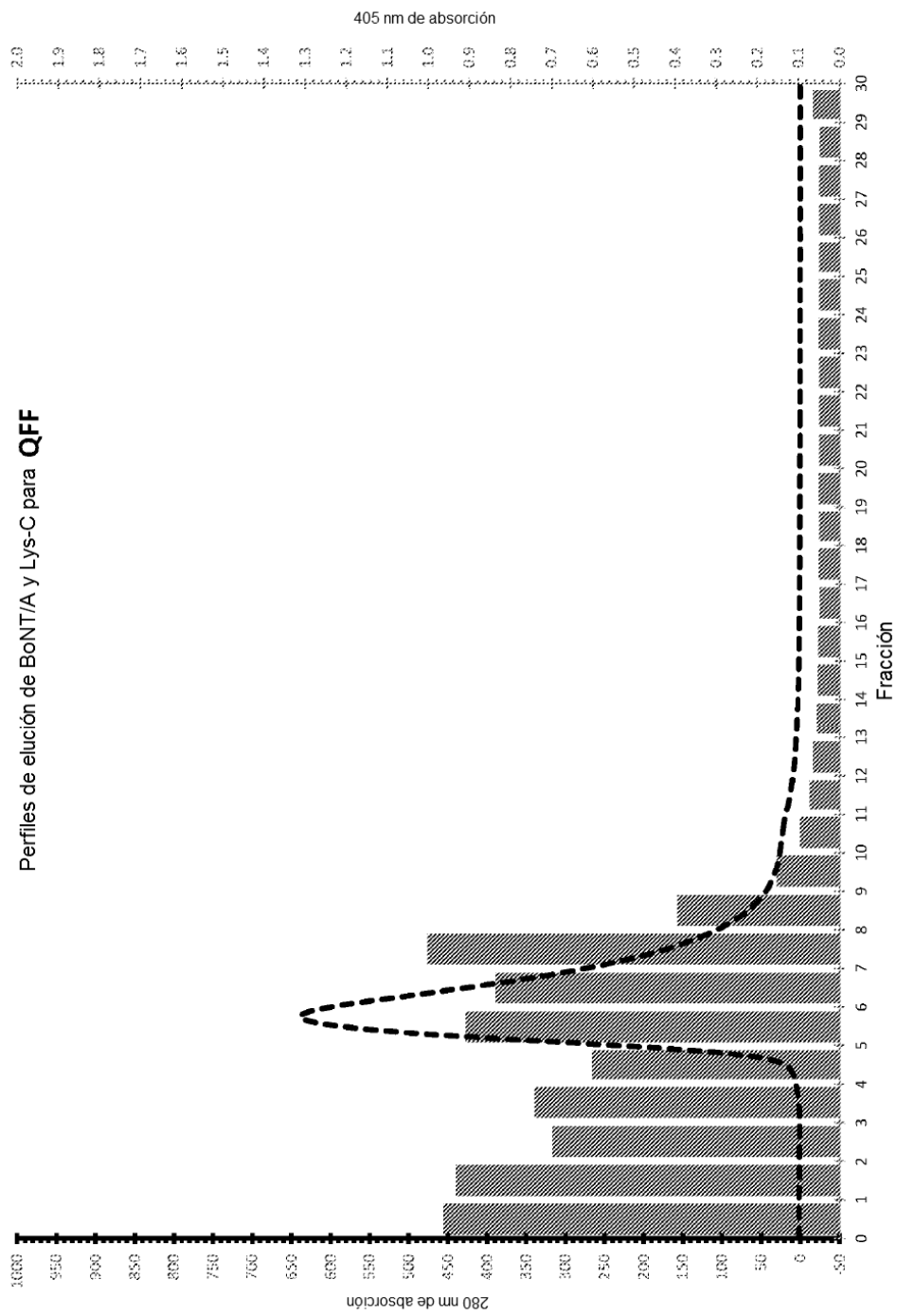


Figura 7

Figura 8



