

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 505**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2009** **E 16153819 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019** **EP 3031825**

54 Título: **Ensayos de actividad de serotipo A de toxina botulínica de base inmunológica**

30 Prioridad:

14.03.2008 US 36723 P

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

22.04.2020

73 Titular/es:

ALLERGAN, INC. (100.0%)
2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92612, US

72 Inventor/es:

FERNANDEZ-SALAS, ESTER;
WANG, JOANNE;
GARAY, PATTON E.;
WONG, LINA S.;
HODGES, D. DIANE y
AOKI, KEI ROGER

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 755 505 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

Ensayos de actividad de serotipo A de toxina botulínica de base inmunológica

5 La capacidad de toxinas clostridiales, tales como, por ejemplo, las neurotoxinas botulínicas (NTBo), NTBo/A, NTBo/B, NTBo/C1, NTBo/D, NTBo/E, NTBo/F y NTBo/G, y la neurotoxina tetánica (NTTe), para inhibir la transmisión neuronal está aprovechándose en una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas y cosméticas, véase por ejemplo, William J. Lipham, *Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin* (Slack, Inc., 2004). Las toxinas clostridiales disponibles comercialmente como composiciones farmacéuticas incluyen, preparaciones de NTBo/A, 10 tales como, por ejemplo, BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN®, (Ipsen Ltd., Slough, Inglaterra), PURTOX® (Mentor Corp., Santa Barbara, CA), XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Alemania), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, Corea del Sur), BTX-A (Biogen-tech Ltd., University, Yantai, Shandong, China); y preparaciones de NTBo/B, tales como, por ejemplo, MYOBLOC®/NEUROBLOC® 15 (Solstice Neurosciences, Inc., South San Francisco, CA). Como ejemplo, BOTOX® está aprobado actualmente en los EE.UU. para el tratamiento de distonía cervical en adultos para disminuir la gravedad de la posición anómala de la cabeza y el dolor de cuello asociados con la distonía cervical; para el tratamiento de hiperhidrosis axilar primaria grave que se gestiona de manera inadecuada con agentes tópicos; y para el tratamiento de estrabismo y blefaroespasma asociados con distonía, incluyendo blefaroespasma esencial benigno o trastornos del nervio VII en 20 pacientes de 12 años de edad y más.

En la actualidad, el bioensayo de DL₅₀ de ratón, una prueba de letalidad, sigue siendo el método de referencia usado por todos los fabricantes farmacéuticos para expresar la potencia de sus preparaciones. S. S. Amon *et al.*, JAMA 25 285: 1059-1070 (2001). De hecho, las unidades en las etiquetas de las preparaciones farmacéuticas son unidades de DL₅₀ de ratón y el número de animales necesarios para producir datos de DL₅₀ estadísticamente útiles es grande. La ventaja del bioensayo de DL₅₀ de ratón es que mide todas las etapas necesarias para la captación de la toxina botulínica (por ejemplo, unión de la toxina a un receptor de superficie celular, internalización del complejo toxina-receptor, translocación de cadena ligera en el citoplasma, escisión de cadena ligera de sustrato), en vez de determinar meramente la actividad sólo para parte de este proceso de intoxicación, tal como, por ejemplo, ensayos 30 *in vitro* que sólo miden la actividad enzimática de cadena ligera. Desafortunadamente, el bioensayo de DL₅₀ de ratón presenta muchos inconvenientes incluyendo alto coste operativo debido a los grandes números de animales de laboratorio requeridos, una falta de especificidad puesto que todos los serotipos de NTBo producirán el mismo punto final medible y el potencial de inexactitud a menos que se usen grandes grupos de animales. Además, los grupos en defensa de los derechos de los animales han ejercido presión sobre las agencias normativas en los EE.UU. 35 (FDA/NICEATM/CCVAM) y Europa (MHRA y EDQM), y sobre las empresas farmacéuticas que fabrican productos de neurotoxina botulínica para reducir las pruebas con animales y de manera más importante reemplazar el bioensayo de DL₅₀ de ratón para la liberación del producto. Las agencias normativas están involucrando a las empresas farmacéuticas para que aplique el principio de las "R" a las pruebas de potencia de neurotoxinas botulínicas: Reducir, Refinar, Reemplazar. D. Straughan, *Progress in Applying the Three Rs to the Potency Testing of Botulinum Toxin Type A*, *Altern. Lab. Anim.* 34(3): 305-313 (2006). En los últimos años, se han adoptado varias medidas ya para reducir y refinar el bioensayo de DL₅₀ de ratón con el fin de normalizar el protocolo y producir datos 40 más sistemáticos usando menos animales por ensayo.

El documento US 2008/064054 da a conocer una línea celular Neuro2a o SH-SY5Y que es susceptible de 45 intoxicación por NTBo/A, y un ensayo relacionado en el que un anticuerpo anti-SNAP-25 no se une a un soporte sólido.

Por tanto, un ensayo de actividad de toxina botulínica sencillo, fiable, validado y aceptable por agencias 50 gubernamentales que puede evaluar la integridad de todas las etapas necesarias en la captación de toxina botulínica sería de valor significativo debido a que un ensayo no basado en animales de ese tipo paliaría la necesidad de pruebas con animales y todas las desventajas, costes y problemas éticos asociados con este tipo de ensayo basado en animales. La presente memoria descriptiva proporciona composiciones, células y métodos novedosos para someter a ensayo la actividad de una toxina botulínica A útiles para diversas industrias, tales como, por ejemplo, las industrias farmacéutica y alimentaria, y proporciona también ventajas relacionadas. Tales 55 composiciones, células y métodos no usan animales vivos ni tejidos tomados de animales vivos, pero puede evaluar todas las etapas necesarias para la acción de la neurotoxina.

Descripción detallada de los dibujos

60 La figura 1 muestra un esquema del paradigma actual de liberación de neurotransmisores e intoxicación por toxinas clostridiales en una neurona central y periférica. La figura 1A muestra un esquema para el mecanismo de liberación de neurotransmisores de una neurona central y periférica. El proceso de liberación puede describirse como que comprende dos etapas: 1) anclaje vesicular, en el que la proteína SNARE unida a vesículas de una vesícula que contiene moléculas de neurotransmisores se asocia con las proteínas SNARE unidas a la membrana ubicadas en la 65 membrana plasmática; y 2) liberación de neurotransmisores, en la que la vesícula se fusiona con la membrana

plasmática y las moléculas de neurotransmisores experimentan exocitosis. La figura 1B muestra un esquema del mecanismo de intoxicación para la actividad de toxina tetánica y botulínica en una neurona central y periférica. Este proceso de intoxicación puede describirse como que comprende cuatro etapas: 1) unión al receptor, en la que la toxina clostridial se une a un complejo de receptor clostridial e inicia el proceso de intoxicación; 2) internalización del complejo, en la que tras la unión a la toxina, una vesícula que contiene un complejo de toxina/sistema de receptor experimenta endocitosis en la célula; 3) translocación de cadena ligera, en la que se cree que se producen múltiples acontecimientos, incluyendo cambios en el pH interno de una vesícula, formación de un poro de canal que comprende el dominio H_N de la cadena pesada de toxina clostridial, separación de la cadena ligera de toxina clostridial de la cadena pesada, y liberación de la cadena ligera y 4) modificación de la diana enzimática, en la que la cadena ligera de toxina clostridial escinde de manera proteolítica sus sustratos de SNARE diana, tales como, por ejemplo, SNAP-25, VAMP o syntaxina, impidiendo de ese modo el anclaje vesicular y la liberación de neurotransmisores.

La figura 2 muestra una comparación de la captación de NTBo/A en cuatro líneas celulares mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. La figura 2A muestra un gráfico de producto de corte de SNAP-25 detectado basándose en la cantidad de NTBo/A usada para tratar la línea celular. Se analizaron los datos en SigmaPlot usando un modelo logístico de 4 parámetros y se obtuvieron los valores de CE₅₀ para cada línea celular. La clasificación de las señales de producto de corte de SNAP-25 detectadas fue: SiMa >> Neuro-2a>LA1-55n> PC12. La figura 2B muestra las relaciones señal-ruido de las señales sin procesar a 300 pM frente a 0 pM y se calcularon a 1,2 pM frente a 0 pM para el ensayo. Las células SiMa generaron las mayores relaciones señal-ruido y los menores valores de CE₅₀.

La figura 3 muestra la optimización de medios de diferenciación celular para líneas celulares establecidas útiles en un método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A dado a conocer en la presente memoria descriptiva.

La figura 4 muestra la optimización del tiempo de diferenciación celular para células que comprenden una línea celular establecida útil en un método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A dado a conocer en la presente memoria descriptiva.

La figura 5 muestra la optimización del tratamiento con NTBo/A de células que comprenden una línea celular establecida útil en un método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A dado a conocer en la presente memoria descriptiva. Los resultados indican que se logró una CE₅₀ de menos de 2 pM con cualquiera de los tratamientos con NTBo/A sometidos a prueba.

La figura 6 muestra la sensibilidad de un método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A dado a conocer en la presente memoria descriptiva. Los resultados indicaron que la captación de NTBo/A por las células llevó menos de un minuto antes de producir cantidades significativas de producto de corte de SNAP-25 con respecto al fondo.

La figura 7 muestra la especificidad de un método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A dado a conocer en la presente memoria descriptiva. Los resultados indican que los métodos de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A dados a conocer en la presente memoria descriptiva pueden medir todas las etapas implicadas en la intoxicación por NTBo/A.

La figura 8 muestra una curva de dosis-respuesta de células SiMa diferenciadas tratadas con un complejo de NTBo/A usando un método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A dado a conocer en la presente memoria descriptiva.

La figura 9 muestra los resultados de un ensayo de base inmunológica de actividad de NTBo/A para un producto farmacéutico de NTBo/A formulado usando un método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A dado a conocer en la presente memoria descriptiva.

La figura 10 muestra la detección de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A en suero humano usando un método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A dado a conocer en la presente memoria descriptiva.

Descripción detallada

La presente memoria descriptiva proporciona ensayos novedosos para determinar la presencia o ausencia de una NTBo/A activa en una muestra y para determinar la actividad/potencia de una preparación de NTBo/A. Los ensayos basados en células novedosos dados a conocer en la presente memoria descriptiva se basan en células, reactivos y métodos de detección que permiten que el ensayo detecte cantidades picomolares de NTBo/A en una muestra. El método de la invención se define en las reivindicaciones. Los ensayos basados en células dados a conocer en la presente memoria descriptiva reducen la necesidad de estudios de toxicidad en animales, aunque sirven para analizar múltiples funciones de NTBo/A, concretamente, unión y captación celular de toxina, translocación en el citosol celular y actividad proteasa. Tal como se comenta adicionalmente a continuación, las composiciones y los

métodos novedosos pueden usarse para analizar muestras en bruto y a granel así como toxinas bicatenarias altamente purificadas y productos de toxina formulados y además son propicios para formatos de ensayo de alto rendimiento automatizados.

5 Por tanto, un aspecto de referencia dado a conocer en la presente memoria descriptiva proporciona composiciones para producir anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25. Las composiciones pueden comprender un adyuvante y una composición que incluye un antígeno de SNAP-25, un transportador unido a un antígeno de SNAP-25, o un transportador unido a un espaciador flexible unido a un antígeno de SNAP-25, en el que el ligador flexible es intermedio entre el antígeno de SNAP-25 y el transportador. Se prevé que todos y cada uno de los antígenos de SNAP-25 que desencadena una respuesta inmunitaria que produce un anticuerpo α -SNAP-25 que puede unirse a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 puede ser útil como antígeno de SNAP-25, incluyendo, sin limitación, un antígeno de SNAP-25 derivado de una SNAP-25 que se produce de manera natural, un antígeno de SNAP-25 derivado de una SNAP-25 que no se produce de manera natural y un antígeno de SNAP-25 que comprende un fragmento inmunorreactivo de la SNAP-25, la SNAP-25 de una SNAP-25 que se produce de manera natural o una SNAP-25 que no se produce de manera natural. Antígenos de SNAP-25 útiles para producir anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 incluyen, sin limitación, antígenos de SNAP-25 que comprenden un péptido de SNAP-25 que tiene una glutamina C-terminal carboxilada unida a un péptido transportador, incluyendo, sin limitación SEQ ID NO: 38. Otras composiciones útiles para preparar anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 incluyen, sin limitación, una composición que comprende un transportador unido a un ligador flexible unido a un antígeno de SNAP-25 una glutamina C-terminal carboxilada, en el que el ligador flexible es intermedio entre el antígeno de SNAP-25 y el transportador. Se prevé que todos y cada uno de los adyuvantes puedan ser útiles en una composición de este tipo, incluyendo, sin limitación, polietilenglicol (PEG), monometoxipolietilenglicol (mPEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), adyuvante completo e incompleto de Freund.

30 Otro aspecto de referencia dado a conocer en la presente memoria descriptiva proporciona métodos de producción de un anticuerpo α -SNAP-25 que puede unirse a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25. Aspectos de este método comprenden las etapas de (a) administrar a un animal una composición dada a conocer en la presente memoria descriptiva; (b) recoger del animal una muestra que contiene un anticuerpo α -SNAP-25 o célula productora de anticuerpos α -SNAP-25; y (c) aislar el anticuerpo α -SNAP-25 de la muestra. Los métodos dados a conocer son útiles para preparar o bien anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 que pueden unirse a un epítipo que comprende una glutamina en el extremo carboxilo-terminal del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 o bien anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que pueden unirse a un epítipo que comprende una glutamina en el extremo carboxilo-terminal del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25.

45 Todavía otro aspecto de referencia dado a conocer en la presente memoria descriptiva proporciona anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25. Tales anticuerpos α -SNAP-25 incluyen anticuerpos tanto que se producen de manera natural como que no se producen de manera natural, así como, anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 o anticuerpos policlonales α -SNAP-25. Los anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 útiles como anticuerpos α -SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25, incluyen, sin limitación, los anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 producidos a partir de las líneas celulares de hibridoma 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2.

55 Aún otro aspecto dado a conocer en la presente memoria descriptiva proporciona métodos de detección de actividad de NTBo/A, tal como se definen en las reivindicaciones. Aspectos de este método comprenden las etapas de (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una NTBo/A, en el que la célula de una línea celular establecida es susceptible de intoxicación por NTBo/A; (b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; (c) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 que puede unirse a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; y (d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; en el que la detección mediante el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad de NTBo/A. El anticuerpo α -SNAP-25 de la etapa c puede unirse opcionalmente a un soporte de fase sólida.

65 Aún otro aspecto dado a conocer en la presente memoria descriptiva proporciona métodos de detección de actividad de NTBo/A. Aspectos de este método comprenden las etapas de (a) tratar una célula de una línea celular

establecida con una muestra que comprende una NTBo/A, en el que la célula de una línea celular establecida puede captar una NTBo/A; (b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; (c) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 que puede unirse a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; y (d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; en el que la detección mediante el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad de NTBo/A. El anticuerpo α -SNAP-25 de la etapa c puede unirse opcionalmente a un soporte de fase sólida.

Un aspecto adicional de referencia dado a conocer en la presente memoria descriptiva proporciona métodos de determinación de inmunorresistencia a NTBo/A en un mamífero. Aspectos de este método comprenden las etapas de (a) añadir una NTBo/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que está sometiendo a prueba para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A; (b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en el que la célula de una línea celular establecida es susceptible de intoxicación por NTBo/A; (c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; (d) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 que puede unirse a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; (e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; (f) repetir las etapas a-e con una muestra de control negativo en vez de una muestra de prueba; y (g) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa (e) con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa (f), en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa (e) con relación a la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa (f) es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A. El anticuerpo α -SNAP-25 de la etapa d puede unirse opcionalmente a un soporte de fase sólida. La muestra de control en la etapa f también puede incluir una muestra de control positivo, además de la muestra de control negativo.

Las toxinas clostridiales producidas por *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium baratii* y *Clostridium butyricum* son las usadas más ampliamente en tratamientos terapéuticos y cosméticos de seres humanos y otros mamíferos. Las cepas de *C. botulinum* producen siete serotipos distintos antigénicamente de toxinas botulínicas (NTBo), que se han identificado investigando brotes de botulismo en el hombre (NTBo/A, NTBo/B, NTBo/E y NTBo/F), animales (NTBo/C1 y NTBo/D), o aislados de tierra (NTBo/G). Aunque los siete serotipos de toxina botulínica tienen estructura y propiedades biológicas similares, cada uno presenta también características heterogéneas, tales como, por ejemplo, diferentes propiedades farmacológicas. En cambio, la toxina tetánica (NTTe) se produce por un grupo uniforme de *C. tetani*. Otras dos especies de *Clostridia*, *C. baratii* y *C. butyricum*, también producen toxinas similares a NTBo/F y NTBo/E, respectivamente.

Las toxinas clostridiales se traducen cada una como un polipéptido monocatenario de aproximadamente 150 kDa que se corta posteriormente mediante escisión proteolítica dentro de un bucle disulfuro por una proteasa que se produce de manera natural, tal como, por ejemplo, una proteasa de toxina clostridial endógena o una proteasa que se produce de manera natural, producida en el entorno. Este procesamiento postraduccional proporciona una molécula bicatenaria que comprende una cadena ligera (LC, *light chain*) de aproximadamente 50 kDa y una cadena pesada (HC, *heavy chain*) de aproximadamente 100 kDa unidas entre sí por un único enlace disulfuro e interacciones no covalentes. Cada molécula bicatenaria madura comprende tres dominios distintos funcionalmente: 1) un dominio enzimático ubicado en la LC que incluye una región de metaloproteasa que contiene una actividad endopeptidasa dependiente de zinc que selecciona como diana específicamente componentes principales del aparato de liberación de neurotransmisores; 2) un dominio de translocación contenido dentro de la mitad amino-terminal de la HC (H_N) que facilita la liberación de la LC de vesículas intracelulares en el citoplasma de la célula diana; y 3) un dominio de unión que se encuentra dentro de la mitad carboxilo-terminal de la HC (H_C) que determina la actividad de unión y especificidad de unión de la toxina al complejo de receptor ubicado en la superficie de la célula diana.

La actividad de unión, de translocación y enzimática de estos tres dominios funcionales son todas necesarias para la toxicidad. Aunque no se conoce aún con precisión todos los detalles de este proceso, el mecanismo de intoxicación celular global mediante el cual las toxinas clostridiales entran en una neurona e inhiben la liberación de neurotransmisores es similar, independientemente del serotipo o subtipo. Aunque los solicitantes no desean limitarse por la siguiente descripción, el mecanismo de intoxicación puede describirse como que comprende al menos cuatro etapas: 1) unión al receptor, 2) internalización del complejo, 3) translocación de cadena ligera y 4) modificación de la diana enzimática (figura 1). Se inicia el proceso cuando el dominio HC de una toxina clostridial se une a un sistema de receptor específico de toxina ubicado en la superficie de la membrana plasmática de una célula diana. Se cree que la especificidad de unión de un complejo de receptor se logra, en parte, mediante combinaciones específicas de gangliósidos y receptores de proteína que parecen comprender de manera distinta cada complejo de receptor de toxina clostridial. Una vez unidos, los complejos toxina/receptor se internalizan mediante endocitosis y las vesículas

5 internalizadas se dividen a rutas intracelulares específicas. La etapa de translocación parece desencadenarse mediante la acidificación del compartimento vesicular. Este proceso parece iniciar importantes redistribuciones estructurales dependientes del pH que aumentan la hidrofobicidad, promueven la formación de poros y facilitan la separación de las cadenas pesada y ligera de la toxina. Una vez separadas, la endopeptidasa de cadena ligera de la
 10 toxina se libera de la vesícula intracelular en el citosol en el que parece seleccionar como diana específicamente componentes principales del aparato de liberación de neurotransmisores. Estas proteínas principales, proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP)/sinaptobrevina, proteína asociada a sinaptosoma de 25 kDa (SNAP-25) y syntaxina, son necesarias para la fusión y el anclaje vesicular sináptico en el terminal nervioso y constituyen miembros de la familia de receptores de proteínas de unión al factor sensible a N-etilmaleimida (SNARE) soluble.
 15 NTBo/A y NTBo/E cortan SNAP-25 en la región carboxilo-terminal, liberando un fragmento de nueve o veintiséis aminoácidos, respectivamente, y NTBo/C1 también corta SNAP-25 cerca del extremo carboxilo-terminal liberando un fragmento de ocho aminoácidos. Los serotipos botulínicos NTBo/B, NTBo/D, NTBo/F y NTBo/G, y la toxina tetánica, actúan sobre la parte central conservada de VAMP, y liberan la parte amino-terminal de VAMP en el citosol. NTBo/C1 corta syntaxina en un único sitio cerca de la superficie de la membrana citosólica. La proteólisis selectiva de SNARE sinápticas explica el bloqueo de la liberación de neurotransmisores provocado por toxinas clostridiales *in vivo*. Las dianas de proteína SNARE de toxinas clostridiales son comunes para la exocitosis en una variedad de tipos no neuronales; en estas células, como en neuronas, la actividad peptidasa de cadena ligera inhibe la exocitosis, véanse, por ejemplo, Yann Humeau *et al.*, How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release, 82(5) *Biochimie*. 427-446 (2000); Kathryn Turton *et al.*, Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Structure, Function and Therapeutic Utility, 27(11) *Trends Biochem. Sci.* 552-558. (2002); Giovanna Lalli *et al.*, The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons, 11(9) *Trends Microbiol.* 431-437, (2003).

25 Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una composición para producir anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25. Otros aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una composición que induce respuesta inmunitaria para producir anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25. Tal como se usa en el presente documento, el término “composición que induce respuesta inmunitaria” se refiere a una composición que comprende un antígeno de SNAP-25 que, cuando se administra a un animal, estimula una respuesta inmunitaria contra el antígeno de SNAP-25, produciendo de ese modo anticuerpos α -SNAP-25 que pueden unirse a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25. El término “respuesta inmunitaria” se refiere a cualquier respuesta por el sistema inmunitario de un animal a una composición que induce respuesta inmunitaria. A modo de ejemplo las respuestas inmunitarias incluyen, pero no se limitan a, inmunidad celular así como humoral local y sistémica, tal como, por ejemplo, respuestas de CTL, incluyendo la inducción específica de antígeno de CTL CD8+, respuestas de células T auxiliares, incluyendo respuestas proliferativas de células T y liberación de citocinas, y respuestas de células B incluyendo, por ejemplo, una respuesta de producción de anticuerpos. El término “inducir una respuesta inmunitaria” se refiere a la administración de una composición que induce respuesta inmunitaria o un polinucleótido que codifica para la composición que induce respuesta inmunitaria, en la que se ve afectada una respuesta inmunitaria, es decir, estimulada, iniciada o inducida.

45 Una composición comprende un antígeno de SNAP-25. Tal como se usa en el presente documento, el término “antígeno” se refiere a una molécula que provoca una respuesta inmunitaria e incluye, sin limitación, péptidos, polisacáridos y conjugados de lípidos, tales como, por ejemplo, lipoproteínas y glicolípidos. Tal como se usa en el presente documento, el término “antígeno de SNAP-25” se refiere a cualquier antígeno que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A que puede provocar una respuesta inmunitaria. Un antígeno de SNAP-25 usado en una composición que induce respuesta inmunitaria debe ser lo suficientemente grande como para ser de secuencia sustancialmente única, reduciendo por tanto la posibilidad de producción de anticuerpos que dan reactividad cruzada contra antígenos distintos de SNAP-25. Además, un antígeno de SNAP-25 usado en una composición que induce respuesta inmunitaria debe ser lo suficientemente pequeño como para sólo desencadenar una respuesta inmunitaria sustancialmente contra una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A, aumentando por tanto la posibilidad de producción de anticuerpos α -SNAP-25 que pueden distinguir una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de una SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. Además, también es muy deseable generar anticuerpos α -SNAP-25 de una única secuencia de aminoácidos con buen rendimiento que sean selectivos de manera reproducible y que se unan con avidéz aceptable para permitir el diseño de un ensayo altamente sensible.

60 La secuencia que rodea un sitio de corte de NTBo/A presente en SNAP-25 se indica como P₅-P₄-P₃-P₂-P₁-P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅', representando P₁-P₁' el enlace escindible. Tras el corte mediante NTBo/A, los productos de corte resultantes producidos comprenden un fragmento que incluye la secuencia P₅-P₄-P₃-P₂-P₁ y un fragmento que incluye la P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅'. Por tanto, tal como se usa en el presente documento, el término “SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A” se refiere a cualquier

SNAP-25 que tiene el residuo P₁ como su aminoácido carboxilo-terminal. Por ejemplo, Q₁₉₇-R₁₉₈ de SNAP-25 humana (SEQ ID NO: 5) representa el enlace escindible P₁-P₁' para el sitio de corte de NTBo/A. Como tal, "SNAP-25 que tiene una glutamina en el extremo carboxilo-terminal del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A" sería cualquier producto de corte de SNAP-25 que tenga una glutamina en su aminoácido carboxilo-terminal en el que la glutamina representa Q₁₉₇ del enlace escindible. Como otro ejemplo, K₂₀₄-H₂₀₅ de SNAP-25 de *Torpedo marmorata* (SEQ ID NO: 16) representa el enlace escindible P₁-P₁' para el sitio de corte de NTBo/A. Como tal, "SNAP-25 que tiene una lisina en el extremo carboxilo-terminal del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A" sería cualquier producto de corte de SNAP-25 que tenga una lisina en su aminoácido carboxilo-terminal en el que la lisina representa K₂₀₄ del enlace escindible.

El antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A del sitio de corte de NTBo/A puede modificarse para potenciar la inmunogenicidad de un antígeno de SNAP-25, un hapteno, o cualquier otro compuesto antigénico que es inmunogénico, no inmunogénico o débilmente inmunogénico cuando no está asociado con la modificación. En un aspecto de esta realización, el residuo P₁ carboxilo-terminal del enlace escindible de un antígeno de SNAP-25 puede estar carboxilado. La carboxilación aumenta las propiedades inmunogénicas deseadas de un antígeno de SNAP-25 en dos aspectos. En primer lugar, dado que los aminoácidos cargados potencian la inmunogenicidad, añadir un grupo COO⁻ al residuo carboxilo-terminal aumentará la inmunogenicidad global de un antígeno de SNAP-25. En segundo lugar, dado que el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A está en un estado cargado tras el corte, añadir un grupo COO⁻ al residuo carboxilo-terminal imitará mejor al antígeno real al que están diseñados que se unan los anticuerpos α-SNAP-25 dados a conocer en la presente memoria descriptiva.

En un aspecto de esta realización, el residuo amino-terminal de un antígeno de SNAP-25 puede modificarse mediante la adición de un aminoácido adaptado para unir el antígeno de SNAP-25 a una proteína transportadora, tal como, por ejemplo, una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina sérica bovina (BSA), un inhibidor de tripsina de soja (STI), o un péptido de unión múltiple (MAP). Por ejemplo, un residuo de cisteína puede situarse en el extremo amino-terminal para conjugar la proteína transportadora KLH.

Por tanto, en una realización, un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede ser, por ejemplo, de al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 25, o al menos 30 aminoácidos de longitud. En otra realización, un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede ser, por ejemplo, de como máximo 5, como máximo 6, como máximo 7, como máximo 8, como máximo 9, como máximo 10, como máximo 11, como máximo 12, como máximo 13, como máximo 14, como máximo 15, como máximo 16, como máximo 17, como máximo 18, como máximo 19, como máximo 20, como máximo 25, o como máximo 30 aminoácidos de longitud. Todavía en otra realización, un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede ser, por ejemplo, de entre 7-12 aminoácidos, entre 10-15 aminoácidos, o entre 13-18 aminoácidos.

En otra realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A comprende SEQ ID NO: 32. En aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A comprende SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147 o SEQ ID NO: 148. En una realización adicional, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A comprende SEQ ID NO: 38.

Aún en otra realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A comprende SEQ ID NO: 39. En aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A comprende SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44. En una realización adicional, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A comprende SEQ ID NO: 45.

Se prevé que todos y cada uno de los antígenos de SNAP-25 que desencadenan una respuesta inmunitaria que produce anticuerpos α-SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 puedan ser útiles como antígeno de SNAP-25. Por tanto, variantes de la secuencia de aminoácidos que comprenden SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147 o SEQ ID NO: 148 pueden ser útiles como antígeno de SNAP-25 para desencadenar una respuesta inmunitaria que produce anticuerpos α-SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25. Por tanto, en una realización, un antígeno de SNAP-25 puede sustituir al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, o al menos 5 sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido en los antígenos de SNAP-25 que comprenden SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID

NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147 o SEQ ID NO: 148. Todavía en otra realización, un antígeno de SNAP-25 puede tener una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% respecto a los antígenos de SNAP-25 que comprenden SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147 o SEQ ID NO: 148.

Se prevé que uno o más transportadores puedan unirse a un antígeno de SNAP-25 para potenciar la inmunogenicidad de un antígeno de SNAP-25 que es inmunogénico, no inmunogénico o débilmente inmunogénico cuando no está asociado con el transportador. Los ejemplos no limitativos, incluyen, por ejemplo, una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina sérica bovina (BSA), un inhibidor de tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP). Tal como se conoce bien en la técnica, un antígeno no antigénico o débilmente antigénico puede hacerse antigénico mediante acoplamiento del antígeno a un transportador. Otros transportadores diversos y métodos para acoplar un antígeno a un transportador se conocen bien en la técnica. Véanse, por ejemplo, Harlow y Lane, citado anteriormente, 1998a; Harlow y Lane, citado anteriormente, 1998b; y David W. Waggoner, Jr. *et al.*, Immunogenicity-enhancing carriers and compositions thereof and methods of using the same, publicación de patente estadounidense n.º 20040057958 (25 de marzo de 2004). Un epítipo también puede generarse expresando el epítipo como proteína de fusión. Los expertos en la técnica conocen bien métodos para expresar fusiones de polipéptido tal como se describe, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (Suplemento 47), John Wiley & Sons, Nueva York (1999). Como el extremo carboxilo-terminal del antígeno de SNAP-25 debe ser el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A, un transportador debe unirse al extremo amino del antígeno de SNAP-25.

Se prevé que uno o más espaciadores flexibles puedan unirse a un antígeno de SNAP-25 para potenciar la inmunogenicidad de un antígeno de SNAP-25 que es inmunogénico, no inmunogénico o débilmente inmunogénico cuando no está asociado con los ligadores flexibles. Un espaciador flexible aumenta la longitud de péptido global del antígeno de SNAP-25 y proporciona flexibilidad, facilitando de ese modo la presentación apropiada del antígeno de SNAP-25 a las células inmunitarias. Como ejemplo no limitativo, una composición puede comprender un antígeno de SNAP-25 unido a uno o más espaciadores flexibles en tándem para presentar mejor el antígeno de SNAP-25 a células inmunitarias, facilitando de ese modo la respuesta inmunitaria.

Un espaciador flexible que comprende un péptido es de al menos un aminoácido de longitud y comprende aminoácidos no cargados con pequeños grupos R de cadena lateral, tales como, por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina o serina. Por tanto, en una realización un espaciador flexible puede ser, por ejemplo, de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10 aminoácidos de longitud. En otra realización, un espaciador flexible puede ser, por ejemplo, de al menos 1, como máximo 2, como máximo 3, como máximo 4, como máximo 5, como máximo 6, como máximo 7, como máximo 8, como máximo 9, o como máximo 10 aminoácidos de longitud. Todavía en otra realización, un espaciador flexible puede ser, por ejemplo, de entre 1-3 aminoácidos, entre 2-4 aminoácidos, entre 3-5 aminoácidos, entre 4-6 aminoácidos, o entre 5-7 aminoácidos. Los ejemplos no limitativos de un espaciador flexible incluyen, por ejemplo, espaciadores de G tales como GGG, GGGG (SEQ ID NO: 55) y GGGGS (SEQ ID NO: 56) o espaciadores de A tales como AAA, AAAA (SEQ ID NO: 57) y AAAAV (SEQ ID NO: 58). Un espaciador flexible se liga en marco al antígeno de SNAP-25 como proteína de fusión.

Tal como se comentó anteriormente, se usa un espaciador flexible, en parte, para aumentar la longitud de péptido global del antígeno de SNAP-25. Por ejemplo, un antígeno de 5-10 aminoácidos de SNAP-25 puede tener su longitud global aumentada mediante ligado a un espaciador flexible de 3-5 aminoácidos en el extremo amino del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno de 5-10 aminoácidos de SNAP-25 puede tener su longitud global aumentada mediante ligado a un espaciador flexible de 4-6 aminoácidos en el extremo amino del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno de 5-10 aminoácidos de SNAP-25 puede tener su longitud global aumentada mediante ligado a un espaciador flexible de 7-10 aminoácidos en el extremo amino del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno de 7-12 aminoácidos de SNAP-25 puede tener su longitud global aumentada mediante ligado a un espaciador flexible de 1-3 aminoácidos en el extremo amino del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno de 7-12 aminoácidos de SNAP-25 puede tener su longitud global aumentada mediante ligado a un espaciador flexible de 4-6 aminoácidos en el extremo amino del antígeno de SNAP-25. La longitud aumentada proporcionada por el espaciador flexible permite la selección de un antígeno de pequeño tamaño de SNAP-25, aumentando de ese modo la probabilidad de que el antígeno de SNAP-25 sólo desencadene una respuesta inmunitaria sustancialmente contra una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A, aumentando por tanto la posibilidad de producción de anticuerpos contra α -SNAP-25 que pueden distinguir una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de una SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A.

Se prevé que las composiciones dadas a conocer en la presente memoria descriptiva puedan comprender opcionalmente un antígeno de SNAP-25 dado a conocer en la presente memoria descriptiva y uno o más

adyuvantes. Tal como se usa en el presente documento, el término “adyuvante” cuando se usa en referencia a una composición de SNAP-25 se refiere a cualquier sustancia o mezcla de sustancias que aumenta o diversifica la respuesta inmunitaria frente a un antígeno de SNAP-25. Un adyuvante puede servir, por ejemplo, para reducir el número de inmunizaciones o la cantidad de antígeno requerido para inmunización protectora. El uso de adyuvantes en una composición que induce respuesta inmunitaria se conoce bien. El principal objetivo de estos adyuvantes es permitir un aumento en la respuesta inmunitaria. Los adyuvantes no limitativos incluyen, por ejemplo, liposomas, fases oleosas, incluyendo, sin limitación, el tipo de adyuvantes de Freund, tales como, por ejemplo, adyuvante completo de Freund (FCA); adyuvante incompleto de Freund (FIA); glicósidos de sapogenina, tales como, por ejemplo, saponinas; carbopol; N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (conocido comúnmente como muramil dipéptido o “MDP”); y lipopolisacárido (LPS). Tales adyuvantes se usan generalmente en forma de una emulsión con una fase acuosa, o, más comúnmente, puede consistir en sales inorgánicas insolubles en agua. Estas sales inorgánicas pueden consistir, por ejemplo, en hidróxido de aluminio, sulfato de zinc, hidróxido de hierro coloidal, fosfato de calcio o cloruro de calcio. El hidróxido de aluminio (Al(OH)₃) es un adyuvante usado comúnmente. Actualmente, el único adyuvante aprobado por la FDA para su uso en seres humanos son las sales de aluminio (Alum) que se usan para “depositar” antígenos mediante precipitación de los antígenos. Los adyuvantes proporcionados anteriormente son meramente a modo de ejemplo. De hecho, puede usarse cualquier adyuvante en una composición de SNAP-25 dada a conocer en la presente memoria descriptiva siempre que el adyuvante satisfaga las características requeridas para inducir una respuesta inmunitaria.

Un transportador dado a conocer en la presente memoria descriptiva también puede actuar como adyuvante. Se describen adyuvantes específicos y métodos de preparación y uso, por ejemplo, en Gupta *et al.* Vaccine, 11 : 993-306, 1993; Arnon, R. (Ed.) Synthetic Vaccines 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987; y David W. Waggoner, Jr. *et al.*, Immunogenicity-Enhancing Carriers and Compositions Thereof and Methods of Using the Same, publicación de patente estadounidense n.º 20040057958 (25 de marzo de 2004). Adyuvantes adicionales incluyen cualquier compuesto descrito en el Capítulo 7 (págs. 141-227) de “Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach” (eds. Powell, M. F. y Newman, M. J.) Pharmaceutical Biotechnology, Volumen 6, Plenum Press (Nueva York). Los ejemplos de este compendio incluyen muramil dipéptido (MDP) y Montanide 720. Moléculas tales como poli-inosina:citosina (poli I:C) o ADN de plásmido que contiene motivos CpG también pueden administrarse como adyuvantes en combinación con antígenos encapsulados en micropartículas. En otro ejemplo, el adyuvante es un agente que facilita la entrada del compuesto antigénico en el citoplasma de una célula tal como listeriolisina, estreptolisina o una mezcla de las mismas.

Por tanto, en una realización, una composición de SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo-terminal carboxilada unida a un péptido transportador. En aspectos de esta realización, un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo-terminal carboxilada comprende SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147 o SEQ ID NO: 148. En otro aspecto de esta realización, un antígeno de SNAP-25 comprende SEQ ID NO: 38. En aspectos de esta realización, el péptido transportador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina sérica bovina (BSA), un inhibidor de tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP).

En otra realización, una composición de SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo-terminal carboxilada unida a un péptido transportador. En aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo-terminal carboxilada comprende SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44. En otro aspecto de esta realización, un antígeno de SNAP-25 comprende SEQ ID NO: 45. En aspectos de esta realización, el péptido transportador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina sérica bovina (BSA), un inhibidor de tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP).

Aún en otra realización, una composición de SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina C-terminal carboxilada unida a uno o más ligadores flexibles y un péptido transportador en el que los ligadores flexibles son intermedios entre el antígeno de SNAP-25 y el péptido transportador. En aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo-terminal carboxilada comprende SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147 o SEQ ID NO: 148. En otra realización, un antígeno de SNAP-25 comprende SEQ ID NO: 46. En aspectos de esta realización, el péptido transportador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina sérica bovina (BSA), un inhibidor de tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP). En aspectos de esta realización, el ligador flexible es un espaciador de G o un espaciador de A.

Todavía en otra realización, una composición de SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una lisina C-terminal carboxilada unida a un ligador flexible y un péptido transportador en el que el ligador flexible es intermedio entre el antígeno de SNAP-25 y el péptido transportador. En aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo-terminal carboxilada comprende SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44. En otro aspecto de esta realización, un antígeno de SNAP-25 comprende SEQ ID NO: 47. En aspectos de esta realización, el péptido transportador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina sérica bovina (BSA), un

inhibidor de tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP). En aspectos de esta realización, el ligador flexible es un espaciador de G o un espaciador de A.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un método para producir anticuerpos contra α -SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25. Un anticuerpo α -SNAP-25 que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 puede producirse mediante una amplia variedad de métodos que se conocen bien en la técnica. Se conocen en la técnica protocolos específicos para preparar y usar anticuerpos así como detectar y medir la especificidad de unión, afinidad de unión y avidez de unión de anticuerpos. Véanse, por ejemplo, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1998a); y USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL: PORTABLE PROTOCOL No. 1 (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998b); Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2001; y Current Protocols in Molecular Biology, 2004; David Anderson *et al.*, Therapeutic Polypeptides, Nucleic Acids Encoding Same, and Methods of Use, patente estadounidense 7.034.132 (25 de abril de 2005); y Beatriz M. Carreno *et al.*, Antibodies Against CTLA4, patente estadounidense 7.034.121 (25 de abril de 2006).

Como ejemplo no limitativo, pueden producirse anticuerpos policlonales contra α -SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 inyectando a un animal, tal como, por ejemplo, un conejo, una cabra, un ratón u otro mamífero, una o más inyecciones de una composición dada a conocer en la presente memoria descriptiva. Como otro ejemplo no limitativo, pueden producirse anticuerpos policlonales contra α -SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 inyectando en un huevo, tal como, por ejemplo, un huevo de gallina, una o más inyecciones de una composición dada a conocer en la presente memoria descriptiva. El título de anticuerpos en el animal inmunizado puede monitorizarse a lo largo del tiempo mediante técnicas convencionales, tales como con un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando un ensayo de actividad basado en células o antígeno inmovilizado. Si se desea, pueden aislarse anticuerpos policlonales para un anticuerpo α -SNAP-25 que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25, del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de afinidad de proteína A para obtener la fracción de IgG, o mediante purificación de afinidad contra el péptido usado para producir los anticuerpos.

Como otro ejemplo no limitativo, puede producirse anticuerpo monoclonal contra α -SNAP-25 que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 usando un método de hibridoma. Véanse por ejemplo, Capítulo 6 Monoclonal Antibodies, págs. 196-244, Harlow & Lane, citado anteriormente, 1998a; y Capítulo 7 Growing Hybridomas, págs. 245-282, Harlow & Lane, citado anteriormente, 1998a; y Goding, págs. 59-103, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986). En este método, un animal huésped, tal como, por ejemplo, un ratón, un hámster, u otro animal huésped apropiado, se expone normalmente a una o más inyecciones de un antígeno de SNAP-25 dado a conocer en la presente memoria descriptiva para provocar linfocitos que producen o que pueden producir anticuerpos contra α -SNAP-25 que se unirán específicamente a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. El título de anticuerpos en el animal inmunizado puede monitorizarse a lo largo del tiempo mediante técnicas convencionales, tales como con un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando un ensayo de actividad basado en células o antígeno inmovilizado. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro* usando una línea de cultivo celular adecuada. En un momento apropiado tras la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos son los más altos, las células productoras de anticuerpos se aíslan del animal. Generalmente, o bien se usan linfocitos de sangre periférica, si se desean células de origen humano, o bien se usan células de bazo o células de ganglio linfático, si no se desean fuentes de mamífero humano. Las células productoras de anticuerpos aisladas se fusionan con una línea celular inmortal usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Normalmente, se fusiona una línea celular de mieloma murino con esplenocitos recogidos de un ratón inmunizado de manera apropiada para producir el hibridoma. Líneas celulares inmortales preferidas son líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles a medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Puede usarse cualquiera de varias líneas celulares de mieloma como pareja de fusión según técnicas convencionales, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8,653 o Sp2/O-Ag14. Entonces se seleccionan células de hibridoma que resultan de la fusión usando medio HAT, que destruye células de mieloma no fusionadas y fusionadas de manera improductiva (los esplenocitos no fusionados mueren tras varios días en cultivo porque no se transforman). El medio de cultivo en el que se hacen crecer las células de hibridoma puede someterse entonces a un ensayo para detectar la presencia de anticuerpos contra α -SNAP-25 monoclonales que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25. Por ejemplo, pueden examinarse sobrenadantes de hibridoma usando medios positivos para α -SNAP-25 en un ensayo de inmunoprecipitación, ensayo de unión *in vitro*, tal como, por ejemplo, un radioinmunoensayo (RIA) o

un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), o en un ensayo de actividad basado en células. Tales técnicas y ensayos se conocen en la técnica. Véanse por ejemplo, Capítulo 11 Immunoprecipitation, págs. 421-470, Harlow & Lane, citado anteriormente, 1998a; Capítulo 12 Immunoblotting, págs. 471-510, Harlow & Lane, citado anteriormente, 1998a; Capítulo 14 Immunoassays, págs. 553-612, Harlow & Lane, citado anteriormente, 1998a. Pueden realizarse estudios adicionales para determinar si el anticuerpo es también no reactivo frente a una SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. La afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 monoclonal también puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard. Véanse, por ejemplo, Peter J. Munson y David Rodbard, Ligand: A Versatile Computerized Approach For Characterization of Ligand-Binding Systems, 107(1) Anal. Biochem. 220-239 (1980). Tras identificarse las células de hibridoma deseadas, se usan procedimientos de dilución limitante para aislar clones que se originan a partir de una única célula hasta que se obtiene una línea celular clonal que expresa el anticuerpo monoclonal deseado. Se eligen aquellos anticuerpos suficientemente selectivos para una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A y que se unen con avidez suficientemente alta, para su caracterización y estudio adicionales.