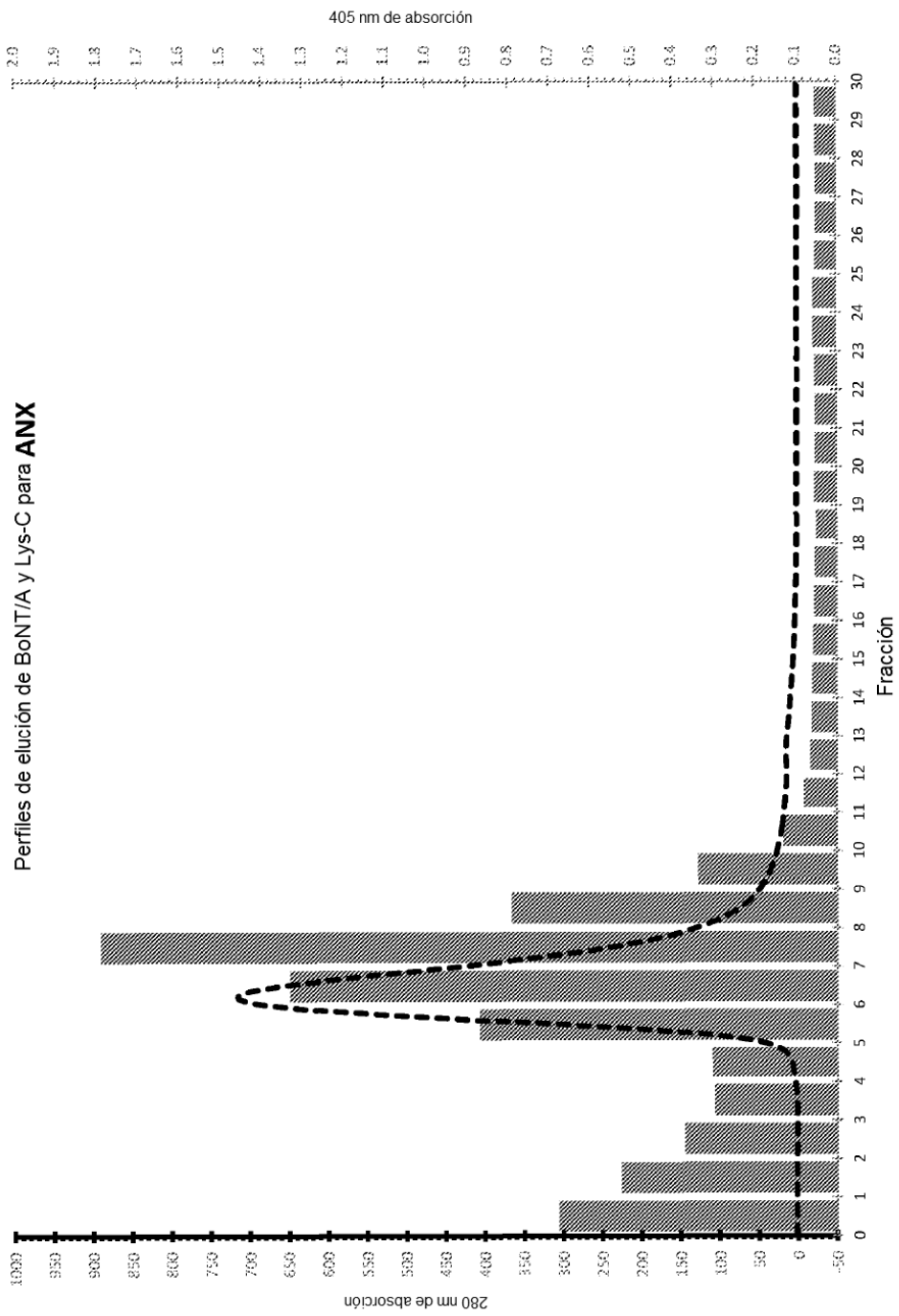


Figura 9

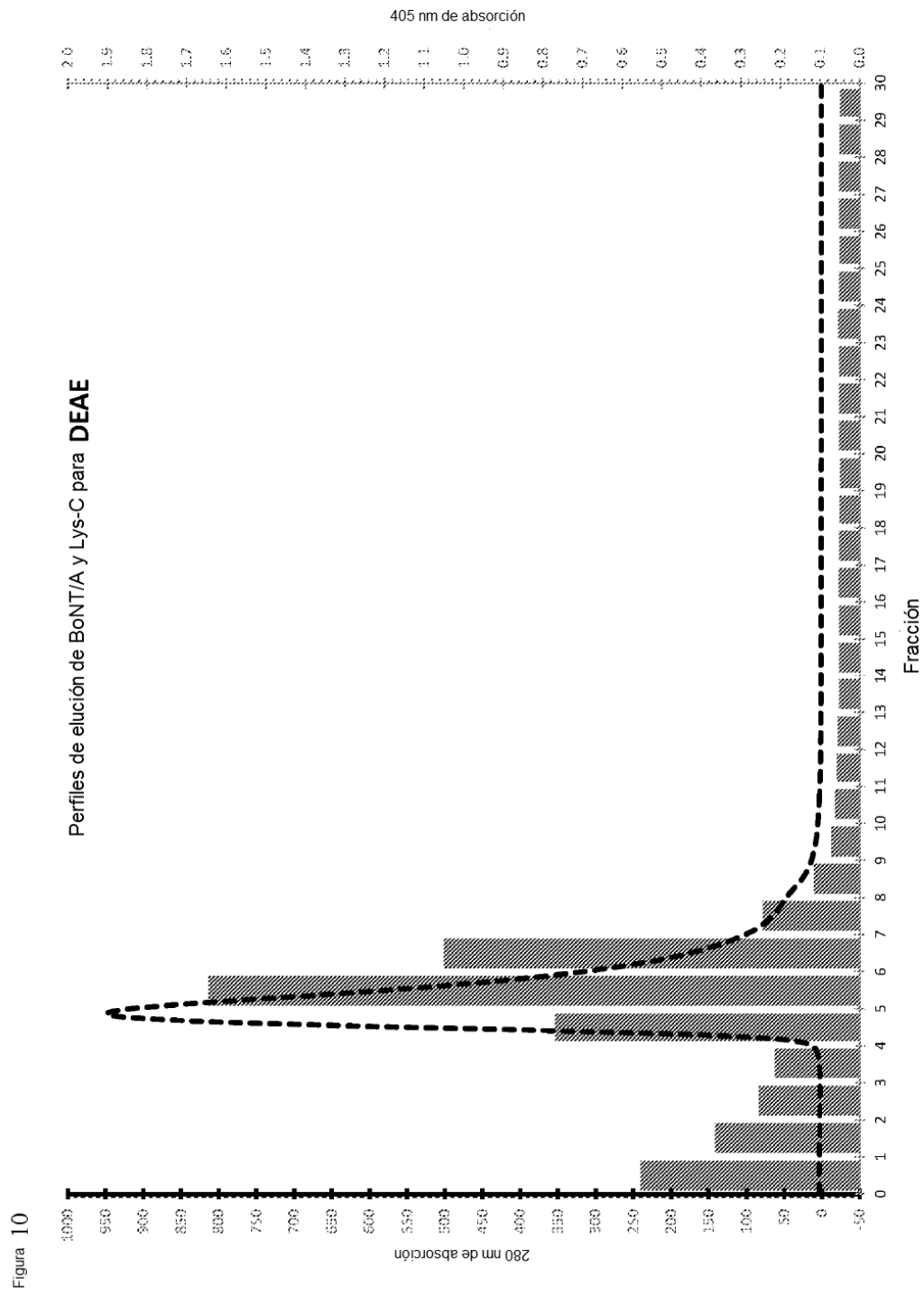