Otra alternativa para preparar un anticuerpo α -SNAP-25 monoclonal que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 es mediante el examen de una biblioteca de inmunoglobulinas combinatoria recombinante, tal como, por ejemplo, una biblioteca de presentación en fago de anticuerpos, con un péptido de SNAP-25 y aislando los miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. Están disponibles comercialmente kits para generar y examinar bibliotecas de presentación en fago, tales como, por ejemplo, el sistema de anticuerpos de fago recombinantes (Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ); y el kit de presentación en fago SurfZAP™ (Stratagene, La Jolla, CA). Adicionalmente, pueden encontrarse ejemplos de métodos y reactivos útiles en la generación y el examen de una biblioteca de presentación de anticuerpos, por ejemplo, en Ladner *et al.* patente estadounidense 5.223.409; Borrebaeck *et al.* patente estadounidense 5.712.089; Griffiths *et al.* patente estadounidense 5.885.793; Griffiths *et al.* patente estadounidense 5.962.255; McCafferty *et al.* patente estadounidense 5.969.108; Griffiths *et al.* patente estadounidense 6.010.884; Jespers *et al.* patente estadounidense 6.017.732; Borrebaeck *et al.* patente estadounidense 6.027.930; Johnson *et al.* patente estadounidense 6.140.471; McCafferty *et al.* patente estadounidense 6.172.197, cada una de las cuales se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, recoger una muestra que contiene un anticuerpo α -SNAP-25 o células productoras de anticuerpos α -SNAP-25. Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra que contiene un anticuerpo α -SNAP-25 o célula productora de anticuerpos α -SNAP-25" se refiere a cualquier materia biológica que contiene o potencialmente contiene al menos un anticuerpo α -SNAP-25 que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25. Se prevé que todas y cada una de las muestras que pueden contener un anticuerpo α -SNAP-25 que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 puedan usarse en este método, incluyendo, sin limitación, sangre, plasma, suero y linfa. También se prevé que cualquier célula que puede producir un anticuerpo α -SNAP-25 que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 pueda usarse en este método, incluyendo, sin limitación, una célula CD8, una célula CTL, una célula T auxiliar y una célula B. Una variedad de métodos bien conocidos pueden usarse para recoger de un individuo una muestra que contiene el anticuerpo α -SNAP-25 o célula productora de anticuerpos α -SNAP-25, véanse, por ejemplo, Harlow & Lane, citado anteriormente, 1998a; y Harlow & Lane, citado anteriormente, 1998b. De manera similar, una variedad de métodos bien conocidos pueden usarse para el procesamiento de una muestra para aislar un anticuerpo α -SNAP-25 que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25. Un procedimiento para recoger una muestra puede seleccionarse basándose en el tipo de anticuerpo que va a aislarse. Como ejemplo no limitativo, cuando se aísla un anticuerpo policlonal α -SNAP-25 que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25, una muestra apropiada puede ser una muestra de sangre que contiene tal anticuerpo α -SNAP-25, mientras que cuando se aísla un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25, una muestra apropiada puede ser una célula productora de anticuerpos α -SNAP-25 tal como una célula de bazo o hibridoma.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, aislar un anticuerpo α -SNAP-25 que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 de la muestra. Los expertos en la técnica conocen bien métodos de aislamiento de tales anticuerpos α -SNAP-25, tales como, por ejemplo, anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 o anticuerpos α -SNAP-25 monoclonales que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un

producto de corte de SNAP-25. Véanse, por ejemplo, Harlow y Lane, citado anteriormente, 1998a; y Harlow y Lane, citado anteriormente, 1998b. Por ejemplo, tales anticuerpos policlonales α -SNAP-25 pueden aislarse de la muestra mediante técnicas bien conocidas, tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando proteína A o proteína G, que proporcionan principalmente la fracción de IgG de suero inmunitario. Posteriormente, o de manera alternativa, un antígeno específico de SNAP-25 puede inmovilizarse sobre una columna o perlas magnéticas para purificar los anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 mediante cromatografía de inmovilización. Un anticuerpo α -SNAP-25 monoclonal que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 puede aislarse del medio de cultivo o líquido ascítico mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Por tanto, en una realización, un método de producción de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 comprende las etapas (a) administrar a un animal una composición que comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina C-terminal carboxilada unida a un péptido transportador; (b) recoger del animal una muestra que contiene un anticuerpo α -SNAP-25 o célula productora de anticuerpos α -SNAP-25; y (c) aislar el componente de anticuerpo α -SNAP-25 de la muestra. En un aspecto de esta realización, el anticuerpo α -SNAP-25 que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 es un anticuerpo policlonal. En otro aspecto de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto adicional de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 monoclonal que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 producido es un subtipo de IgG. En otros aspectos de esta realización, la composición de SNAP-25 comprende además un adyuvante, tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), monometoxipolietilenglicol (mPEG) o poli(alcohol vinílico) (PVA).

En otra realización, un método de producción de anticuerpos α -SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 comprende las etapas (a) administrar a un animal una composición que comprende un péptido de SNAP-25 que tiene una glutamina C-terminal carboxilada unida a un ligador flexible y un péptido transportador en el que el ligador flexible es intermedio entre el péptido de SNAP-25 y el péptido transportador; (b) recoger del animal una muestra que contiene un anticuerpo α -SNAP-25 o célula productora de anticuerpos α -SNAP-25; y (c) aislar el anticuerpo α -SNAP-25 de la muestra. En un aspecto de esta realización, los anticuerpos α -SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 es un anticuerpo policlonal. En otro aspecto de esta realización, los anticuerpos α -SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto adicional de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 monoclonal que se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 producido en un subtipo de IgG. En otros aspectos de esta realización, la composición de SNAP-25 comprende además un adyuvante, tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), monometoxipolietilenglicol (mPEG) o poli(alcohol vinílico) (PVA).

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un anticuerpo α -SNAP-25 aislado que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" se refiere a separar una molécula de su entorno natural mediante el uso de intervención humana. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula generada por un sistema inmunitario que se preparó en respuesta a un antígeno particular que se une específicamente a ese antígeno, e incluye tanto anticuerpos que se producen de manera natural como anticuerpos que no se producen de manera natural. Tal como se usa en el presente documento, el término " α -SNAP-25" es sinónimo de "anti-SNAP-25" y se refiere a un anticuerpo que se une a un antígeno de SNAP-25. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un dímero, un multímero, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, anticuerpo bifuncional, un anticuerpo asociado a célula como un receptor de Ig, un anticuerpo lineal, un diacuerpo o un minicuerpo, siempre que el fragmento muestre la actividad biológica deseada, y derivados de cadena sencilla de los mismos. Un anticuerpo puede ser una molécula de inmunoglobulina de longitud completa que comprende los dominios V_H y V_L, así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y dominios constantes de cadena pesada, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}, o un fragmento inmunológicamente activo de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, tal como, por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fc, un fragmento Fd, un fragmento Fv. Un anticuerpo puede derivarse de cualquier especie de vertebrado (por ejemplo, ser humano, cabra, caballo, burro, murino, rata, conejo o gallina), y puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) o subclase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). Para una

divulgación general sobre la estructura de anticuerpos que se producen de manera natural, anticuerpos que no se producen de manera natural, y fragmentos de unión a compuestos antigénicos de los mismos, véanse, por ejemplo, Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994); Borrabeck, *Antibody Engineering*, 2ª ed. (Oxford University Press 1995), cada uno de los cuales se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad.

Anticuerpos que se producen de manera natural son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

El sitio de unión a antígeno y reconocimiento de antígeno completo está contenido dentro de los dominios variables del anticuerpo, es decir, el fragmento Fv. Este fragmento incluye un dímero de un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) en asociación no covalente, apretada. Cada dominio comprende cuatro regiones de entramado (FR), que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectada mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Cada región hipervariable comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región de determinación de complementariedad (CDR). Colectivamente, la configuración tridimensional de las seis regiones CDR que definen un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L que confiere especificidad de unión a antígeno. Véanse por ejemplo, Cyrus Chothia, *et al.*, Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions, *Nature* 342(6252): 877-883 (1989); Elvin A. Kabat, *et al* Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991), cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad. Los dominios constantes del anticuerpo no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Un antígeno diana tiene generalmente uno o más sitios de unión, también denominados epítomos, que se reconocen por el sitio de unión a antígeno formado por CDR. Tal como se usa en el presente documento, un "epítomo" es sinónimo de "determinante antigénico" y se refiere al sitio en un antígeno diana, tal como, por ejemplo, un péptido, polisacárido o molécula que contiene lípido, que puede dar unión específica a una inmunoglobulina o receptor de célula T o interaccionar de otro modo con una molécula. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítomo diferente tiene una estructura diferente. Por tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente.

Anticuerpos policlonales se refieren a una población heterogénea de moléculas de anticuerpo que contienen al menos dos especies de anticuerpo que pueden unirse a un antígeno particular. Por definición, un anticuerpo policlonal incluye dos anticuerpos diferentes que se unen a al menos dos epítomos diferentes. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" o "anticuerpos monoclonales" se refieren a una población sustancialmente homogénea de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie de anticuerpo que puede unirse a un antígeno particular es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen de manera natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Por definición, un anticuerpo monoclonal se une a un único epítomo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, en contraposición a los anticuerpos policlonales, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminar por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no ha de interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente divulgación pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al* (1975) *Nature* 256:495, o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véanse por ejemplo: patente estadounidense n.º 4.816.567; patente estadounidense n.º 5.807.715). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fago usando las técnicas descritas en Clackson *et al* (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks *et al* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597; por ejemplo.

Por tanto, en una realización, un anticuerpo α -SNAP-25 comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que se une selectivamente a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. En un aspecto de esta realización, el dominio variable de cadena pesada (V_H) es SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80 o SEQ ID NO: 82. En otro aspecto de esta realización, el dominio variable de cadena ligera (V_L) es SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 o SEQ ID NO: 92.

En otra realización, un anticuerpo α -SNAP-25 comprende una región CDR1, una región CDR2, una región CDR3 de dominio variable de cadena pesada (V_H), o cualquier combinación de las mismas que se une selectivamente a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. En un aspecto de esta realización, la región CDR1 de dominio variable de cadena pesada (V_H) es SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 120. En otro aspecto de esta realización, la región CDR2 de dominio variable de cadena pesada (V_H) es SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122 o SEQ ID NO: 123. Aún en otro aspecto de esta realización, la región CDR3 de dominio variable de cadena pesada (V_H) es SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 124.

En otra realización, un anticuerpo α -SNAP-25 comprende una región CDR1, una región CDR2, una región CDR3 de dominio variable de cadena ligera (V_L), o cualquier combinación de las mismas que se une selectivamente a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. En un aspecto de esta realización, la región CDR1 de dominio variable de cadena ligera (V_L) es SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128 o SEQ ID NO: 129. En otro aspecto de esta realización, la región CDR2 de dominio variable de cadena ligera (V_L) es SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111 o SEQ ID NO: 112. Aún en otro aspecto de esta realización, la región CDR3 de dominio variable de cadena ligera (V_L) es SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 o SEQ ID NO: 117.

Aún en otra realización, un anticuerpo α -SNAP-25 se une específicamente a un epítipo que comprende una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. En un aspecto de esta realización, el epítipo comprende SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147 o SEQ ID NO: 148. En un aspecto de esta realización, el epítipo comprende SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44.

Tal como se comentó anteriormente, la secuencia que rodea un sitio de corte de NTBo/A presente en SNAP-25 se indica como $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$, representando P_1-P_1' el enlace escindible. Tras el corte mediante NTBo/A, los productos de corte resultantes producidos comprenden un fragmento que incluye la secuencia $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1$ y un fragmento que incluye la $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos α -SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25" se refiere a anticuerpos α -SNAP-25 que se unen selectivamente a cualquier fragmento de producto de corte de SNAP-25 que comprende la secuencia $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1$, pero no a cualquier fragmento de producto de corte de SNAP-25 que comprende la secuencia $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$ o a cualquier SNAP-25 que tiene un enlace escindible P_1-P_1' intacto de un sitio de corte de NTBo/A. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo α -SNAP-25₁₉₇" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente a una SNAP-25 que tiene un residuo P_1 en el extremo carboxilo-terminal que corresponde a glutamina 197 de SEQ ID NO: 5. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo α -SNAP-25₂₀₄" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente a una SNAP-25 que tiene un residuo P_1 en el extremo carboxilo-terminal que corresponde a lisina 204 de SEQ ID NO: 16.

Tal como se usa en el presente documento, el término "selectivamente" se refiere a que tiene una influencia o un efecto único o que reacciona sólo de una manera y sólo con una cosa. Tal como se usa en el presente documento, el término "se une selectivamente a", cuando se hace en referencia a un anticuerpo, se refiere a la unión discriminatoria del anticuerpo al epítipo diana indicado de tal manera que el anticuerpo no produce sustancialmente reacción cruzada con epítipos que no son diana. El tamaño mínimo de un epítipo peptídico, tal como se define en el presente documento, es de aproximadamente cinco aminoácidos, y un epítipo peptídico comprende normalmente al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, o al menos 20 aminoácidos. Un epítipo peptídico puede ser discontinuo, es decir, comprende residuos de aminoácido que no son adyacentes en la estructura primaria del péptido pero que se ponen juntos en un epítipo por medio de la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria del péptido. Además, también se indica que un epítipo podría comprender una parte de una molécula distinta de una secuencia de aminoácidos, tal como, por ejemplo, un resto de hidrato de carbono, un resto de lípido como lipoproteínas o glicolípidos, o un resto de aminoácido modificado químicamente como un aminoácido fosforilado. En aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A que comprende al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, o al menos 20 aminoácidos. En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A que comprende como máximo 5, como máximo 6, como máximo 7, como máximo 8, como máximo 9, como máximo 10, como máximo 15, o como máximo 20 aminoácidos.

Unión selectiva incluye propiedades de unión tales como, por ejemplo, afinidad de unión, especificidad de unión y

avidez de unión. Véanse David J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, págs. 240 (1998). Afinidad de unión se refiere a la duración de tiempo que el anticuerpo reside en su sitio de unión a epítipo, y puede considerarse como la fuerza con la que un anticuerpo se une a su epítipo. Afinidad de unión puede describirse como la constante de disociación de equilibrio (KD) de un anticuerpo, que se define como la razón K_d/K_a en el equilibrio, en la que K_a es la constante de velocidad de asociación del anticuerpo y k_d es la constante de velocidad de disociación del anticuerpo. La afinidad de unión se determina mediante tanto la asociación como la disociación y solas ni una alta asociación ni una baja disociación pueden garantizar una alta afinidad. La constante de velocidad de asociación (K_a), o constante de asociación (K_{on}), mide el número de acontecimientos de unión por unidad de tiempo, o la propensión del anticuerpo y el antígeno a asociarse de manera reversible en su complejo antígeno-anticuerpo. La constante de velocidad de asociación se expresa en $M^{-1} s^{-1}$, y se simboliza de la siguiente manera: $[Ab] \times [Ag] \times K_{on}$. Cuanto mayor es la constante de velocidad de asociación, más rápidamente se une el anticuerpo a su antígeno, o mayor es la afinidad de unión entre anticuerpo y antígeno. La constante de velocidad de disociación (K_d), o constante de disociación (K_{off}), mide el número de acontecimientos de disociación por unidad de tiempo, propensión de un complejo antígeno-anticuerpo a separarse (disociarse) de manera reversible en sus moléculas componentes, concretamente el anticuerpo y el antígeno. La constante de velocidad de disociación se expresa en s^{-1} , y se simboliza de la siguiente manera: $[Ab + Ag] \times K_{off}$. Cuanto menor es la constante de velocidad de disociación, de manera más apretada está unido el anticuerpo a su antígeno, o mayor es la afinidad de unión entre anticuerpo y antígeno. La constante de disociación de equilibrio (KD) mide la velocidad a la que se forman los nuevos complejos antígeno-anticuerpo es igual a la velocidad a la que se disocian los complejos antígeno-anticuerpo en el equilibrio. La constante de disociación de equilibrio se expresa en M, y se define como $K_{off}/K_{on}=[Ab] \times [Ag]/[Ab + Ag]$, en la que $[Ab]$ es la concentración molar del anticuerpo, $[Ag]$ es la concentración molar del antígeno, y $[Ab + Ag]$ es la concentración molar del complejo antígeno-anticuerpo, cuando tales concentraciones son de tales componentes cuando el sistema está en el equilibrio. Cuanto menor es la constante de disociación de equilibrio, de manera más apretada está unido el anticuerpo a su antígeno, o mayor es la afinidad de unión entre anticuerpo y antígeno.

Por tanto, en una realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede tener una constante de velocidad de asociación de, por ejemplo, menos de $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, menos de $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, menos de $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$, o menos de $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$. En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede tener una constante de velocidad de asociación de, por ejemplo, más de $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, más de $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, más de $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$, o más de $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$. En otros aspectos, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede tener una constante de velocidad de asociación entre $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ y $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$, de $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ a $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$, de $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ a $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$, o de $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ a $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$.

En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede tener una constante de velocidad de disociación de menos de $1 \times 10^{-3} s^{-1}$, menos de $1 \times 10^{-4} s^{-1}$, o menos de $1 \times 10^{-5} s^{-1}$. En otros aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede tener una constante de velocidad de disociación de, por ejemplo, menos de $1,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $2,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $3,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $4,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $5,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $6,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $7,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $8,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, o menos de $9,0 \times 10^{-4} s^{-1}$. En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede tener una constante de velocidad de disociación de, por ejemplo, más de $1 \times 10^{-3} s^{-1}$, más de $1 \times 10^{-4} s^{-1}$, o más de $1 \times 10^{-5} s^{-1}$. En otros aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede tener una constante de velocidad de disociación de, por ejemplo, más de $1,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, más de $2,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, más de $3,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, más de $4,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, más de $5,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, más de $6,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, más de $7,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, más de $8,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, o más de $9,0 \times 10^{-4} s^{-1}$.

En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede tener una constante de disociación de equilibrio de menos de 0,500 nM. En aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede tener una constante de disociación de equilibrio de, por ejemplo, menos de 0,500 nM, menos de 0,450 nM, menos de 0,400 nM, menos de 0,350 nM, menos de 0,300 nM, menos de 0,250 nM, menos de 0,200 nM, menos de 0,150 nM, menos de 0,100 nM, o menos de 0,050 nM. En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede tener una constante de disociación de equilibrio de más de

0,500 nM. En aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede tener una constante de disociación de equilibrio de, por ejemplo, más de 0,500 nM, más de 0,450 nM, más de 0,400 nM, más de 0,350 nM, más de 0,300 nM, más de 0,250 nM, más de 0,200 nM, más de 0,150 nM, más de 0,100 nM, o más de 0,050 nM.

La afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede tener una constante de velocidad de asociación para la SNAP-25 intacta de, por ejemplo, menos de, menos de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede tener una constante de velocidad de asociación para la SNAP-25 intacta de, por ejemplo, como máximo $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o como máximo $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Especificidad de unión es la capacidad de un anticuerpo para discriminar entre una molécula que contiene su epítipo y una molécula que no contiene ese epítipo. Una manera de medir la especificidad de unión es comparar la velocidad de asociación K_{on} del anticuerpo para una molécula que contiene su epítipo con relación a la velocidad de asociación K_{on} del anticuerpo para una molécula que no contiene ese epítipo. Por ejemplo, comparar la constante de velocidad de asociación (K_a) de un anticuerpo α -SNAP-25 para un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A con relación a una SNAP-25 que no comprende ese epítipo, tal como, por ejemplo, un epítipo de SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A o un epítipo de SNAP-25 que tiene un enlace escindible P₁-P₁' intacto de un sitio de corte de NTBo/A. En aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para una SNAP-25 que no comprende su(s) epítipo(s) de, por ejemplo, menos de $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o menos de $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para una SNAP-25 que no comprende su(s) epítipo(s) de, por ejemplo, como máximo $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como máximo $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o como máximo $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Aún en aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para su epítipo con relación a una SNAP-25 que no comprende ese epítipo de, por ejemplo, al menos 2 veces más, al menos 3 veces más, al menos 4 veces más, al menos 5 veces más, al menos 6 veces más, al menos 7 veces más, al menos 8 veces más, o al menos 9 veces más. En aspectos adicionales de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para su epítipo con relación a una SNAP-25 que no comprende ese epítipo de, por ejemplo, al menos 10 veces más, al menos 100 veces más, al menos 1.000 veces más o al menos 10.000 veces más. Aún en otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para su epítipo con relación a una SNAP-25 que no comprende ese epítipo de, por ejemplo, como máximo 1 vez más, como máximo 2 veces más, como máximo 3 veces más, como máximo 4 veces más, como máximo 5 veces más, como máximo 6 veces más, como máximo 7 veces más, como máximo 8 veces más, o como máximo 9 veces más. Aún en otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A tiene una constante de velocidad de asociación (K_a) para su epítipo con relación a una SNAP-25 que no comprende ese epítipo de, por ejemplo, como máximo 10 veces más, como máximo 100 veces más, como máximo 1.000 veces más o como máximo 10.000 veces más.

La especificidad de unión de un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A también puede caracterizarse como una razón que tal anticuerpo α -SNAP-25 puede discriminar su epítipo de SNAP-25 con relación a una SNAP-25 que no comprende ese epítipo, tal como, por ejemplo, un epítipo de SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A o un epítipo de SNAP-25 que tiene un enlace escindible P₁-P₁' intacto de un sitio de corte de NTBo/A. En aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A tiene una razón de especificidad de unión para su epítipo de SNAP-25 con relación a una SNAP-25 que no comprende ese epítipo de, por ejemplo, al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al

- menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1, o al menos 40:1. Aún en otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A tiene una razón de especificidad de unión para su epítipo de SNAP-25 con relación a una SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de, por ejemplo, al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1, o al menos 40:1. Todavía en otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A tiene una razón de especificidad de unión para su epítipo de SNAP-25 con relación a una SNAP-25 que tiene una captación de enlace escindible P₁-P₁' de un sitio de corte de NTBo/A de, por ejemplo, al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1, o al menos 40:1.
- 15 Avidéz de unión, también conocida como avidéz funcional, se refiere a la suma total de la fuerza de unión funcional entre un anticuerpo multivalente y su antígeno. Las moléculas de anticuerpo pueden tener más de un sitio de unión (por ejemplo, 2 para IgG, 10 para IgM), y muchos antígenos contienen más de un sitio antigénico. Aunque la avidéz de unión de un anticuerpo depende de las afinidades de unión de los sitios de unión del anticuerpo individual, la avidéz de unión es mayor que la afinidad de unión ya que deben romperse todas las interacciones entre antígeno-anticuerpo simultáneamente para que el anticuerpo se disocie por completo. Se prevé que un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A pueda unirse selectivamente a todos y cada uno de los epítopos para ese anticuerpo.
- 25 Por tanto, en una realización, un anticuerpo α -SNAP-25 es un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. En aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 es un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene una glutamina en el extremo carboxilo-terminal o un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene una lisina en el extremo carboxilo-terminal. En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 es un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un residuo P₁ en el extremo carboxilo-terminal que corresponde a glutamina 197 de SEQ ID NO: 5 o un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un residuo P₁ en el extremo carboxilo-terminal que corresponde a lisina 204 de SEQ ID NO: 16. Todavía en otros aspectos de esta realización, un anticuerpo α -SNAP-25 es un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene una secuencia de aminoácidos en el extremo carboxilo-terminal de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147 o SEQ ID NO: 148.
- 40 Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A. Los métodos de base inmunológica dados a conocer en la presente memoria descriptiva pueden evaluarse mediante varios parámetros incluyendo, por ejemplo, exactitud, precisión, límite de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ), intervalo, especificidad, selectividad, linealidad, robustez e idoneidad del sistema. La exactitud de un método es la medida de la potencia de un método analítico, o el grado de coincidencia entre el valor medido y el valor que se acepta como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado. La precisión de un método es el grado de concordancia entre resultados de prueba individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. Como tal, la precisión evalúa 1) la variabilidad dentro del ensayo; 2) la variabilidad dentro de un día (repetibilidad); y 3) la variabilidad entre días (precisión intermedia); y 4) la variabilidad entre laboratorios (reproducibilidad). El coeficiente de variación (%CV) es una medida cuantitativa de la precisión expresada con relación al valor medio teórico u observado.
- 55 Un método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva debe poder detectar, con respecto al fondo, la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo α -SNAP-25 que comprende una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. El límite de detección (LOD) de un método se refiere a la concentración de analito que da lugar a una señal que es significativamente diferente del control negativo o blanco y representa la menor concentración de analito que puede distinguirse del fondo.
- 60 Por tanto, en una realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva puede detectar el LOD de NTBo/A una cantidad que es significativamente diferente de un control negativo o blanco. En un aspecto de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ejemplo, 10 ng o menos, 9 ng o menos, 8 ng o menos, 7 ng o menos, 6 ng o menos, 5 ng o menos, 4 ng o menos, 3 ng o menos, 2 ng o menos, 1 ng o menos de una NTBo/A. Todavía en otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ejemplo, 900 pg o menos, 800 pg o menos, 700 pg o menos, 600 pg o menos, 500 pg o

menos, 400 pg o menos, 300 pg o menos, 200 pg o menos, 100 pg o menos de una NTBo/A. En aspectos adicionales de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ejemplo, 90 pg o menos, 80 pg o menos, 70 pg o menos, 60 pg o menos, 50 pg o menos, 40 pg o menos, 30 pg o menos, 20 pg o menos, 10 pg o menos de una NTBo/A. En otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ejemplo, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una NTBo/A. Aún en otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ejemplo, 0,9 pg o menos, 0,8 pg o menos, 0,7 pg o menos, 0,6 pg o menos, 0,5 pg o menos, 0,4 pg o menos, 0,3 pg o menos, 0,2 pg o menos, 0,1 pg o menos de una NTBo/A.

En otro aspecto de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ejemplo, 10 nM o menos o menos, 9 nM o menos, 8 nM o menos, 7 nM o menos, 6 nM o menos, 5 nM o menos, 4 nM o menos, 3 nM o menos, 2 nM o menos, o 1 nM o menos de una NTBo/A. En otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ejemplo, 900 pM o menos, 800 pM o menos, 700 pM o menos, 600 pM o menos, 500 pM o menos, 400 pM o menos, 300 pM o menos, 200 pM o menos, o 100 pM o menos de una NTBo/A. En otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ejemplo, 100 pM o menos, 90 pM o menos, 80 pM o menos, 70 pM o menos, 60 pM o menos, 50 pM o menos, 40 pM o menos, 30 pM o menos, 20 pM o menos, o 10 pM o menos de una NTBo/A. Aún en otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ejemplo, 10 pM o menos de una NTBo/A, 9 pM o menos, 8 pM o menos, 7 pM o menos, 6 pM o menos, 5 pM o menos, 4 pM o menos, 3 pM o menos, 2 pM o menos, o 1 pM o menos de una NTBo/A. Todavía en otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ejemplo, 1000 fM o menos, 900 fM o menos, 800 fM o menos, 700 fM o menos, 600 fM o menos, 500 fM o menos, 400 fM o menos, 300 fM o menos, 200 fM o menos, o 100 fM o menos de una NTBo/A. Todavía en otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ejemplo, 100 fM o menos, 90 fM o menos, 80 fM o menos, 70 fM o menos, 60 fM o menos, 50 fM o menos, 40 fM o menos, 30 fM o menos, 20 fM o menos, o 10 fM o menos de una NTBo/A. Todavía en otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ejemplo, 10 fM o menos, 9 fM o menos, 8 fM o menos, 7 fM o menos, 6 fM o menos, 5 fM o menos, 4 fM o menos, 3 fM o menos, 2 fM o menos, o 1 fM o menos de a neurotoxina botulínica A.

Los límites de cuantificación (LOQ) son las concentraciones menor y mayor de analito en una muestra o espécimen que puede medirse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. El límite de cuantificación inferior se refiere a la menor dosis que puede medir un método de detección sistemáticamente con respecto al fondo. El límite de cuantificación superior es la mayor dosis que puede medir un método de detección sistemáticamente antes de que se produzca la saturación de la señal. El intervalo lineal del método es el área entre los límites de cuantificación inferior y superior. El intervalo lineal se calcula restando el límite de cuantificación inferior del límite de cuantificación superior. Tal como se usa en el presente documento, el término "relación señal-ruido para la asíntota inferior" se refiere a la señal detectada en el método en el límite de detección inferior dividido entre la señal del fondo. Tal como se usa en el presente documento, el término "relación señal-ruido para la asíntota superior" se refiere a la señal detectada en el método en el límite de detección superior dividido entre la señal del fondo.

Por tanto, en una realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva puede detectar el LOQ de NTBo/A a una cantidad que es significativamente diferente de un control negativo o blanco. En un aspecto de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ejemplo, 10 ng o menos, 9 ng o menos, 8 ng o menos, 7 ng o menos, 6 ng o menos, 5 ng o menos, 4 ng o menos, 3 ng o menos, 2 ng o menos, 1 ng o menos de una NTBo/A. Todavía en otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ejemplo, 900 pg o menos, 800 pg o menos, 700 pg o menos, 600 pg o menos, 500 pg o menos, 400 pg o menos, 300 pg o menos, 200 pg o menos, 100 pg o menos de una NTBo/A. En aspectos adicionales de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ejemplo, 90 pg o menos, 80 pg o menos, 70 pg o menos, 60 pg o menos, 50 pg o menos, 40 pg o menos, 30 pg o menos, 20 pg o menos, 10 pg o menos de una NTBo/A. En otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ejemplo, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una NTBo/A. Aún en otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ejemplo, 0,9 pg o menos, 0,8 pg o menos, 0,7 pg o menos, 0,6 pg o menos, 0,5 pg o menos, 0,4 pg o menos, 0,3 pg o menos, 0,2 pg o menos, 0,1 pg o menos de una NTBo/A.

En otro aspecto de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ejemplo, 10 nM o menos, 9 nM o menos, 8 nM o menos, 7 nM o menos, 6 nM o menos, 5 nM o menos, 4 nM o menos, 3 nM o menos, 2 nM o menos, o 1 nM o menos de una NTBo/A. En otros

- aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ejemplo, 900 pM o menos, 800 pM o menos, 700 pM o menos, 600 pM o menos, 500 pM o menos, 400 pM o menos, 300 pM o menos, 200 pM o menos, o 100 pM o menos de una NTBo/A. En otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ejemplo, 100 pM o menos, 90 pM o menos, 80 pM o menos, 70 pM o menos, 60 pM o menos, 50 pM o menos, 40 pM o menos, 30 pM o menos, 20 pM o menos, o 10 pM o menos de una NTBo/A. Aún en otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ejemplo, 10 pM o menos de una NTBo/A, 9 pM o menos, 8 pM o menos, 7 pM o menos, 6 pM o menos, 5 pM o menos, 4 pM o menos, 3 pM o menos, 2 pM o menos, o 1 pM o menos de una NTBo/A. Todavía en otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ejemplo, 1000 fM o menos, 900 fM o menos, 800 fM o menos, 700 fM o menos, 600 fM o menos, 500 fM o menos, 400 fM o menos, 300 fM o menos, 200 fM o menos, o 100 fM o menos de una NTBo/A. Todavía en otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ejemplo, 100 fM o menos, 90 fM o menos, 80 fM o menos, 70 fM o menos, 60 fM o menos, 50 fM o menos, 40 fM o menos, 30 fM o menos, 20 fM o menos, o 10 fM o menos de una NTBo/A. Todavía en otros aspectos de esta realización, el método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ejemplo, 10 fM o menos, 9 fM o menos, 8 fM o menos, 7 fM o menos, 6 fM o menos, 5 fM o menos, 4 fM o menos, 3 fM o menos, 2 fM o menos, o 1 fM o menos de una NTBo/A.
- Un ensayo de base inmunológica útil para poner en práctica un aspecto de los métodos dados a conocer debe tener una precisión de no más del 50%. En aspectos de esta realización, un ensayo de base inmunológica tiene una precisión de no más del 50%, no más del 40%, no más del 30%, o no más del 20%. En otros aspectos de esta realización, un ensayo de base inmunológica tiene una precisión de no más del 15%, no más del 10%, o no más del 5%. En otros aspectos de esta realización, un ensayo de base inmunológica tiene una precisión de no más del 4%, no más del 3%, no más del 2%, o no más del 1%.
- Un ensayo de base inmunológica útil para poner en práctica un aspecto de los métodos dados a conocer debe tener una exactitud de al menos el 50%. En aspectos de esta realización, un ensayo de base inmunológica tiene una exactitud de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, o al menos el 80%. En otros aspectos de esta realización, un ensayo de base inmunológica tiene una exactitud de al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95%. En otros aspectos de esta realización, un ensayo de base inmunológica tiene una exactitud de al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99%.
- Un método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva debe tener una relación señal-ruido para la asíntota inferior que es estadísticamente significativa y una relación señal-ruido para la asíntota superior que es estadísticamente significativa. En aspectos de esta realización, un método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva tiene una relación señal-ruido para la asíntota inferior de, por ejemplo, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1 o al menos 20:1. En otros aspectos de esta realización, un método de base inmunológica tiene una relación señal-ruido para la asíntota superior de, por ejemplo, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1, al menos 40:1, al menos 45:1, al menos 50:1, al menos 60:1, al menos 70:1, al menos 80:1, al menos 90:1, o al menos 100:1, al menos 150:1, al menos 200:1, al menos 250:1, al menos 300:1, al menos 350:1, al menos 400:1, al menos 450:1, al menos 500:1, al menos 550:1, o al menos 600:1.
- La especificidad de un método define la capacidad del método para medir el analito de interés en exclusión de otros componentes relevantes, tales como, por ejemplo, analito parcialmente activo o inactivo. La selectividad de un método describe la capacidad de un método analítico para diferenciar diversas sustancias en una muestra. La linealidad de un método es su capacidad para provocar resultados que son directamente, o mediante una transformación matemática bien definida, proporcionales a la concentración de analito en la muestra. Por tanto en una realización, un método de base inmunológica dado a conocer en la presente memoria descriptiva puede distinguir una NTBo/A totalmente activa de una NTBo/A parcialmente activa que tiene, por ejemplo, el 70% o menos, el 60% o menos, el 50% o menos, el 40% o menos, el 30% o menos, el 20% o menos, o el 10% o menos de la actividad de una NTBo/A totalmente activa.
- La reproducibilidad del método es la reproducibilidad de los resultados de prueba obtenidos para muestras idénticas en condiciones de prueba normales (pero variables). La robustez de un procedimiento es una medida de su capacidad para permanecer inafectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su fiabilidad en el uso normal. Por tanto, mientras que la reproducibilidad evalúa cambios inevitables, la robustez evalúa cambios deliberados. Los parámetros típicos evaluados mediante la reproducibilidad y la robustez incluyen los efectos de congelación/descongelación, tiempos de incubación, temperatura de incubación, longevidad del reactivo, preparación de muestras, almacenamiento de muestras, número de pases celulares, lotes de toxina, variabilidad entre purificaciones y variabilidad entre reacciones de mellado. Los parámetros de robustez para ensayos basados en células incluyen el banco de células (comienzo, parte intermedia y final de la congelación), nivel de pase celular, densidad de siembra de células, densidad de disolución madre celular (cuántos días en cultivo), edad de las células en el matraz (tiempo de espera hasta la siembra), tiempo de incubación, diferentes placas, cantidades en exceso de suero y fuente de reactivos. La idoneidad del sistema del

método es la determinación del rendimiento del ensayo, incluyendo el rendimiento de reactivos e instrumentos, a lo largo del tiempo mediante análisis de un patrón de referencia. Se hace hincapié en la idoneidad del sistema en la orientación de la FDA referente al hecho de que el equipo, la electrónica, el rendimiento del ensayo y las muestras que van a analizarse, constituyen un sistema integrado. La idoneidad del sistema puede evaluarse mediante pruebas para establecer un paralelismo, que es cuando al representar gráficamente el log de dosis frente a la respuesta, diluciones en serie de la referencia y diluciones en serie de las muestras deben dar lugar a curvas paralelas.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una célula de una línea celular establecida. Tal como se usa en el presente documento, el término "célula" se refiere a cualquier célula eucariota susceptible de intoxicación por NTBo/A mediante una NTBo/A o cualquier célula eucariota que puede captar una NTBo/A. El término célula engloba células de una variedad de organismos, tales como, por ejemplo, células murinas, de rata, porcinas, bovinas, equinas, de primates y humanas; de una variedad de tipos de célula tales como, por ejemplo, neuronales y no neuronales; y pueden aislarse de o parte de una población de células heterogéneas, tejido u organismo. Tal como se usa en el presente documento, el término "línea celular establecida" es sinónimo de "línea celular inmortal", o "línea celular transformada" y se refiere a un cultivo celular de células seleccionadas por propagación indefinida a partir de una población celular derivada de una fuente de órgano, tejido u organismo. Por definición, una línea celular establecida excluye un cultivo celular de células primarias. Tal como se usa en el presente documento, el término "células primarias" son células recogidas directamente de órganos o tejidos frescos y no tienen el potencial de propagarse indefinidamente. Una línea celular establecida puede comprender una población heterogénea de células o una población uniforme de células. Una línea celular establecida derivada de una única célula se denomina una línea celular clonal. Una línea celular establecida puede ser una cuyas células expresan de manera endógena todos los componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una NTBo/A corta de manera proteolítica un sustrato de SNAP-25 y engloba la unión de una NTBo/A a un receptor de NTBo/A, la internalización del complejo neurotoxina/receptor, la translocación de la cadena ligera de NTBo/A desde una vesícula intracelular en el citoplasma y el corte proteolítico de una SNAP-25. Alternativamente, una línea celular establecida puede ser una a cuyas células se les había introducido a partir de una fuente exógena al menos un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una NTBo/A corta de manera proteolítica un sustrato de SNAP-25 y engloba la unión de una NTBo/A a un receptor de NTBo/A, la internalización del complejo neurotoxina/receptor, la translocación de la cadena ligera de NTBo/A desde una vesícula intracelular en el citoplasma y el corte proteolítico de una SNAP-25. También denominada una línea celular modificada mediante ingeniería genética, las células de una línea celular establecida de este tipo pueden expresar, por ejemplo, un FGFR2 exógeno, un FGFR3 exógeno, una SV2 exógena, una SNAP-25 exógena, o cualquier combinación de los mismos.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una célula de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A. Tal como se usa en el presente documento, los términos "célula(s) susceptible(s) de intoxicación por NTBo/A", "célula(s) susceptible(s) de intoxicación por NTBo/A mediante una NTBo/A", o "célula(s) de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A mediante una NTBo/A" se refieren a célula(s) que puede(n) experimentar el mecanismo celular global mediante el cual una NTBo/A corta de manera proteolítica un sustrato de SNAP-25 y engloba la unión de una NTBo/A a un receptor de NTBo/A, la internalización del complejo neurotoxina/receptor, la translocación de la cadena ligera de NTBo/A desde una vesícula intracelular en el citoplasma y el corte proteolítico de una SNAP-25. Por definición, célula(s) susceptible(s) de intoxicación por NTBo/A debe(n) expresar, o modificarse mediante ingeniería genética para expresar, al menos un receptor de NTBo/A y al menos un sustrato de SNAP-25. Tal como se usa en el presente documento, los términos "célula(s) que puede(n) captar NTBo/A" o "célula(s) que comprende(n) una línea celular establecida que puede(n) captar NTBo/A" se refieren a células que pueden experimentar el mecanismo celular global mediante el cual una NTBo/A corta de manera proteolítica un sustrato de SNAP-25 y engloba la unión de una NTBo/A a un receptor de NTBo/A, la internalización del complejo neurotoxina/receptor, la translocación de la cadena ligera de NTBo/A desde una vesícula intracelular en el citoplasma y el corte proteolítico de una SNAP-25. Por definición, célula(s) que puede(n) captar NTBo/A debe(n) expresar, o modificarse mediante ingeniería genética para expresar, al menos un receptor de NTBo/A y al menos un sustrato de SNAP-25.

Las células de la invención de una línea celular establecida son susceptibles de intoxicación por NTBo/A. Las células de una línea celular establecida son susceptibles de intoxicación por NTBo/A mediante, aproximadamente 500 pM o menos, aproximadamente 400 pM o menos, aproximadamente 300 pM o menos, aproximadamente 200 pM o menos, o aproximadamente 100 pM o menos de una NTBo/A. En otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida son susceptibles de intoxicación por NTBo/A mediante, por ejemplo, aproximadamente 90 pM o menos, aproximadamente 80 pM o menos, aproximadamente 70 pM o menos, aproximadamente 60 pM o menos, aproximadamente 50 pM o menos, aproximadamente 40 pM o menos, aproximadamente 30 pM o menos, aproximadamente 20 pM o menos, o aproximadamente 10 pM o menos de una NTBo/A. Todavía en otros aspectos, células de una línea celular establecida son susceptibles de intoxicación por NTBo/A mediante, por ejemplo, aproximadamente 9 pM o menos, aproximadamente 8 pM o menos, aproximadamente 7 pM o menos, aproximadamente 6 pM o menos, aproximadamente 5 pM o menos, aproximadamente 4 pM o menos, aproximadamente 3 pM o menos, aproximadamente 2 pM o menos, o aproximadamente 1 pM o menos de una NTBo/A. Aún en otros aspectos, células de una línea celular establecida son susceptibles de intoxicación por

NTBo/A mediante, por ejemplo, aproximadamente 0,9 pM o menos, aproximadamente 0,8 pM o menos, aproximadamente 0,7 pM o menos, aproximadamente 0,6 pM o menos, aproximadamente 0,5 pM o menos, aproximadamente 0,4 pM o menos, aproximadamente 0,3 pM o menos, aproximadamente 0,2 pM, o aproximadamente 0,1 pM o menos de una NTBo/A. Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” cuando califica un valor de un elemento, número, porcentaje o término establecido se refiere a un intervalo de más o menos el diez por ciento del valor del elemento, porcentaje, parámetro o término establecido.

En otra realización, células que comprenden una línea celular establecida pueden captar una NTBo/A. En aspectos de esta realización, células que comprenden una línea celular establecida pueden captar, por ejemplo, aproximadamente 500 pM o menos, aproximadamente 400 pM o menos, aproximadamente 300 pM o menos, aproximadamente 200 pM o menos, o aproximadamente 100 pM o menos de una NTBo/A. En otros aspectos de esta realización, células que comprenden una línea celular establecida presentan la capacidad para captar aproximadamente 90 pM o menos, aproximadamente 80 pM o menos, aproximadamente 70 pM o menos, aproximadamente 60 pM o menos, aproximadamente 50 pM o menos, aproximadamente 40 pM o menos, aproximadamente 30 pM o menos, aproximadamente 20 pM o menos, o aproximadamente 10 pM o menos de una NTBo/A. Todavía en otros aspectos, células que comprenden una línea celular establecida presentan la capacidad para captar aproximadamente 9 pM o menos, aproximadamente 8 pM o menos, aproximadamente 7 pM o menos, aproximadamente 6 pM o menos, aproximadamente 5 pM o menos, aproximadamente 4 pM o menos, aproximadamente 3 pM o menos, aproximadamente 2 pM o menos, o aproximadamente 1 pM o menos de una NTBo/A. Aún en otros aspectos, células que comprenden una línea celular establecida presentan la capacidad para captar aproximadamente 0,9 pM o menos, aproximadamente 0,8 pM o menos, aproximadamente 0,7 pM o menos, aproximadamente 0,6 pM o menos, aproximadamente 0,5 pM o menos, aproximadamente 0,4 pM o menos, aproximadamente 0,3 pM o menos, aproximadamente 0,2 pM o menos, o aproximadamente 0,1 pM o menos de una NTBo/A.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una NTBo/A. Tal como se usa en el presente documento, el término “NTBo/A” es sinónimo de “neurotoxina botulínica serotipo A” o “neurotoxina botulínica tipo A” y se refiere tanto a una NTBo/A que se produce de manera natural como a una NTBo/A que no se produce de manera natural de la misma, e incluye complejo de NTBo/A que comprende la neurotoxina NTBo/A de aproximadamente 150 kDa y proteínas no asociadas a toxina asociadas (NAP), así como la neurotoxina NTBo/A de aproximadamente 150 kDa sola. Los ejemplos no limitativos de complejos de NTBo/A incluyen, por ejemplo, el complejo de NTBo/A de 900 kDa, el complejo de NTBo/A de 500 kDa, el complejo de NTBo/A de 300 kDa. Los ejemplos no limitativos de la neurotoxina NTBo/A de aproximadamente 150 kDa incluyen, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4.