Figura 11

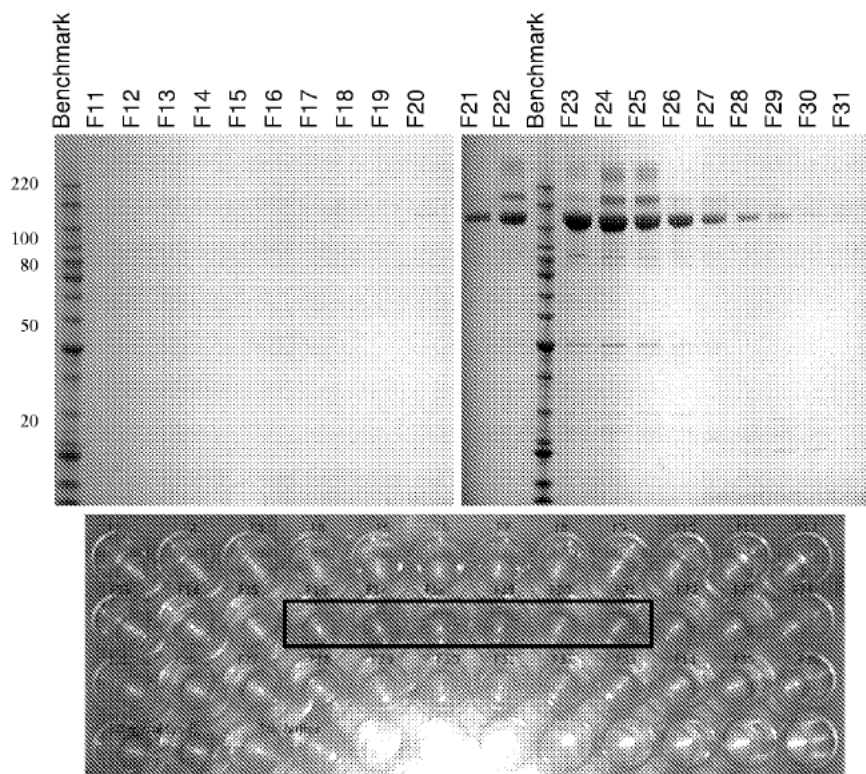


Figura 12