Tal como se usa en el presente documento, el término “NTBo/A que se produce de manera natural” se refiere a cualquier NTBo/A producida mediante un proceso que se produce de manera natural, incluyendo, sin limitación, isoformas de NTBo/A producidas a partir de una modificación postraducciona, un transcrito sometido a corte y empalme de manera alternativa o una mutación espontánea, y subtipos de NTBo/A, tales como, por ejemplo, un subtipo NTBo/A1, subtipo NTBo/A2, subtipo NTBo/A3, subtipo NTBo/A4 y subtipo NTBo/A5. Una NTBo/A que se produce de manera natural incluye, sin limitación, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, o una que sustituye, deleciona o añade, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Composiciones farmacéuticas disponibles comercialmente de una NTBo/A que se produce de manera natural incluyen, sin limitación, BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN®, (Ipsen Ltd., Slough, Inglaterra), PURTOX® (Mentor Corp., Santa Barbara, CA), XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Alemania), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, Corea del Sur), BTX-A.

Tal como se usa en el presente documento, el término “NTBo/A que no se produce de manera natural” se refiere a cualquier NTBo/A cuya estructura se modificó con la ayuda de manipulación humana, incluyendo, sin limitación, una NTBo/A con una secuencia de aminoácidos alterada producida mediante ingeniería genética usando mutagénesis al azar o diseño racional y una NTBo/A producida mediante síntesis química *in vitro*. Los ejemplos no limitativos de NTBo/A que no se producen de manera natural se describen en, por ejemplo, Steward, L. E. *et al.*, Post-translational Modifications and Clostridial Neurotoxins, patente estadounidense 7.223.577; Dolly, J. O. *et al.*, Activatable Clostridial Toxins, patente estadounidense n.º 7.419.676; Steward, L. E. *et al.*, Clostridial Neurotoxin Compositions and Modified Clostridial Neurotoxins, US 2004/0220386; Steward, L. E. *et al.*, Modified Clostridial Toxins With Enhanced Targeting Capabilities For Endogenous Clostridial Toxin Receptor Systems, publicación de patente estadounidense n.º 2008/0096248; Steward, L. E. *et al.*, Modified Clostridial Toxins With Altered Targeting Capabilities For Clostridial Toxin Target Cells, publicación de patente estadounidense n.º 2008/0161543; Steward, L. E. *et al.*, Modified Clostridial Toxins With Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells, publicación de patente estadounidense n.º 2008/0241881, cada una de las cuales se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad.

Por tanto en una realización, la actividad de NTBo/A que está detectándose procede de una NTBo/A que se produce de manera natural. En aspectos de esta realización, la actividad de NTBo/A que está detectándose procede de una

isoforma de NTBo/A o un subtipo de NTBo/A. En aspectos de esta realización, la actividad de NTBo/A que está detectándose procede de la NTBo/A de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En otros aspectos de esta realización, la actividad de NTBo/A que está detectándose procede de una NTBo/A que tiene, por ejemplo, una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En otros aspectos de esta realización, la actividad de NTBo/A que está detectándose procede de BOTOX®, DYSPORT®/RELOXIN®, PURTOX®, XEOMIN®, NEURONOX®, o BTX-A.

En otra realización, la actividad de NTBo/A que está detectándose procede de una NTBo/A que no se produce de manera natural. En otros aspectos de esta realización, la actividad de NTBo/A que está detectándose procede de una variante de NTBo/A que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En otros aspectos de esta realización, la actividad de NTBo/A que está detectándose procede de una variante de NTBo/A que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con relación a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Aún en otros aspectos de esta realización, la actividad de NTBo/A que está detectándose procede de una variante de NTBo/A que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos contiguos con relación a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una SNAP-25. Tal como se usa en el presente documento, el término "SNAP-25" se refiere a una SNAP-25 que se produce de manera natural o una SNAP-25 que no se produce de manera natural que se corta preferentemente mediante una NTBo/A. Tal como se usa en el presente documento, el término "cortado preferentemente" se refiere a que la tasa de corte de sustrato de NTBo/A por una NTBo/A es al menos un orden de magnitud mayor que la tasa de corte de cualquier otro sustrato por NTBo/A. En aspectos de esta realización, la tasa de corte de sustrato de NTBo/A por una NTBo/A es al menos dos órdenes de magnitud mayor, al menos tres órdenes de magnitud mayor, al menos cuatro órdenes de magnitud mayor, o al menos cinco órdenes de magnitud mayor que la de la tasa de corte de cualquier otro sustrato por NTBo/A.

Tal como se usa en el presente documento, el término "SNAP-25 que se produce de manera natural" se refiere a cualquier SNAP-25 producida mediante un proceso que se produce de manera natural, incluyendo, sin limitación, isoformas de SNAP-25 producidas a partir de una modificación postraduccional, un transcrito sometido a corte y empalme de manera alternativa o una mutación espontánea, y subtipos de SNAP-25. Una SNAP-25 que se produce de manera natural incluye, sin limitación, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24, o una que sustituye, deleciona o añade, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

Tal como se usa en el presente documento, el término "SNAP-25 que no se produce de manera natural" se refiere a cualquier SNAP-25 cuya estructura se modificó con la ayuda de manipulación humana, incluyendo, sin limitación, una SNAP-25 producida mediante ingeniería genética usando mutagénesis al azar o diseño racional y una SNAP-25 producida mediante síntesis química *in vitro*. Los ejemplos no limitativos de SNAP-25 que no se producen de manera natural se describen en, por ejemplo, Steward, L. E. *et al.*, FRET Protease Assays for Clostridial Toxins, patente estadounidense 7.332.567; Fernandez-Salas *et al.*, Lipophilic Dye-based FRET Assays for Clostridial Toxin Activity, publicación de patente estadounidense 2008/0160561, cada una de las cuales se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad. Una SNAP-25 que no se produce de manera natural puede sustituir, deleccionar o añadir, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

Por tanto en una realización, una SNAP-25 es una SNAP-25 que se produce de manera natural. En aspectos de esta realización, la SNAP-25 es una isoforma de SNAP-25 o un subtipo de SNAP-25. En aspectos de esta realización, la SNAP-25 que se produce de manera natural es la SNAP-25 que se produce de manera natural de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta realización, la SNAP-25 es una SNAP-25 que se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, una

identidad de aminoácidos de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o una identidad de aminoácidos de al menos el 95% con SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

En otra realización, una SNAP-25 es una SNAP-25 que no se produce de manera natural. En otros aspectos de esta realización, la SNAP-25 es una SNAP-25 que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En otros aspectos de esta realización, la SNAP-25 es una SNAP-25 que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con relación a SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24. Aún en otros aspectos de esta realización, la SNAP-25 es una SNAP-25 que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos contiguos con relación a SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

Una SNAP-25 puede ser una SNAP-25 endógena o una SNAP-25 exógena. Tal como se usa en el presente documento, el término "SNAP-25 endógena" se refiere a una SNAP-25 presente de manera natural en la célula porque está codificada de manera natural dentro del genoma de la célula, de tal manera que la célula expresa inherentemente la SNAP-25 sin la necesidad de una fuente externa de SNAP-25 o una fuente externa de material genético que codifica para una SNAP-25. La expresión de una SNAP-25 endógena puede ser con o sin estimulación ambiental tal como, por ejemplo, diferenciación celular. Por definición, una SNAP-25 endógena puede ser sólo una SNAP-25 que se produce de manera natural o variantes de la misma. Por ejemplo, las siguientes líneas celulares establecidas expresan una SNAP-25 endógena: BE(2)-M17, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa y SK-N-BE(2)-C.

Tal como se usa en el presente documento, el término "SNAP-25 exógena" se refiere a una SNAP-25 expresada en una célula a través de la introducción de una fuente externa de SNAP-25 o una fuente externa de material genético que codifica para una SNAP-25 mediante manipulación humana. La expresión de una SNAP-25 exógena puede ser con o sin estimulación ambiental tal como, por ejemplo, diferenciación celular. Como ejemplo no limitativo, células de una línea celular establecida pueden expresar una SNAP-25 exógena mediante transfección transitoria o de manera estable de una SNAP-25. Como otro ejemplo no limitativo, células de una línea celular establecida pueden expresar una SNAP-25 exógena mediante transfección de proteína de una SNAP-25. Una SNAP-25 exógena puede ser una SNAP-25 que se produce de manera natural o variantes de la misma, o una SNAP-25 que no se produce de manera natural o variantes de la misma.

Por tanto en una realización, células de una línea celular establecida expresan una SNAP-25 endógena. En aspectos de esta realización, la SNAP-25 endógena expresada por células de una línea celular establecida es una SNAP-25 que se produce de manera natural. En otros aspectos de esta realización, la SNAP-25 endógena expresada por células de una línea celular establecida es SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24. Aún en aspectos de esta realización, la SNAP-25 endógena expresada por células de una línea celular establecida es una SNAP-25 que se produce de manera natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de SNAP-25 o un subtipo de SNAP-25. En otros aspectos de esta realización, la SNAP-25 endógena expresada por células de una línea celular establecida es una SNAP-25 que se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o una identidad de aminoácidos de al menos el 95% con SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

En otra realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar una SNAP-25 exógena. En un aspecto de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar una SNAP-25 que se produce de manera natural. En otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar la SNAP-25 que se produce de manera natural de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID

NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24. Aún en otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar una SNAP-25 que se produce de manera natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de SNAP-25 o un subtipo de SNAP-25. Todavía en otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar una SNAP-25 que se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o una identidad de aminoácidos de al menos el 95% con SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

En otro aspecto de la realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar una SNAP-25 que no se produce de manera natural. En otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar una SNAP-25 que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% con SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar una SNAP-25 que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con relación a SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24. Aún en otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar una SNAP-25 que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos contiguos con relación a SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

Pueden usarse ensayos que detectan el corte de un sustrato de NTBo/A tras la exposición a una NTBo/A para evaluar si una célula está expresando una SNAP-25 endógena o exógena. En estos ensayos, la generación de un producto de corte de SNAP-25 se detectaría en células que expresan una SNAP-25 tras tratamiento con NTBo/A. Los ejemplos no limitativos de análisis de inmunotransferencia de tipo Western específico, así como reactivos, condiciones y protocolos bien caracterizados están fácilmente disponibles de proveedores comerciales que incluyen, sin limitación, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI, y Stratagene, Inc., La Jolla, CA. Se entiende que estos ensayos y similares para detectar el corte de SNAP-25 pueden ser útiles en la identificación de células que expresan una SNAP-25 endógena o una exógena.

Como los ejemplos no limitativos, puede usarse análisis de inmunotransferencia de tipo Western que usa un anticuerpo que reconoce producto cortado de SNAP-25 por NTBo/A o las formas tanto cortadas como no cortadas de SNAP-25 para someter a ensayo la captación de NTBo/A. Los ejemplos de anticuerpos α -SNAP-25 útiles para estos ensayos incluyen, sin limitación, anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 Cl 71.1 (Synaptic Systems, Gotinga, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 Cl 71.2 (Synaptic Systems, Gotinga, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 SP12 (Abcam, Cambridge, MA), antisuero policlonal de conejo α -SNAP-25 (Synaptic Systems, Gotinga, Alemania), antisuero policlonal de conejo α -SNAP-25 (Abcam, Cambridge, MA), y antisuero policlonal de conejo α -SNAP-25 S9684 (Sigma, San Luis, MO).

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un receptor de NTBo/A. Tal como se usa en el presente documento, el término "receptor de NTBo/A" se refiere o bien a un receptor de NTBo/A que se produce de manera natural o bien a un receptor de NTBo/A que no se produce de manera natural que interacciona preferentemente con NTBo/A de manera que provoca una respuesta de intoxicación por NTBo/A. Tal como se usa en el presente documento, el término "interacciona preferentemente" se refiere a que la constante de disociación de equilibrio (KD) de NTBo/A para un receptor de NTBo/A es al menos un orden de magnitud inferior a la de NTBo/A para cualquier otro receptor en la superficie celular. La constante de disociación de equilibrio, un tipo específico de constante de equilibrio que mide la propensión de un complejo NTBo/A-receptor de NTBo/A separarse (disociarse) de manera reversible en sus moléculas componentes, concretamente la NTBo/A y el receptor de NTBo/A, se define como

KD=Ka/Kd en el equilibrio. La constante de asociación (Ka) se define como $Ka=[C]/[L][R]$ y la constante de disociación (Kd) se define como $Kd=[L][R]/[C]$, en la que [L] es igual a la concentración molar de NTBo/A, [R] es la concentración molar de un receptor de NTBo/A y [C] es la concentración molar del complejo de NTBo/a-receptor de NTBo/A, y en la que todas las concentraciones son de tales componentes cuando el sistema está en el equilibrio.

5 Cuanto menor es la constante de disociación, de manera más apretada está unida la NTBo/A su receptor, o mayor es la afinidad de unión entre la NTBo/A y el receptor de NTBo/A. En aspectos de esta realización, la constante de disociación de NTBo/A para un receptor de NTBo/A es al menos dos órdenes de magnitud inferior, al menos tres órdenes de magnitud inferior, al menos cuatro órdenes de magnitud inferior, o al menos cinco órdenes de magnitud inferior a la de NTBo/A para cualquier otro receptor. En otros aspectos de esta realización, la afinidad de unión de una NTBo/A que interacciona preferentemente con un receptor de NTBo/A puede tener una constante de disociación de equilibrio (KD) de, por ejemplo, de 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM, o menos 100 nM o menos. En otros aspectos de esta realización, la afinidad de unión de una NTBo/A que interacciona preferentemente con un receptor de NTBo/A puede tener una constante de disociación de equilibrio (KD) de, por ejemplo, de 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM, o menos 10 nM o menos. Tal como se usa en el presente documento, el término "provoca una respuesta de intoxicación por NTBo/A" se refiere a la capacidad de un receptor de NTBo/A para interaccionar con una NTBo/A para formar un complejo neurotoxina/receptor y la posterior internalización de ese complejo en el citoplasma de la célula.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "receptor de NTBo/A que se produce de manera natural" se refiere a cualquier receptor de NTBo/A producido mediante un proceso que se produce de manera natural, incluyendo, sin limitación, isoformas de receptor de NTBo/A producidos a partir de una modificación postraduccional, un transcrito sometido a corte y empalme de manera alternativa o una mutación espontánea, y subtipos de receptor de NTBo/A. Un receptor de NTBo/A que se produce de manera natural incluye, sin limitación, un receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2), un receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3), una glicoproteína de vesícula sináptica 2 (SV2), y un gangliósido complejo como GT1b, tales como los descritos en Ester Fernandez-Salas, *et al.*, Botulinum Toxin Screening Assays, publicación de patente estadounidense 2008/0003240; Ester Fernandez-Salas, *et al.*, Botulinum Toxin Screening Assays, publicación de patente estadounidense 2008/0182799; Min Dong *et al.*, SV2 is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A, Science (2006); S. Mahrhold *et al.*, The Synaptic Vesicle Protein 2C Mediates the Uptake of Botulinum Neurotoxin A into Phrenic Nerves, 580(8) FEBS Lett. 2011-2014 (2006), cada uno de los cuales se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad. Un FGFR2 que se produce de manera natural incluye, sin limitación, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70, o uno que sustituye, deletiona o añade, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70. Un FGFR3 que se produce de manera natural incluye, sin limitación, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27, o uno que sustituye, deletiona o añade, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27. Una SV2 que se produce de manera natural incluye, sin limitación, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31, o una que sustituye, deletiona o añade, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31.

Tal como se usa en el presente documento, el término "variante de receptor de NTBo/A que no se produce de manera natural" se refiere a cualquier receptor de NTBo/A producido con la ayuda de manipulación o diseño humano, incluyendo, sin limitación, un receptor de NTBo/A producido mediante ingeniería genética usando mutagénesis al azar o diseño racional y un receptor de NTBo/A producido mediante síntesis química. Los ejemplos no limitativos de variantes de NTBo/A que no se producen de manera natural incluyen, por ejemplo, variantes de receptor de NTBo/A conservativas, variantes de receptor de NTBo/A no conservativas, variantes quiméricas de receptor de NTBo/A y fragmentos de receptor de NTBo/A activos.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término "receptor de NTBo/A que no se produce de manera natural" se refiere a cualquier receptor de NTBo/A cuya estructura se modificó con la ayuda de manipulación humana, incluyendo, sin limitación, un receptor de NTBo/A producido mediante ingeniería genética usando mutagénesis al azar o diseño racional y un receptor de NTBo/A producido mediante síntesis química *in vitro*. Los ejemplos no limitativos de receptores de NTBo/A que no se producen de manera natural se describen en, por ejemplo, Ester Fernandez-Salas, *et al.*, Botulinum Toxin Screening Assays, publicación de patente estadounidense 2008/0003240; Ester Fernandez-Salas, *et al.*, Botulinum Toxin Screening Assays, publicación de patente estadounidense 2008/0182799 Un receptor de NTBo/A que no se produce de manera natural puede sustituir, deletionar o añadir, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID

NO: 69 o SEQ ID NO: 70.

Por tanto en una realización, un receptor de NTBo/A es un receptor de NTBo/A que se produce de manera natural tal como, por ejemplo, FGFR2, FGFR3 o SV2. En aspectos de esta realización, el receptor de NTBo/A es una isoforma de receptor de NTBo/A o un subtipo de receptor de NTBo/A. En aspectos de esta realización, el receptor de NTBo/A que se produce de manera natural es el receptor de NTBo/A que se produce de manera natural de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 70. En otros aspectos de esta realización, el receptor de NTBo/A es un receptor de NTBo/A que se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o una identidad de aminoácidos de al menos el 95% con SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 70.

En otra realización, un receptor de NTBo/A es un receptor de NTBo/A que no se produce de manera natural, tal como, por ejemplo, un FGFR2 modificado mediante ingeniería genética, un FGFR3 modificado mediante ingeniería genética o una SV2 modificada mediante ingeniería genética. En otros aspectos de esta realización, el receptor de NTBo/A es un receptor de NTBo/A que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% con SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 70. En otros aspectos de esta realización, el receptor de NTBo/A es un receptor de NTBo/A que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con relación a SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 70. Aún en otros aspectos de esta realización, el receptor de NTBo/A es un receptor de NTBo/A que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos contiguos con relación a SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 70.

Un receptor de NTBo/A puede ser un receptor de NTBo/A endógeno o un receptor de NTBo/A exógeno. Tal como se usa en el presente documento, el término "receptor de NTBo/A endógeno" se refiere a un receptor de NTBo/A presente de manera natural en la célula porque está codificado de manera natural dentro del genoma de la célula, de tal manera que la célula expresa inherentemente el receptor de NTBo/A sin la necesidad de una fuente externa de receptor de NTBo/A o una fuente externa de material genético que codifica para un receptor de NTBo/A. La expresión de un receptor de NTBo/A endógeno puede ser con o sin estimulación ambiental tal como por ejemplo, diferenciación celular o activación de promotores. Por ejemplo, las siguientes líneas celulares establecidas expresan al menos un receptor de NTBo/A endógeno: BE(2)-M17, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa y SK-N-BE(2)-C. Un receptor de NTBo/A endógeno puede ser sólo un receptor de NTBo/A que se produce de manera natural o variantes que se producen de manera natural del mismo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "receptor de NTBo/A exógeno" se refiere a un receptor de NTBo/A expresado en una célula a través de la introducción de una fuente externa de receptor de NTBo/A o una fuente externa de material genético que codifica para un receptor de NTBo/A mediante manipulación humana. La expresión de un receptor de NTBo/A exógeno puede ser con o sin estimulación ambiental tal como, por ejemplo, diferenciación celular o activación de promotores. Como ejemplo no limitativo, células de una línea celular establecida pueden expresar uno o más receptores de NTBo/A exógenos mediante transfección transitoria o de manera estable de una molécula de polinucleótido que codifica para un receptor de NTBo/A, tal como, por ejemplo, un FGFR2, un FGFR3 o una SV2. Como otro ejemplo no limitativo, células de una línea celular establecida pueden expresar uno o más receptores de NTBo/A exógenos mediante transfección de proteína de los receptores de NTBo/A, tales como, por ejemplo, un FGFR2, un FGFR3 o una SV2. Un receptor de NTBo/A exógeno puede ser un receptor de NTBo/A que se produce de manera natural o variantes que se producen de manera natural del mismo, o un receptor de NTBo/A que no se produce de manera natural o variantes que no se producen de manera natural del mismo.

Por tanto en una realización, células de una línea celular establecida expresan un receptor de NTBo/A endógeno. En aspectos de esta realización, el receptor de NTBo/A endógeno expresado por células de una línea celular establecida es un receptor de NTBo/A que se produce de manera natural. En otros aspectos de esta realización, el receptor de NTBo/A endógeno expresado por células de una línea celular establecida es SEQ ID NO: 25, SEQ ID

NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 70. Aún en aspectos de esta realización, el receptor de NTBo/A endógeno expresado por células de una línea celular establecida es un receptor de NTBo/A que se produce de manera natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de receptor de NTBo/A o un subtipo de receptor de NTBo/A. En otros aspectos de esta realización, el receptor de NTBo/A endógeno expresado por células de una línea celular establecida es un receptor de NTBo/A que se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o una identidad de aminoácidos de al menos el 95% con SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 70.

En otra realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar un receptor de NTBo/A exógeno. En un aspecto de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar un receptor de NTBo/A que se produce de manera natural. En otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar el receptor de NTBo/A que se produce de manera natural de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 70. Aún en otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar un receptor de NTBo/A que se produce de manera natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de receptor de NTBo/A o un subtipo de receptor de NTBo/A. Todavía en otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar un receptor de NTBo/A que se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o una identidad de aminoácidos de al menos el 95% con SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 70.

En otro aspecto de la realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar un receptor de NTBo/A que no se produce de manera natural. En otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar un receptor de NTBo/A que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% con SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 70. En otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar un receptor de NTBo/A que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con relación a SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 70. Aún en otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar un receptor de NTBo/A que no se produce de manera natural que tiene, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos contiguos con relación a SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 70.

En otra realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar un FGFR2 exógeno, un FGFR3 exógeno, una SV2 exógena, o cualquier combinación de los mismos. En aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar un FGFR2 que se produce de manera natural, un FGFR3 que se produce de manera natural, una SV2 que se produce de manera natural, o cualquier combinación de los mismos. Aún en otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar un FGFR2 que no se produce de manera natural, un FGFR3 que no se produce de manera natural, una SV2 que no se produce de manera natural, o cualquier combinación de los mismos. Todavía en otros aspectos de

esta realización, células de una línea celular establecida se modifican mediante ingeniería genética de manera transitoria o de manera estable para expresar o bien un FGFR2 que se produce de manera natural o bien un FGFR2 que no se produce de manera natural, o bien un FGFR3 que se produce de manera natural o bien un FGFR3 que no se produce de manera natural, o bien una SV2 que se produce de manera natural o bien una SV2 que no se produce de manera natural, o cualquier combinación de los mismos.

Pueden identificarse células que expresan uno o más receptores de NTBo/A endógenos o exógenos mediante métodos de rutina incluyendo ensayos directos e indirectos para determinar la captación de toxina. Pueden usarse ensayos que determinan propiedades de unión a o captación de NTBo/A para evaluar si una célula está expresando un receptor de NTBo/A. Tales ensayos incluyen, sin limitación, ensayos de reticulación usando NTBo/A marcada, tal como, por ejemplo, [125I]-NTBo/A, [125I], véanse, por ejemplo, Noriko Yokosawa *et al.*, Binding of Clostridium botulinum type C neurotoxin to different neuroblastoma cell lines, 57(1) Infect. Immun. 272-277 (1989); Noriko Yokosawa *et al.*, Binding of botulinum type C, D and E neurotoxins to neuronal cell lines and synaptosomes, 29(2) Toxicol 261-264 (1991); y Tei-ichi Nishiki *et al.*, Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes, 269(14) J. Biol. Chem. 10498-10503 (1994). Otros ensayos no limitativos incluyen ensayos inmunocitoquímicos que detectan la unión a NTBo/A usando anticuerpos marcados o no marcados, véanse, por ejemplo, Atsushi Nishikawa *et al.*, The receptor and transporter for internalization of Clostridium botulinum type C progenitor toxin into HT-29 cells, 319(2) Biochem. Biophys. Res. Commun. 327-333 (2004) y ensayos de inmunoprecipitación, véanse, por ejemplo, Yukako Fujinaga *et al.*, Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes, 150(Pt 5) Microbiology 1529-1538 (2004), que detectan toxina unida usando anticuerpos marcados o no marcados. Los anticuerpos útiles para estos ensayos incluyen, sin limitación, anticuerpos seleccionados contra NTBo/A, anticuerpos seleccionados contra un receptor de NTBo/A, tal como, por ejemplo, FGFR2, FGFR3 o SV2, y/o anticuerpos seleccionados contra un gangliósido, tal como, por ejemplo, GD1a, GD1b, GD3, GQ1b o GT1b. Si el anticuerpo está marcado, la unión de la molécula puede detectarse mediante diversos medios, incluyendo análisis de inmunotransferencia de tipo Western, observación directa al microscopio de la ubicación celular del anticuerpo, medición de anticuerpo unido a sustrato o célula tras una etapa de lavado, citometría de flujo, electroforesis o electroforesis capilar, empleando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Si el anticuerpo no está marcado, puede emplearse un anticuerpo secundario marcado para la detección indirecta de la molécula unida, y la detección puede proceder como para un anticuerpo marcado. Se entiende que estos ensayos y similares que determinan propiedades o características de captación de NTBo/A pueden ser útiles en la identificación de células que expresan receptores de NTBo/A endógenos o exógenos.

También pueden usarse ensayos que monitorizan la liberación de una molécula tras la exposición a NTBo/A para evaluar si una célula está expresando uno o más receptores de NTBo/A endógenos o exógenos. En estos ensayos, la inhibición de la liberación de la molécula se produciría en células que expresan un receptor de NTBo/A tras tratamiento con NTBo/A. Los ensayos bien conocidos incluyen métodos que miden la inhibición de la liberación de catecolamina radiomarcada desde neuronas, tal como, por ejemplo, la liberación de [3H]-noradrenalina o [3H]-dopamina, véanse por ejemplo, A Fassio *et al.*, Evidence for calcium-dependent vesicular transmitter release insensitive to tetanus toxin and botulinum toxin type F, 90(3) Neuroscience 893-902 (1999); y Sara Stigliani *et al.*, The sensitivity of catecholamine release to botulinum toxin C1 and E suggests selective targeting of vesicles set into the readily releasable pool, 85(2) J. Neurochem. 409-421 (2003), o mide la liberación de catecolamina usando un procedimiento fluorométrico, véanse, por ejemplo, Anton de Paiva *et al.*, A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly, 268(28) J. Biol. Chem. 20838-20844 (1993); Gary W. Lawrence *et al.*, Distinct exocytotic responses of intact and permeabilised chromaffin cells after cleavage of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) or synaptobrevin by botulinum toxin A or B, 236(3) Eur. J. Biochem. 877-886 (1996); y Patrick Foran *et al.*, Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release, 35(8) Biochemistry 2630-2636 (1996). Otros ejemplos no limitativos incluyen ensayos que miden la inhibición de la liberación de hormonas desde células endocrinas, tales como, por ejemplo, células de la adenohipófisis o células de ovario. Se entiende que estos ensayos y similares para determinar la liberación de moléculas pueden ser útiles en la identificación de células que expresan receptores de NTBo/A endógenos o exógenos.

También pueden usarse ensayos que detectan el corte de un sustrato de NTBo/A tras la exposición a una NTBo/A para evaluar si una célula está expresando uno o más receptores de NTBo/A endógenos o exógenos. En estos ensayos, la generación de un producto de corte de sustrato de NTBo/A, o la desaparición del sustrato de NTBo/A intacto, se detectaría en células que expresan un receptor de NTBo/A tras tratamiento con NTBo/A. Los ejemplos no limitativos de análisis de inmunotransferencia de tipo Western específico, así como reactivos, condiciones y protocolos bien caracterizados están fácilmente disponibles de proveedores comerciales que incluyen, sin limitación, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI, y Stratagene, Inc., La Jolla, CA. Se entiende que estos ensayos y similares para determinar el corte de sustrato de NTBo/A pueden ser útiles en la identificación de células que expresan receptores de NTBo/A endógenos o exógenos.

Como ejemplos no limitativos, puede usarse análisis de inmunotransferencia de tipo Western que usa un anticuerpo

que reconoce producto cortado de SNAP-25 por NTBo/A o las formas tanto cortadas como no cortadas de SNAP-25 para someter a ensayo la captación de NTBo/A. Los ejemplos de anticuerpos α -SNAP-25 útiles para estos ensayos incluyen, sin limitación, anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 de ratón CI 71.1 (Synaptic Systems, Gotinga, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 CI 71.2 (Synaptic Systems, Gotinga, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón α -SNAP-25 SP12 (Abcam, Cambridge, MA), antisuero policlonal de conejo α -SNAP-25 (Synaptic Systems, Gotinga, Alemania), antisuero policlonal de conejo α -SNAP-25 S9684 (Sigma, San Luis, MO), y antisuero policlonal de conejo α -SNAP-25 (Abcam, Cambridge, MA).

Aspectos de la presente divulgación proporcionan células que se preparan a través de manipulación genética o ingeniería genética recombinante para expresar una SNAP-25 exógena y/o uno o más receptores de NTBo/A exógenos. Células útiles para expresar una SNAP-25 exógena y/o uno o más receptores de NTBo/A exógenos a través de manipulación genética o ingeniería genética recombinante incluyen células neuronales y células no neuronales que pueden expresar o no una SNAP-25 endógena y/o uno o más receptores de NTBo/A endógenos. Se entiende además que tales células manipuladas genéticamente o modificadas mediante ingeniería genética de manera recombinante pueden expresar una SNAP-25 exógena y uno o más receptores de NTBo/A exógenos bajo el control de un elemento potenciador, elemento promotor constitutivo, específico de tejido, específico de célula o inducible o ambos. Se entiende que cualquier célula es útil siempre que la célula pueda manipularse genéticamente o modificarse mediante ingeniería genética de manera recombinante para expresar una SNAP-25 exógena y/o uno o más receptores de NTBo/A exógenos y pueda experimentar intoxicación por NTBo/A.

Métodos útiles para introducir en una célula una molécula de polinucleótido exógena que codifica para un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una NTBo/A corta de manera proteolítica un sustrato de SNAP-25, tal como, por ejemplo, una SNAP-25, un FGFR2, un FGFR3 o una SV2, incluyen, sin limitación, métodos de suministro mediados químicamente, tales como, por ejemplo, métodos de suministro mediados por fosfato de calcio, mediados por dietil-aminoetil (DEAE)-dextrano, mediados por lípidos, mediados por polietileneimina (PEI), mediados por polilisina y mediados por Polybrene; métodos de suministro mediados físicamente, tales como, por ejemplo, suministro de partículas biolísticas, microinyección, fusión de protoplastos y electroporación; y métodos de suministro mediados de manera viral, tales como, por ejemplo, transfección mediada de manera retroviral, véanse por ejemplo, *Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells*, págs. 16.1-16.62 (Sambrook & Russell, eds., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Vol. 3, 3ª ed. 2001); Alessia Colosimo *et al.*, *Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells*, 29(2) *Biotechniques* 314-318, 320-322, 324 (2000); Philip Washbourne & A. Kimberley McAllister, *Techniques for Gene Transfer into Neurons*, 12(5) *Curr. Opin. Neurobiol.* 566-573 (2002); y *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, págs. 9.16.4-9.16.11 (2000). Un experto en la técnica entiende que la selección de un método específico para introducir una molécula de polinucleótido en una célula dependerá, en parte, de si la célula contendrá de manera transitoria o de manera estable un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una NTBo/A corta de manera proteolítica un sustrato de SNAP-25. Los ejemplos no limitativos de molécula de polinucleótido que codifica para un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una NTBo/A corta de manera proteolítica un sustrato de SNAP-25 son los siguientes: molécula de polinucleótido de FGFR2 de SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 o SEQ ID NO: 138; molécula de polinucleótido de FGFR3 de SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140 o SEQ ID NO: 141; molécula de polinucleótido de SV2 de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 o SEQ ID NO: 144; y molécula de polinucleótido de SNAP-25 de SEQ ID NO: 145 o SEQ ID NO: 146.

Un experto habitual en la técnica conoce bien métodos de suministro mediados químicamente y se describen en, por ejemplo, Martin Jordan & Florian Worm, *Transfection of Adherent and Suspended Cells by Calcium Phosphate*, 33(2) *Methods* 136-143 (2004); Chun Zhang *et al.*, *Polyethylenimine Strategies for Plasmid Delivery to Brain-Derived Cells*, 33(2) *Methods* 144-150 (2004). Tales métodos de suministro mediados químicamente pueden prepararse mediante procedimientos convencionales y están disponibles comercialmente, véanse, por ejemplo, kit de transfección CellPfect (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); kit de transfección en mamíferos, fosfato de calcio y DEAE-dextrano, (Stratagene, Inc., La Jolla, CA); reactivo de transfección Lipofectamine™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); kit de transfección ExGen 500 (Fermentas, Inc., Hanover, MD), y kits de transfección SuperFect y Effectene (Qiagen, Inc., Valencia, CA).

Un experto habitual en la técnica conoce bien métodos de suministro mediados físicamente y se describen en, por ejemplo, Jeike E. Biewenga *et al.*, *Plasmid-Mediated Gene Transfer in Neurons using the Biolistics Technique*, 71(1) *J. Neurosci. Methods.* 67-75 (1997); John O'Brien & Sarah C. R. Lumms, *Biolistic and Biolistic Transfection: Using the Gene Gun to Deliver DNA and Lipophilic Dyes into Mammalian Cells*, 33(2) *Methods* 121-125 (2004); M. Golzio *et al.*, *In vitro and In vivo Electric Field-Mediated Permeabilization, Gene Transfer, and Expression*, 33(2) *Methods* 126-135 (2004); y Oliver Gresch *et al.*, *New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells*, 33(2) *Methods* 151-163 (2004).

Un experto habitual en la técnica conoce bien métodos de suministro mediados de manera viral y se describen en,

por ejemplo, Chooi M. Lai *et al.*, Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors, 21(12) DNA Cell Biol. 895-913 (2002); Ilya Frolov *et al.*, Alphavirus-Based Expression Vectors: Strategies and Applications, 93(21) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 11371-11377 (1996); Roland Wolkowicz *et al.*, Lentiviral Vectors for the Delivery of DNA into Mammalian Cells, 246 Methods Mol. Biol. 391-411 (2004); A. Huser & C. Hofmann, Baculovirus Vectors: Novel Mammalian Cell Gene-Delivery Vehicles and Their Applications, 3(1) Am. J. Pharmacogenomics 53-63 (2003); Tiziana Tonini *et al.*, Transient Production of Retroviral- and Lentiviral-Based Vectors for the Transduction of Mammalian Cells, 285 Methods Mol. Biol. 141-148 (2004); Manfred Gossen & Hermann Bujard, Tight Control of Gene Expression in Eukaryotic Cells by Tetracycline-Responsive Promoters, patente estadounidense n.º 5.464.758; Hermann Bujard & Manfred Gossen, Methods for Regulating Gene Expression, patente estadounidense n.º 5.814.618; David S. Hogness, Polynucleotides Encoding Insect Steroid Hormone Receptor Polypeptides and Cells Transformed With Same, patente estadounidense n.º 5.514.578; David S. Hogness, Polynucleotide Encoding Insect Ecdysone Receptor, patente estadounidense 6.245.531; Elisabetta Vegeto *et al.*, Progesterone Receptor Having C-Terminal Hormone Binding Domain Truncations, patente estadounidense n.º 5.364.791; Elisabetta Vegeto *et al.*, Mutated Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy, patente estadounidense n.º 5.874.534. Tales métodos de suministro mediados de manera viral pueden prepararse mediante procedimientos convencionales y están disponibles comercialmente, véanse, por ejemplo, sistema de expresión adenoviral ViraPower™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y manual de instrucciones 25-0543 versión A del sistema de expresión adenoviral ViraPower™, Invitrogen, Inc., (15 de julio de 2002); y sistema de vector adenoviral AdEasy™ (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) y manual de instrucciones 064004f del sistema de vector adenoviral AdEasy™, Stratagene, Inc. Además, tales sistemas de suministro viral pueden prepararse mediante métodos convencionales y están disponibles comercialmente, véanse, por ejemplo, sistemas de expresión génica BD™ Tet-Off y Tet-On (BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA) y manual de usuario PT3001-1 de los sistemas de expresión génica BD™ Tet-Off y Tet-On, BD Biosciences Clontech, (14 de marzo de 2003), sistema GeneSwitch™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y un sistema de expresión regulada por mifepristona para el sistema GeneSwitch™ para células de mamífero, versión D, 25-0313, Invitrogen, Inc., (4 de noviembre de 2002); sistema de expresión lentiviral ViraPower™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y manual de instrucciones 25-0501 versión E del sistema de expresión lentiviral ViraPower™, Invitrogen, Inc., (8 de diciembre de 2003); y sistema de expresión en mamíferos inducible de manera retroviral Complete Control® (Stratagene, La Jolla, CA) y manual de instrucciones 064005e del sistema de expresión en mamíferos inducible de manera retroviral Complete Control®.

Por tanto, en una realización, células de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A contienen de manera transitoria una molécula de polinucleótido que codifica para un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una NTBo/A corta de manera proteolítica un sustrato de SNAP-25. En otra realización, células de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A contienen de manera transitoria una molécula de polinucleótido que codifica para una pluralidad de componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una NTBo/A corta de manera proteolítica un sustrato de SNAP-25. En aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A contienen de manera transitoria una molécula de polinucleótido que codifica para FGFR2, FGFR3, SV2 o SNAP-25. En aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A contienen de manera transitoria la molécula de polinucleótido que codifica para FGFR2 de SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 o SEQ ID NO: 138. En otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A contienen de manera transitoria la molécula de polinucleótido que codifica para FGFR3 de SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140 o SEQ ID NO: 141. Aún en otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A contienen de manera transitoria la molécula de polinucleótido que codifica para SV2 de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 o SEQ ID NO: 144. Aún en otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A contienen de manera transitoria la molécula de polinucleótido que codifica para SNAP-25 de SEQ ID NO: 145 o SEQ ID NO: 146.

En otra realización, células de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A contienen de manera estable una molécula de polinucleótido que codifica para un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una NTBo/A corta de manera proteolítica un sustrato de SNAP-25. En otra realización, células de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A contienen de manera estable una molécula de polinucleótido que codifica para una pluralidad de componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una NTBo/A corta de manera proteolítica un sustrato de SNAP-25. En aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A contienen de manera estable una molécula de polinucleótido que codifica para FGFR2, FGFR3, SV2 o SNAP-25. En aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A contienen de manera estable la molécula de polinucleótido que codifica para FGFR2 de SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 o SEQ ID NO: 138. En otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A contienen de manera estable la molécula de polinucleótido que codifica para FGFR3 de SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140 o SEQ ID NO: 141. Aún en otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A contienen de manera estable la molécula de polinucleótido que codifica para SV2 de SEQ ID NO: 142, SEQ

ID NO: 143 o SEQ ID NO: 144. Aún en otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida susceptible de intoxicación por NTBo/A contienen de manera estable la molécula de polinucleótido que codifica para SNAP-25 de SEQ ID NO: 145 o SEQ ID NO: 146.

5 Tal como se mencionó anteriormente, un componente exógeno necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una NTBo/A corta de manera proteolítica un sustrato de SNAP-25, tal como, por ejemplo, una SNAP-25, un FGFR2, un FGFR3 o una SV2 dado a conocer en la presente memoria descriptiva puede introducirse en una célula. Todos y cada uno de los métodos útiles para introducir un componente exógeno de este tipo con un agente de suministro en una población celular pueden ser útiles con la condición de que este método introduzca de manera transitoria el componente exógeno dado a conocer en la presente memoria descriptiva en al menos el 50% de las células dentro de una población celular dada. Por tanto, aspectos de esta realización pueden incluir una población celular en la que, por ejemplo, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, o al menos el 90% de la población celular dada contiene de manera transitoria un componente exógeno necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una NTBo/A corta de manera proteolítica un sustrato de SNAP-25, tal como, por ejemplo, una SNAP-25, un FGFR2, un FGFR3 o una SV2 dado a conocer en la presente memoria descriptiva. Tal como se usa en el presente documento, el término "agente de suministro" se refiere a cualquier molécula que permite o potencia la internalización de un polipéptido unido de manera covalente, unido de manera no covalente o asociado de cualquier otra manera con la misma en una célula. Por tanto, el término "agente de suministro" engloba, sin limitación, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas, moléculas de polinucleótido, liposomas, lípidos, virus, retrovirus y células que, sin limitación, transportan una molécula unida de manera covalente o de manera no covalente a la membrana celular, citoplasma o núcleo de la célula. Además, se entiende que el término "agente de suministro" engloba moléculas que se internalizan mediante cualquier mecanismo, incluyendo agentes de suministro que funcionan mediante endocitosis mediada por receptor y los que son independientes de endocitosis mediada por receptor.

25 Un agente de suministro también puede ser un agente que permite o potencia la captación celular de un componente unido de manera covalente, como FGFR2, FGFR3, SV2 o SNAP-25, tal como, por ejemplo, mediante conjugación química o mediante proteínas de fusión producidas genéticamente. Métodos que ligan de manera covalente agentes de suministro y métodos de uso de tales agentes se describen en, por ejemplo, Steven F. Dowdy, Protein Transduction System and Methods of Use Thereof, publicación internacional n.º WO 00/34308; Gerard Chassaing & Alain Prochiantz, Peptides which can be Used as Vectors for the Intracellular Addressing of Active Molecules, patente estadounidense n.º 6.080.724; Alan Frankel *et al.*, Fusion Protein Comprising TAT-derived Transport Moiety, patente estadounidense n.º 5.674.980; Alan Frankel *et al.*, TAT-derived Transport Polypeptide Conjugates, patente estadounidense n.º 5.747.641; Alan Frankel *et al.*, TAT-derived Transport Polypeptides and Fusion Proteins, patente estadounidense n.º 5.804.604; Peter F. J. O'Hare *et al.*, Use of Transport Proteins, patente estadounidense n.º 6.734.167; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells, patente estadounidense n.º 5.807.746; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells, patente estadounidense n.º 6.043.339; Yao-Zhong Lin *et al.*, Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, patente estadounidense n.º 6.248.558; Yao-Zhong Lin *et al.*, Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, patente estadounidense n.º 6.432.680; Jack J. Hawiger *et al.*, Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells, patente estadounidense n.º 6.495.518; Yao-Zhong Lin *et al.*, Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, patente estadounidense n.º 6.780.843; Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes, patente estadounidense n.º 6.306.993; Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes, patente estadounidense n.º 6.495.663; y Pamela B. Davis *et al.*, Fusion Proteins for Protein Delivery, patente estadounidense n.º 6.287.817.