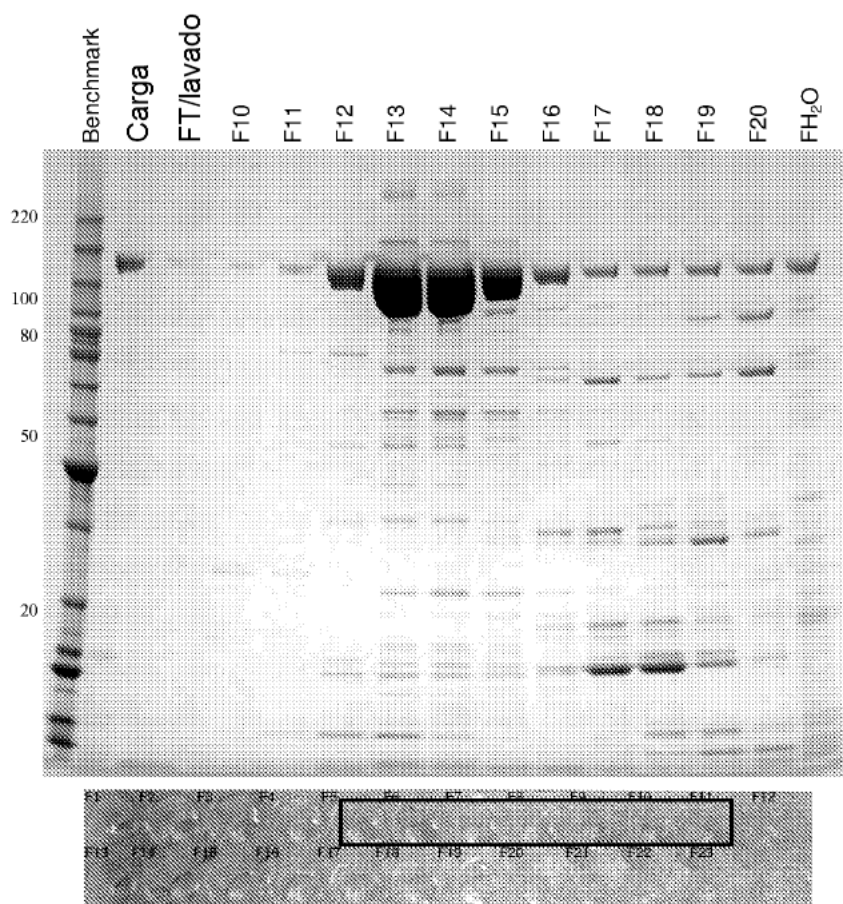


Figura 13

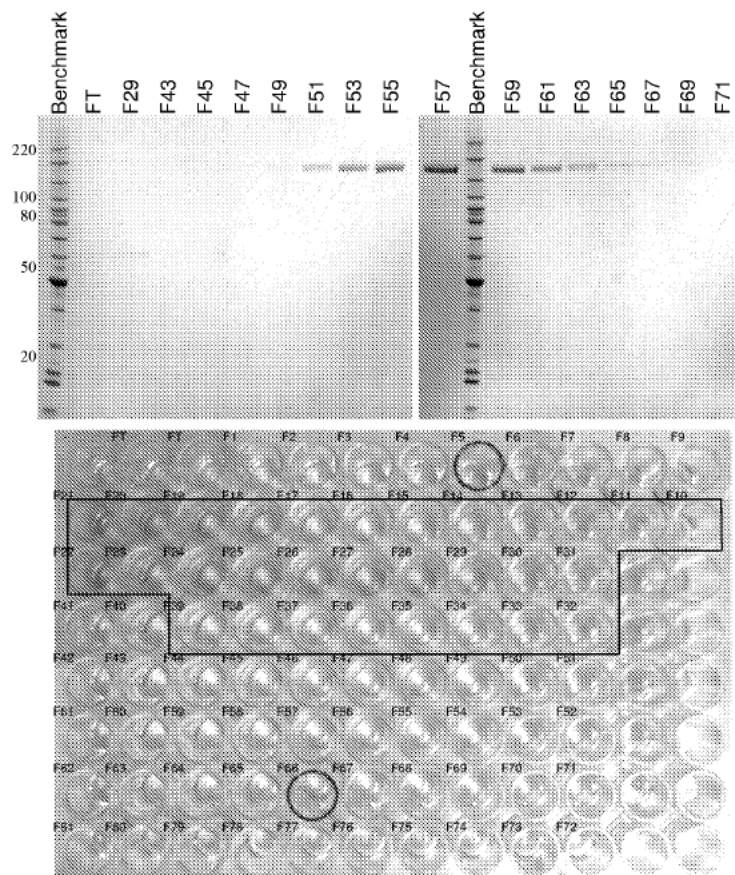