50 Un agente de suministro también puede ser un agente que permite o potencia la captación celular de un componente asociado de manera no covalente, como FGFR2, FGFR3, SV2c o SNAP-25. Métodos que funcionan en ausencia de unión covalente y métodos de uso de tales agentes se describen en, por ejemplo, Gilles Divita *et al.*, Peptide-Mediated Transfection Agents and Methods of Use, patente estadounidense n.º 6.841.535; Philip L Felgner y Olivier Zelphati, Intracellular Protein Delivery Compositions and Methods of Use, publicación de patente estadounidense n.º 2003/0008813; y Michael Karas, Intracellular Delivery of Small Molecules, Proteins and Nucleic Acids, publicación de patente estadounidense 2004/0209797. Tales agentes de suministro de péptidos pueden prepararse y usarse mediante métodos convencionales y están disponibles comercialmente, véanse, por ejemplo el reactivo CHARIOT™ (Active Motif, Carlsbad, CA); el reactivo BIO-PORTER® (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA), el reactivo de suministro de proteínas BIO TREK™ (Stratagene, La Jolla, CA), y el reactivo de transfección de proteínas PRO-JECT™ (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

60 Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una muestra que comprende una NTBo/A. Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra que comprende una NTBo/A" se refiere a cualquier materia biológica que contiene o potencialmente contiene una NTBo/A activa. Puede someterse a ensayo una variedad de muestras según un método dado a conocer en la presente memoria descriptiva incluyendo, sin limitación, NTBo/A purificada, parcialmente purificada o no purificada; toxina recombinante monocatenaria o bicatenaria con una secuencia que se produce de manera natural o que no se produce de manera natural; NTBo/A recombinante con

65

una especificidad de proteasa modificada; NTBo/A recombinante con una especificidad celular alterada; NTBo/A granel; un producto de NTBo/A formulado, incluyendo, por ejemplo, BOTOX®, DYSPORT®/RELOXIN®, XEOMIN®, PURTOX®, NEURONOX®, BTX-A y; células o lisados celulares en bruto, fraccionados o parcialmente purificados de, por ejemplo, fuentes de bacterias, levaduras, insectos o mamíferos; sangre, plasma o suero; alimentos crudos, parcialmente cocinados, cocinados o procesados; bebidas; pienso para animales; muestras de suelo; muestras de agua; sedimentos de estanques; lociones; cosméticos; y formulaciones clínicas. Se entiende que el término muestra engloba muestras de tejido, incluyendo, sin limitación, muestras de tejido de mamíferos, muestras de tejido de ganado tales como muestras de tejido de ovejas, vacas y cerdos; muestras de tejido de primates; y muestras de tejido humano. Tales muestras engloban, sin limitación, muestras intestinales tales como muestras intestinales de lactantes, y muestras de tejido obtenidas de una herida. Como ejemplos no limitativos, un método de detección de cantidades picomolares de actividad de NTBo/A puede ser útil para determinar la presencia o actividad de una NTBo/A en una muestra de alimentos o bebidas; para someter a ensayo una muestra de un ser humano o animal, por ejemplo, expuesta a una NTBo/A o que tiene uno o más síntomas de botulismo; para seguir la actividad durante la producción y purificación de NTBo/A a granel; para someter a ensayo un producto de NTBo/A formulado usado en aplicaciones farmacéuticas o cosméticas; o para someter a ensayo el suero sanguíneo de un sujeto para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A.

Por tanto, en una realización, una muestra que comprende una NTBo/A es una muestra que comprende cualquier cantidad de una NTBo/A. En aspectos de esta realización, una muestra que comprende una NTBo/A comprende aproximadamente 100 ng o menos, aproximadamente 10 ng o menos, aproximadamente 1 ng o menos, aproximadamente 100 pg o menos, aproximadamente 10 pg o menos, o aproximadamente 1 pg o menos de una NTBo/A. En otros aspectos de esta realización, una muestra que comprende una NTBo/A comprende aproximadamente 1 μ M o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 100 pM o menos, aproximadamente 10 pM o menos, aproximadamente 1 pM o menos, aproximadamente 100 fM o menos, aproximadamente 10 fM o menos, o aproximadamente 1 fM o menos de una NTBo/A.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. Tal como se usa en el presente documento, el término "componente de SNAP-25 que comprende una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A" se refiere a un componente celular que contiene el producto de corte de SNAP-25. Se prevé que cualquier método adecuado para enriquecer o aislar un componente de SNAP-25 pueda ser útil, incluyendo, sin limitación, protocolos de lisis celular, protocolos de purificación en columna de centrifugación, inmunoprecipitación, purificación de afinidad y cromatografía de proteínas.

El anticuerpo α -SNAP-25 del método de la invención se une a un soporte de fase sólida. Tal como se usa en el presente documento, el término "soporte de fase sólida" es sinónimo de "fase sólida" y se refiere a cualquier matriz que pueda usarse para inmovilizar un anticuerpo α -SNAP-25 dado a conocer en la presente memoria descriptiva. Los ejemplos no limitativos de soportes de fase sólida incluyen, por ejemplo, un tubo; una placa; una columna; pasadores o "tiras reactivas"; una partícula magnética, una perla u otros medios cromatográficos fibrosos o esféricos, tales como, por ejemplo, agarosa, Sepharose, sílice y plástico; y láminas o membranas, tales como, por ejemplo, nitrocelulosa y poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF). El soporte de fase sólida puede construirse usando una amplia variedad de materiales tales como, por ejemplo, vidrio, carbono, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, diazocelulosa o almidón. El soporte de fase sólida seleccionado puede tener una propiedad física que lo hace que sea fácilmente separable de material soluble o no unido y permite generalmente que materiales no unidos, tales como, por ejemplo, reactivos en exceso, subproductos de reacción o disolventes, se separen o se retiren de otro modo (mediante, por ejemplo, lavado, filtración, centrifugación, etc.) del componente de ensayo unido al soporte de fase sólida. Los ejemplos no limitativos de cómo preparar y usar un soporte de fase sólida se describen en, por ejemplo, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, citado anteriormente, (2001); y Current Protocols in Molecular Biology, citado anteriormente, (2004).

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A y un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. Se prevé que pueda usarse cualquier sistema de detección para poner en práctica aspectos de este método de base inmunológica dado a conocer, con la condición de que la relación señal-ruido pueda distinguir en un grado estadísticamente significativo la señal del complejo antígeno-anticuerpo con respecto a la señal de fondo. Los ejemplos no limitativos de sistemas de detección de base inmunológica incluyen análisis de inmunotransferencia, como inmunotransferencia de tipo Western y transferencia puntual, análisis de inmunoprecipitación, análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y ELISA de tipo sándwich. La detección de la señal puede lograrse usando autorradiografía con obtención de imágenes o detección y cuantificación de la radiactividad con Phosphorimager (AU), quimioluminiscencia (CL), electroquimioluminiscencia (ECL), bioluminiscencia (BL), fluorescencia, transferencia de energía por resonancia, polarización plana, colorimetría o citometría de flujo (FC).

Descripciones de sistemas de detección de base inmunológica se dan a conocer en, por ejemplo, Michael M. Rauhut, Chemiluminescence, en Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (Ed. Grayson, 3ª ed, John Wiley and Sons, 1985); A. W. Knight, A Review of Recent Trends in Analytical Applications of Electrogenerated Chemiluminescence, Trends Anal. Chem. 18(1): 47-62 (1999); K. A. Fahnrich, *et al.*, Recent Applications of Electrogenerated Chemiluminescence in Chemical Analysis, Talanta 54(4): 531-559 (2001); Commonly Used Techniques in Molecular Cloning, págs. A8.1-A8-55 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3ª ed. 2001); Detection Systems, págs. A9.1-A9-49 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3ª ed. 2001); Electrogenerated Chemiluminescence, (Ed. Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004).

Un ELISA de tipo sándwich (o inmunoensayo de tipo sándwich) es un método basado en dos anticuerpos, que se unen a diferentes epítomos en el antígeno. Un anticuerpo de captura que tiene una alta especificidad de unión por el antígeno de interés, se une a una superficie sólida. El antígeno se añade entonces seguido por la adición de un segundo anticuerpo denominado el anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección se une al antígeno en un epítomo diferente que el anticuerpo de captura. El antígeno se "intercala" por tanto entre los dos anticuerpos. La afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno es habitualmente el principal determinante de sensibilidad del inmunoensayo. A medida que aumenta la concentración de antígeno, aumenta la cantidad de anticuerpo de detección conduciendo a una mayor respuesta medida. Para cuantificar el grado de unión, pueden usarse diferentes sistemas de indicador, tales como, por ejemplo, una enzima unida al anticuerpo secundario y un sustrato indicador en el que la reacción enzimática forma una lectura como la señal de detección. La señal generada es proporcional a la cantidad de antígeno diana presente en la muestra. El sustrato indicador usado para medir el acontecimiento de unión determina el modo de detección. Se usa un lector de placas espectrofotométrico para la detección colorimétrica. Se han desarrollado sustratos quimioluminiscentes y electroquimioluminiscentes que amplifican adicionalmente la señal y pueden leerse en un lector de luminiscencia. El indicador también puede ser una lectura de fluorescencia en la que se reemplaza la etapa enzimática del ensayo por un fluoróforo y entonces se mide la lectura usando un lector de fluorescencia. Los reactivos y protocolos necesarios para realizar un ELISA de tipo sándwich ECL están disponibles comercialmente, incluyendo, sin excepción, la plataforma de detección de ELISA de tipo sándwich-ECL MSD (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

Por tanto, en una realización, detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo α -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítomo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A y un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A puede realizarse usando un análisis de inmunotransferencia, un análisis de inmunoprecipitación, un ELISA o un ELISA de tipo sándwich. En aspectos de esta realización, la detección se realiza usando un análisis de inmunotransferencia AU, CL, ECL o BL, un análisis de inmunoprecipitación AU, CL, ECL, BL o FC, un ELISA AU, CL, ECL, BL o FC o un ELISA de tipo sándwich AU, CL, ECL, BL o FC.

Aspectos de la presente divulgación pueden ponerse en práctica en un modo monoplex o múltiple. Un método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A puesto en práctica en un modo monoplex es uno que sólo detecta la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo α -SNAP-25 y un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. Un método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A puesto en práctica en un modo múltiple es uno que detecta de manera concurrente la presencia de dos o más complejos antígeno-anticuerpo; uno de los cuales es el complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo α -SNAP-25 y un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; y el/los otro(s) de los cuales es/son un complejo antígeno-anticuerpo para una proteína segunda, tercera, cuarta, etc. diferente. Puede usarse una segunda proteína, por ejemplo, como control interno para minimizar la variabilidad de una muestra a otra mediante la normalización de la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo α -SNAP-25/SNAP-25 detectado con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado para la segunda proteína. Como tal, la segunda proteína es habitualmente una que se expresa sistemáticamente por la célula, tal como una proteína de mantenimiento. Los ejemplos no limitativos de una segunda proteína útil, incluyen, por ejemplo, una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), sintaxina, citocinas. Métodos de realización de un ensayo de base inmunológica en un modo múltiple se describen en, por ejemplo, U. B. Nielsen y B. H. Geierstanger, Multiplexed Sandwich Assays in Microarray Format, J. Immunol. Methods. 290(1-2): 107-120 2004); R. Barry y M. Soloviev, Quantitative Protein Profiling using Antibody Arrays, Proteomics, 4(12): 3717-3726 (2004); M. M. Ling *et al.*, Multiplexing Molecular Diagnostics and Immunoassays using Emerging Microarray Technologies, Expert Rev Mol Diagn. 7(1): 87-98 (2007); S. X. Leng *et al.*, ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research, J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 63(8): 879-884 (2008).

Por tanto, en una realización, un método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A puesto en práctica en un modo monoplex mediante sólo la detección de la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo α -SNAP-25 y un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. En otra realización, el método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A puesto en práctica en un modo múltiple mediante la detección

concurrente de la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo α -SNAP-25 y un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A y al menos otro complejo antígeno-anticuerpo para una proteína distinta de SNAP-25, tal como, por ejemplo, GAPDH o sintaxina.

5 Aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, un método de determinación de inmunorresistencia a NTBo/A. Tal como se usa en el presente documento, el término “inmunorresistencia a NTBo/A” significa un mamífero que no responde totalmente a una terapia con NTBo/A, o muestra un efecto beneficioso reducido de una terapia con NTBo/A porque la respuesta inmunitaria de ese mamífero, o bien directa o bien indirectamente, reduce la eficacia de la terapia. Un ejemplo no limitativo de eficacia reducida sería la presencia en un mamífero de al menos un anticuerpo neutralizante α -NTBo/A que se une a una toxina NTBo/A de manera que reduce o previene la especificidad o actividad de la toxina. Tal como se usa en el presente documento, el término “terapia con NTBo/A” significa un tratamiento, remedio, cura, cicatrización, rehabilitación o cualquier otro medio de contrarrestar algo no deseado en un mamífero que requiere neuromodulación usando una toxina NTBo/A o administrar a un mamífero una o más dosis controladas de una medicación, preparación o mezcla de una toxina NTBo/A que tiene efecto farmacéutico, terapéutico, curativo, cosmético, como remedio o cualquier otro efecto beneficioso. La terapia con NTBo/A engloba, sin limitación, el uso de cualquier fragmento que se produce de manera natural o modificado de la misma, en cualquier formulación, combinado con cualquier transportador o principio activo y administrado por cualquier vía de administración. Una terapia con NTBo/A modo de ejemplo, muy conocida es una terapia con BOTOX®.

Aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, una muestra de prueba obtenida de un mamífero que está sometándose a prueba para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A. Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra de prueba” se refiere a cualquier materia biológica que contiene o potencialmente contiene al menos un anticuerpo α -NTBo/A. Un anticuerpo α -NTBo/A puede ser un anticuerpo anti-NTBo/A neutralizante o un anticuerpo anti-NTBo/A no neutralizante. Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpos anti-NTBo/A neutralizantes” significa cualquier anticuerpo α -NTBo/A que se unirá, en condiciones fisiológicas, a una región de una toxina NTBo/A de tal manera que reduzca o prevenga que la toxina ejerza su efecto en una terapia con NTBo/A. Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpos α -NTBo/A no neutralizantes” significa cualquier anticuerpo α -NTBo/A que se unirá, en condiciones fisiológicas, a una región de una toxina NTBo/A, pero que no prevendrá que la toxina ejerza su efecto en una terapia con NTBo/A. Se prevé que todas y cada una de las muestras que pueden contener anticuerpos α -NTBo/A pueden usarse en este método, incluyendo, sin limitación, sangre, plasma, suero y linfa. Además, todos y cada uno de los organismos que pueden producir anticuerpos α -NTBo/A contra una toxina NTBo/A pueden servir como fuente para una muestra incluyendo, pero sin limitarse a, aves y mamíferos, incluyendo ratones, ratas, cabras, ovejas, caballos, burros, vacas, primates y seres humanos. Los ejemplos no limitativos de protocolos específicos para la recogida de sangre y la preparación de suero se describen en, por ejemplo, Marjorie Schaub Di Lorenzo & Susan King Strasinger, BLOOD COLLECTION IN HEALTHCARE (F.A. Davis Company, 2001); y Diana Garza & Kathleen Becan-McBride, PHLEBOTOMY HANDBOOK: BLOOD COLLECTION ESSENTIALS (Prentice Hall, 6ª ed., 2002). Estos protocolos son procedimientos de rutina muy dentro del alcance de un experto en la técnica y de las enseñanzas en el presente documento. Una muestra de prueba puede obtenerse de un organismo antes de la exposición a una toxina NTBo/A, tras un único tratamiento con NTBo/A, tras múltiples tratamientos con toxina NTBo/A, antes de la aparición de resistencia a una terapia con NTBo/A, o tras la aparición de resistencia a una terapia con NTBo/A.

Aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, una muestra de control. Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra de control” significa cualquier muestra en que la presencia o ausencia de la muestra de prueba se conoce e incluye muestras de control tanto negativo como positivo. Con respecto a anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A, una muestra de control negativo puede obtenerse de un individuo que nunca se había expuesto a NTBo/A y puede incluir, sin limitación, una muestra del mismo individuo que suministra la muestra de prueba, pero tomada antes de someterse a terapia con NTBo/A; una muestra tomada de un individuo diferente que nunca se ha expuesto a NTBo/A; una muestra reunida tomada de una pluralidad de diferentes individuos que nunca se han expuesto a NTBo/A. Con respecto a anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A, una muestra de control positivo puede obtenerse de un individuo que manifiesta inmunorresistencia a NTBo/A e incluye, sin limitación, un individuo que da positivo en la prueba en un ensayo de pruebas basado en pacientes; un individuo que da positivo en la prueba en un bioensayo *in vivo*; y un individuo que muestra hiperinmunidad, por ejemplo, un individuo vacunado contra NTBo/A.

Se prevé además que los anticuerpos α -NTBo/A puedan purificarse de una muestra. Pueden purificarse anticuerpos anti-NTBo/A de una muestra, usando una variedad de procedimientos incluyendo, sin limitación, cromatografía de proteínas A/G y cromatografía de afinidad. Los ejemplos no limitativos de protocolos específicos para purificar anticuerpos de una muestra se describen en, por ejemplo, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1998); USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL: PORTABLE PROTOCOL NO. I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998); y MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, citado anteriormente, (2001).

Además, los ejemplos no limitativos de métodos de purificación de anticuerpos así como reactivos, condiciones y protocolos bien caracterizados están fácilmente disponibles de proveedores comerciales que incluyen, sin limitación, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; y Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA. Estos protocolos son procedimientos de rutina muy dentro del alcance de un experto en la técnica.

5 Por tanto, en una realización, una muestra comprende sangre. En un aspecto de esta realización, la muestra comprende sangre de ratón, sangre de rata, sangre de cabra, sangre de oveja, sangre de caballo, sangre de burro, sangre de vaca, sangre de primate o sangre humana. En otra realización, una muestra comprende plasma. En un aspecto de esta realización, una muestra de prueba comprende plasma de ratón, plasma de rata, plasma de cabra, plasma de oveja, plasma de caballo, plasma de burro, plasma de vaca, plasma de primate o plasma humano. En otra realización, una muestra comprende suero. En un aspecto de esta realización, la muestra comprende suero de ratón, suero de rata, suero de cabra, suero de oveja, suero de caballo, suero de burro, suero de vaca, suero de primate y suero humano. En otra realización, una muestra comprende linfa. En un aspecto de esta realización, una muestra comprende linfa de ratón, linfa de rata, linfa de cabra, linfa de oveja, linfa de caballo, linfa de burro, linfa de vaca, linfa de primate o linfa humana. Aún en otra realización, una muestra es una muestra de prueba. Aún en otra realización, una muestra es una muestra de control. En aspectos de esta realización, una muestra de control es una muestra de control negativo o una muestra de control positivo.

20 Aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, comparar la cantidad de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A detectada en la etapa (d) con la cantidad de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A detectada en la etapa (e). En una realización, la cantidad de producto de corte de SNAP-25 en la muestra de prueba es mayor en comparación con la cantidad de producto de corte de SNAP-25 en la muestra de control. En un aspecto de esta realización, una mayor cantidad de producto de corte de SNAP-25 en la muestra de prueba en comparación con una muestra de control positivo indica una reducción en o carencia de inmunorresistencia a NTBo/A en el mamífero. En otro aspecto de esta realización, una cantidad equivalente de producto de corte de SNAP-25 en la muestra de prueba en comparación con una muestra de control negativo indica una reducción en o carencia de inmunorresistencia a NTBo/A en el mamífero. En otra realización, la cantidad de producto de corte de SNAP-25 en la muestra de prueba es menor en comparación con la cantidad de producto de corte de SNAP-25 en la muestra de control. En un aspecto de esta realización, una cantidad menor o equivalente de producto de corte de SNAP-25 en la muestra de prueba en comparación con una muestra de control positivo indica un aumento en o presencia de inmunorresistencia a NTBo/A en el mamífero. En otro aspecto de esta realización, una menor cantidad de producto de corte de SNAP-25 en la muestra de prueba en comparación con una muestra de control negativo indica un aumento en o presencia de inmunorresistencia a NTBo/A en el mamífero.

35 Se prevé que todas y cada una de las condiciones de ensayo adecuadas para detectar la presencia de un anticuerpo neutralizante α -NTBo/A en una muestra sean útiles en los métodos dados a conocer en la presente memoria descriptiva, tales como, por ejemplo, condiciones de ensayo lineal y condiciones de ensayo no lineal. En una realización, las condiciones de ensayo son lineales. En un aspecto de esta realización, la cantidad de ensayo de una NTBo/A está en exceso. En otro aspecto de esta realización, la cantidad de ensayo de una NTBo/A es limitante de la velocidad. En otro aspecto de esta realización, la cantidad de ensayo de una muestra de prueba es limitante de la velocidad.

45 También pueden describirse aspectos de la presente divulgación de la siguiente manera:

1. Una composición que comprende un transportador unido a un ligador flexible unido a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A.
2. La composición del punto 1, en la que el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A es glutamina o lisina.
3. La composición del punto 1, en la que el antígeno de SNAP-25 comprende SEQ ID NO: 147.
4. La composición del punto 1, en la que el ligador flexible y la secuencia de aminoácidos del antígeno de SNAP-25 es SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 46.
5. Un anticuerpo α -SNAP-25 aislado, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25.
6. El anticuerpo α -SNAP-25 aislado del punto 5, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una constante de velocidad de asociación para un epítipo que no comprende una glutamina en el extremo carboxilo-terminal del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 de menos de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; y en el que el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una constante de disociación de equilibrio para el epítipo de menos de 0,450 nM.