Figura 14

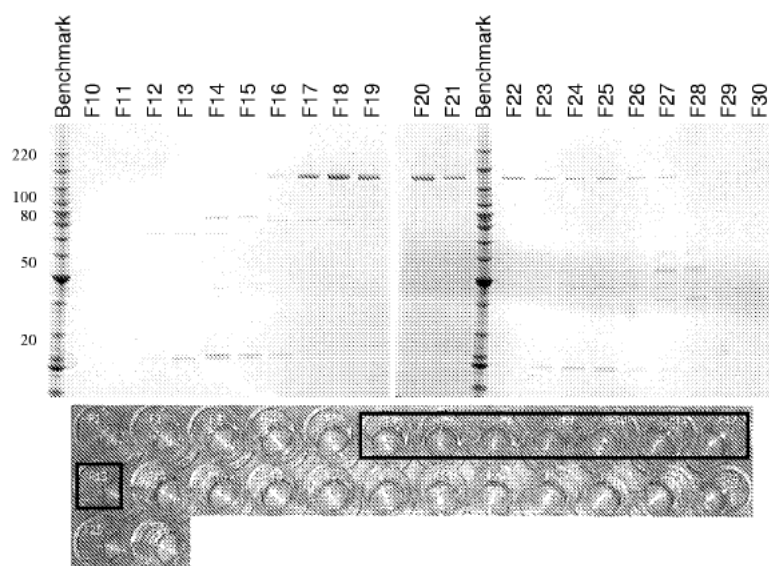


Figura 15