- 5 7. El anticuerpo α -SNAP-25 aislado del punto 5, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 82; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 92.
- 10 8. El anticuerpo α -SNAP-25 aislado del punto 5, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado comprende al menos la CDR1 de V_H de SEQ ID NO: 93, la CDR1 de V_H de SEQ ID NO: 94, la CDR1 de V_H de SEQ ID NO: 95, la CDR1 de V_H de SEQ ID NO: 118, la CDR1 de V_H de SEQ ID NO: 119 o la CDR1 de V_H de SEQ ID NO: 120.
- 15 9. El anticuerpo α -SNAP-25 aislado del punto 5, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado comprende al menos la CDR2 de V_H de SEQ ID NO: 96, la CDR2 de V_H de SEQ ID NO: 97, la CDR2 de V_H de SEQ ID NO: 98, la CDR2 de V_H de SEQ ID NO: 99, la CDR2 de V_H de SEQ ID NO: 121, la CDR2 de V_H de SEQ ID NO: 122 o la CDR2 de V_H de SEQ ID NO: 123.
- 20 10. El anticuerpo α -SNAP-25 aislado del punto 5, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado comprende al menos la CDR3 de V_H de SEQ ID NO: 100, la CDR3 de V_H de SEQ ID NO: 101, la CDR3 de V_H de SEQ ID NO: 102 o la CDR3 de V_H de SEQ ID NO: 124.
- 25 11. El anticuerpo α -SNAP-25 aislado del punto 5, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado comprende al menos la CDR1 de V_L de SEQ ID NO: 103, la CDR1 de V_L de SEQ ID NO: 104, la CDR1 de V_L de SEQ ID NO: 105, la CDR1 de V_L de SEQ ID NO: 106, la CDR1 de V_L de SEQ ID NO: 107, la CDR1 de V_L de SEQ ID NO: 125, la CDR1 de V_L de SEQ ID NO: 126, la CDR1 de V_L de SEQ ID NO: 127, la CDR1 de V_L de SEQ ID NO: 128 o la CDR1 de V_L de SEQ ID NO: 129.
- 30 12. El anticuerpo α -SNAP-25 aislado del punto 5, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado comprende al menos la CDR2 de V_L de SEQ ID NO: 108, la CDR2 de V_L de SEQ ID NO: 109, la CDR2 de V_L de SEQ ID NO: 110, la CDR2 de V_L de SEQ ID NO: 111 o la CDR2 de V_L de SEQ ID NO: 112.
- 35 13. El anticuerpo α -SNAP-25 aislado del punto 5, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado comprende al menos la CDR3 de V_L de SEQ ID NO: 113, la CDR3 de V_L de SEQ ID NO: 114, la CDR3 de V_L de SEQ ID NO: 115, la CDR3 de V_L de SEQ ID NO: 116 o la CDR3 de V_L de SEQ ID NO: 117.
- 40 14. El anticuerpo α -SNAP-25 aislado del punto 5, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 121 y SEQ ID NO: 100; y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110 y SEQ ID NO: 115.
- 45 15. El anticuerpo α -SNAP-25 aislado del punto 5, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado se une selectivamente al epítipo de SNAP-25 de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147 o SEQ ID NO: 148.
- 50 16. El anticuerpo α -SNAP-25 aislado del punto 5, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 aislado se une selectivamente al epítipo de SNAP-25 de SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44.
- 55 17. Un método de detección de actividad de NTBo/A, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una NTBo/A, en el que la célula de una línea celular establecida es susceptible de intoxicación por NTBo/A mediante una NTBo/A; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; c) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; en el que la detección mediante el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad de NTBo/A.
- 60 18. Un método de detección de actividad de NTBo/A, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una NTBo/A, en el que la célula de una línea celular establecida es susceptible de intoxicación por NTBo/A mediante una NTBo/A; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; c) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 unido a un soporte de fase sólida, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; en el que la detección mediante el
- 65

complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad de NTBo/A.

19. Un método de detección de actividad de NTBo/A, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una NTBo/A, en el que la célula de una línea celular establecida es susceptible de intoxicación por NTBo/A mediante una NTBo/A; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; c) fijar el componente de SNAP-25 a un soporte de fase sólida; d) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; y e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; en el que la detección mediante el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad de NTBo/A.

20. Un método de detección de actividad de NTBo/A, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una NTBo/A, en el que la célula de una línea celular establecida puede captar NTBo/A; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; c) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; en el que la detección mediante el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad de NTBo/A.

21. Un método de detección de actividad de NTBo/A, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una NTBo/A, en el que la célula de una línea celular establecida puede captar NTBo/A; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; c) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 unido a un soporte de fase sólida, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; en el que la detección mediante el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad de NTBo/A.

22. Un método de detección de actividad de NTBo/A, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una NTBo/A, en el que la célula de una línea celular establecida puede captar NTBo/A; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; c) fijar el componente de SNAP-25 a un soporte de fase sólida; d) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; y e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; en el que la detección mediante el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad de NTBo/A.

23. Un método de determinación de inmunorresistencia a NTBo/A en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una NTBo/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que está sometido a una prueba para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en el que la célula de una línea celular establecida es susceptible de intoxicación por NTBo/A; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; d) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en vez de una muestra de prueba, comprendiendo la muestra de control negativo una NTBo/A y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A; y g) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa e con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa f, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa e con relación a la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa f es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A.

24. Un método de determinación de inmunorresistencia a NTBo/A en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una NTBo/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que está sometido a una prueba para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A; b) tratar una célula de una línea celular

- establecida con la muestra de prueba, en el que la célula de una línea celular establecida es susceptible de intoxicación por NTBo/A; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; d) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 unido a un soporte de fase sólida, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en vez de una muestra de prueba, comprendiendo la muestra de control negativo una NTBo/A y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A; y g) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa e con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa f, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa e con relación a la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa f es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A.
25. Un método de determinación de inmunorresistencia a NTBo/A en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una NTBo/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que está sometiéndose a prueba para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en el que la célula de una línea celular establecida es susceptible de intoxicación por NTBo/A; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; d) fijar el componente de SNAP-25 a un soporte de fase sólida; e) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; f) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; g) repetir las etapas b-f con una muestra de control negativo en vez de una muestra de prueba, comprendiendo la muestra de control negativo una NTBo/A y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A; y h) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa f con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa g, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa f con relación a la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa g es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A.
26. Un método de determinación de inmunorresistencia a NTBo/A en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una NTBo/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que está sometiéndose a prueba para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en el que la célula de una línea celular establecida puede captar NTBo/A; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; d) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en vez de una muestra de prueba, comprendiendo la muestra de control negativo una NTBo/A y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A; y g) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa e con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa f, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa e con relación a la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa f es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A.
27. Un método de determinación de inmunorresistencia a NTBo/A en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una NTBo/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que está sometiéndose a prueba para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en el que la célula de una línea celular establecida puede captar NTBo/A; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; d) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 unido a un soporte de fase sólida, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en vez de una muestra de prueba, comprendiendo la muestra de control negativo una NTBo/A y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A; y g) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa e con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa f, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa e con relación a la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa f es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A.

28. Un método de determinación de inmunorresistencia a NTBo/A en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una NTBo/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que está sometándose a prueba para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en el que la célula de una línea celular establecida puede captar NTBo/A; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A; d) fijar el componente de SNAP-25 a un soporte de fase sólida; e) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25; f) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25; g) repetir las etapas b-f con una muestra de control negativo en vez de una muestra de prueba, comprendiendo la muestra de control negativo una NTBo/A y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A; y h) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa f con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa g, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa f con relación a la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado en la etapa g es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A.
29. El método de los puntos 17-22 y 23-25, en el que la célula es susceptible de intoxicación por NTBo/A mediante aproximadamente 500 pM o menos, mediante aproximadamente 400 pM o menos, mediante aproximadamente 300 pM o menos, mediante aproximadamente 200 pM o menos, mediante aproximadamente 100 pM o menos de una NTBo/A.
30. El método de los puntos 20-22 y 26-28, en el que la célula puede captar aproximadamente 500 pM o menos, mediante aproximadamente 400 pM o menos, mediante aproximadamente 300 pM o menos, mediante aproximadamente 200 pM o menos, mediante aproximadamente 100 pM o menos de NTBo/A.
31. El método de los puntos 17-22, en el que la muestra comprende aproximadamente 100 ng o menos, aproximadamente 10 ng o menos, aproximadamente 1 ng o menos, 100 fg o menos, 10 fg o menos, o 1 fg o menos de una NTBo/A.
32. El método de los puntos 17-22, en el que la muestra comprende aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 100 pM o menos, aproximadamente 10 pM o menos, aproximadamente 1 pM o menos, aproximadamente 100 fM o menos, aproximadamente 10 fM o menos, o aproximadamente 1 fM o menos de una NTBo/A.
33. El método de los puntos 17-28, en el que el anticuerpo α -SNAP-25 es el anticuerpo α -SNAP-25 aislado de los puntos 5-16.
34. El método de los puntos 17-28, en el que la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo se detecta mediante un análisis de inmunotransferencia, un análisis de inmunoprecipitación, un ELISA o un ELISA de tipo sándwich.
35. El método de los puntos 17-28, en el que el método de base inmunológica tiene una relación señal-ruido para la asíntota inferior de al menos 3:1, al menos 5:1, al menos 10:1, al menos 20:1, al menos 50:1, o al menos 100:1.
36. El método de los puntos 17-28, en el que el método de base inmunológica tiene una relación señal-ruido para la asíntota superior de al menos 10:1, al menos 20:1, al menos 50:1, al menos 100:1, al menos 200:1, al menos 300:1, al menos 400:1, al menos 500:1, o al menos 600:1.
37. El método de los puntos 17-28, en el que el método de base inmunológica puede detectar la actividad de CE₅₀ de, por ejemplo, al menos 100 ng, al menos 50 ng, al menos 10 ng, al menos 5 ng, al menos 100 pg, al menos 50 pg, al menos 10 pg, al menos 5 pg, al menos 100 fg, al menos 50 fg, al menos 10 fg, o al menos 5 fg.
38. El método de los puntos 17-28, en el que el método de base inmunológica puede detectar la actividad de CE₅₀ de, por ejemplo, al menos 10 nM, al menos 5 nM, al menos 100 pM, al menos 50 pM, al menos 10 pM, al menos 5 pM, al menos 100 fM, al menos 50 fM, al menos 10 fM, al menos 5 fM, o al menos 1 fM.
39. El método de los puntos 17-28, en el que el método de base inmunológica tiene un LOD de, por ejemplo, 10 pg o menos, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una NTBo/A.
40. El método de los puntos 17-28, en el que el método de base inmunológica tiene un LOD de, por ejemplo, 100 fM o menos, 90 fM o menos, 80 fM o menos, 70 fM o menos, 60 fM o menos, 50 fM o menos, 40 fM o menos, 30 fM o menos, 20 fM o menos, o 10 fM o menos de una NTBo/A.

41. El método de los puntos 17-28, en el que el método de base inmunológica tiene un LOQ de, por ejemplo, 10 pg o menos, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una NTBo/A.

5 42. El método de los puntos 17-28, en el que el método de base inmunológica tiene un LOQ de, por ejemplo, 100 fM o menos, 90 fM o menos, 80 fM o menos, 70 fM o menos, 60 fM o menos, 50 fM o menos, 40 fM o menos, 30 fM o menos, 20 fM o menos, o 10 fM o menos de una NTBo/A.

10 43. El método de los puntos 17-28, en el que el método de base inmunológica pueden distinguir una NTBo/A totalmente activa de una NTBo/A parcialmente activa que tiene el 70% o menos, el 60% o menos, el 50% o menos, el 40% o menos, el 30% o menos, el 20% o menos, o el 10% o menos de la actividad de una NTBo/A totalmente activa.

15 **Ejemplos**

Ejemplo I

Examen de líneas celulares candidatas

20 El siguiente ejemplo ilustra cómo identificar líneas celulares establecidas susceptibles de intoxicación por NTBo/A o que tienen capacidad de captación de NTBo/A requerida para un método de detección de actividad de NTBo/A dado a conocer en la presente memoria descriptiva.

25 *1. Crecimiento de cultivo madre para líneas celulares candidatas.*

Para hacer crecer las líneas celulares, se sembró en placa una densidad adecuada de células de la línea celular que estaba sometiendo a prueba en un matraz de cultivo tisular de 162 cm² que contenía 30 ml de un medio de crecimiento adecuado (véase la tabla 1) y se hizo crecer en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% o al 10% hasta que las células alcanzaron la densidad deseada.

30

Tabla 1. Medios usados en el examen de líneas celulares	
Línea celular	Composición de los medios de crecimiento en suero
Kelly SiMa	RPMI 1640, suero bovino fetal al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%, L-glutamina 2 mM
NB69	RPMI 1640, suero bovino fetal al 15%, penicilina-estreptomicina al 1%
CHP-126	RPMI 1640, suero bovino fetal al 20%, penicilina-estreptomicina al 1%
N4TG3	RPMI 1640, suero bovino fetal al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%, 6-tioguanina 100 µM
MHH-NB-11	RPMI 1640, suero bovino fetal al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM
PC 12	RPMI 1640, suero bovino fetal inactivado por calor al 5%, suero equino al 10%, GlutaMAX™ 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina-estreptomicina al 1%
N18TG2	DMEM (11885-084, Gibco), suero bovino fetal al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%; 6-tioguanina 100 µM
N1E-115 N18 ND8/34 NG108-15 NG115-401L NS20Y SK-N-SH	DMEM al 90%, suero bovino fetal inactivado por calor al 10%, glutamina 2 mM, glucosa 2 mM
SK-N-DZ SK-N-F1	DMEM al 90%, suero bovino fetal inactivado por calor al 10%, glutamina 4 mM, glucosa 4 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, NaHCO ₃ 1,5 g/l
BE(2)-C BE(2)-M17 CHP-212 LA-1-55n LA-N-1 MC-1XC SK-N-BE(2) SH-SY5Y	EMEM (11090-081, Gibco), F12 de Ham (11765-054, Gibco), suero bovino fetal inactivado por calor al 10%, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM
NB1 1A3	F10 de Ham (12471-017, Gibco), suero bovino fetal inactivado por calor al 2,5%, suero equino inactivado por calor al 15%, glutamina 2 mM
Neuro-2a	EMEM, suero bovino fetal inactivado por calor al 10%, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, NaHCO ₃ 1,5 g/l, piruvato de sodio 1 mM

2. Examen de dosis única de líneas celulares candidatas usando NTBo/A 1 nM.

Un parámetro sometido a prueba para mejorar la sensibilidad de un ensayo basado en células fue identificar líneas celulares adecuadas que mostraban buena capacidad para la captación de una neurotoxina clostridial y para adherirse a una superficie de sustrato. Inicialmente, se sometieron a prueba las líneas celulares para determinar su capacidad para la captación de NTBo/A 1 nM y su capacidad para unirse a una superficie. Para determinar si una línea celular podía captar NTBo/A 1 nM, se sembró en placa una densidad adecuada de células de un cultivo madre de la línea celular que estaba sometiéndose a prueba en los pocillos de placas de cultivo tisular de 24 pocillos que contenían 1 ml de un medio de crecimiento en suero apropiado (tabla 1). Se hicieron crecer las células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que las células alcanzaron la densidad deseada (aproximadamente de 18 a 24 horas). Se aspiraron los medios de crecimiento de cada pocillo y se sustituyeron por o bien 1) medios de crecimiento recién preparados que no contenían toxina (línea celular no tratada) o 2) medios de crecimiento recién preparados que contenían 1 nM de un complejo de NTBo/A (línea celular tratada). Tras una incubación durante la noche, se lavaron las células mediante la aspiración de los medios de crecimiento y el aclarado de cada pocillo con 200 µl de PBS 1 x. Para recoger las células, se aspiró el PBS 1 x, se lisaron las células mediante la adición de 50 µl de tampón de carga de SDS 2 x, se transfirió el lisado a un tubo de ensayo limpio y se calentó la muestra hasta 95°C durante 5 minutos.

Para detectar la presencia tanto del sustrato de SNAP-25 no cortado como de los productos de SNAP-25 cortados, se analizó una alícuota de cada muestra recogida mediante inmunotransferencia de tipo Western. En este análisis, se separó una alícuota de 12 µl de la muestra recogida mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida – MOPS usando geles de poli(acrilamida prefabricados de Bis-Tris al 12% NuPAGE® Novex (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) en condiciones reductoras, de desnaturalización. Se transfirieron los péptidos separados desde el gel a membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) mediante inmunotransferencia de tipo Western usando un aparato celular de transferencia electroforética semiseca Trans-Blot® SD (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se bloquearon las membranas de PVDF mediante incubación a temperatura ambiente durante 2 horas en una disolución que contenía solución salina tamponada con Tris (TBS) (ácido 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol-clorhídrico 25 mM (Tris-HCl) (pH 7,4), cloruro de sodio 137 mM, cloruro de potasio 2,7 mM, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano), albúmina sérica bovina (BSA) al 2% y leche desnatada en polvo al 5%. Se incubaron las membranas bloqueadas a 4°C durante la noche en TBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano), BSA al 2% y leche desnatada en polvo al 5% que contenía o bien 1) una dilución 1:5.000 de un anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 como anticuerpo primario (SMI-81; Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD); o 2) una dilución 1:5.000 de antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25, S9684, como anticuerpo primario (Sigma, San Luis, MO). Tanto los anticuerpos policlonales de conejo como los monoclonales de ratón α-SNAP-25 pueden detectar tanto el sustrato de SNAP-25 no cortado como el producto cortado de SNAP-25, permitiendo la evaluación de la expresión global de SNAP-25 en cada línea celular y el porcentaje de SNAP-25 cortado tras el tratamiento con NTBo/A como parámetro para evaluar la cantidad de captación de NTBo/A. Se lavaron las inmunotransferencias tratadas con sonda de anticuerpo primario tres veces durante 15 minutos cada vez en TBS, TWEEN-20® (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Se incubaron las membranas lavadas a temperatura ambiente durante 2 horas en TBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano), BSA al 2% y leche desnatada en polvo al 5% que contenía o bien 1) una dilución 1:10.000 de anticuerpo policlonal de cabra anti-cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina G (IgG, H+L) de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Zymed, South San Francisco, CA) como anticuerpo secundario; o 2) una dilución 1:10.000 de anticuerpo policlonal de cabra anti-cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina G (IgG, H+L) de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Zymed, South San Francisco, CA) como anticuerpo secundario. Se lavaron las inmunotransferencias tratadas con sonda de anticuerpo secundario tres veces durante 15 minutos cada vez en TBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Se visualizó la detección de señales de los productos de SNAP-25 marcados usando el sistema de detección de inmunotransferencia de tipo Western ECL Plus™ (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se obtuvieron imágenes de la membrana y el porcentaje de producto cortado cuantificado con un software de análisis de generador de imágenes y generador de imágenes en modo variable Typhoon 9410 (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La elección del tamaño de píxeles (de 100 a 200 píxeles) y los ajustes de tensión de PMT (de 350 a 600, normalmente 400) dependieron de la inmunotransferencia individual. La tabla 2 indica las líneas celulares en las que se detectó un producto de corte de SNAP-25 cuando se trataron con NTBo/A 1 nM. Las siguientes líneas celulares mostraron tanto una captación de NTBo/A 1 nM como la unión apropiada a una superficie de sustrato: BE(2)-M17, IMR-32, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa y SK-N-BE(2)-C.

Para determinar si una línea celular podía unirse a una superficie, se sembró en placa una densidad adecuada de células de un cultivo madre de la línea celular que estaba sometiéndose a prueba en los pocillos de placas de cultivo tisular de 24 pocillos que contenían 1 ml de un medio de crecimiento apropiado (tabla 1). Se hicieron crecer las células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que las células alcanzaron la densidad deseada (aproximadamente de 18 a 24 horas). Se evaluó la unión celular mediante el porcentaje de células que se adherían a la superficie del pocillo inferior de la placa tisular con relación al número total de células sembradas. Las líneas celulares CHP-126, IMR-32, LA-N-1, MC-IXC, NG115-401L, SK-N-BE(2)-C, SK-N-F1 y SK-N-MC se consideraron no adecuadas porque cada línea celular mostró una unión de menos del 50% (tabla 2). El resto de las líneas celulares

mostraron características de unión celular adecuadas (tabla 2).

Tabla 2. Examen de dosis única de líneas celulares candidatas usando NTBo/A 1 nM.				
Línea celular	Descripción	Fuente	Captación de NTBo/A 1 nM	Unión
BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2268	No	>60%
BE(2)-M17	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2267	Sí	>60%
CHP-126	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 304	No	<50%
CHP-212	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2273	No	>60%
HCN-1a	Neurona cortical cerebral	ATCC CRL-10442	No	>60%
HCN-2	Neurona cortical cerebral	ATCC CRL-10742	No	>60%
IMR-32	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-127	Sí	<50%
Kelly	Neuroblastoma humano	ECACC 92110411	Sí	>60%
Kelly	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 355	Sí	>60%
LA1-55n	Neuroblastoma humano	ECACC 06041203	Sí	>60%
LA-N-1	Neuroblastoma humano	ECACC 06041201	-	<25%
MC-IXC	Neuroepitelioma humano	ATCC CRL-2270	-	<25%
MHH-NB-11	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 157	No	>60%
N1E-115	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-2263	Sí	>60%
N4TG3	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 101	No	>60%
N18TG2	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 103	No	>60%
NB4 1A3	Neuroblastoma de ratón	ECACC 89121405	No	>60%
ND3	Híbrido de neuroblastoma de ratón/DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090901	No	>60%
ND7/23	Híbrido de neuroblastoma de ratón/DRG de rata primario	ECACC 92090903	No	>60%
ND8	Híbrido de neuroblastoma de ratón/DRG de rata neonatal primario	ATCC	No	>60%
ND8/34	Neuroblastoma de ratón	ECACC 92090904	No	>60%
ND15	Híbrido de neuroblastoma de ratón/DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090907	No	>60%
ND27	Híbrido de neuroblastoma de ratón/DRG de rata primario	ECACC 92090912	No	>60%
NB69	Neuroblastoma humano	ECACC 99072802	No	>60%
NDC	Híbrido de neuroblastoma de ratón/DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090913	No	>60%
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-131	Sí	>60%
NG108-15	Híbrido de neuroblastoma de ratón/glioma de rata	ECACC 88112302	Sí	>60%
NG115-401L	Híbrido de neuroblastoma de ratón/glioma de rata	ECACC 87032003	No	<50%
NS20Y	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 94	No	>60%
PC12	Feocromocitoma de rata	ATCC CRL-1721	Sí	>60%
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266	Sí	>60%
SIMa	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 164	Sí	>60%
SK-N-BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CR-2271	Sí	<50%
SK-N-AS	Neuroblastoma humano	ATCC CR-2137	No	>60%
SK-N-DZ	Neuroblastoma humano	ATCC CR-2149	No	>60%
SK-N-F1	Neuroblastoma humano	ATCC CR-2142	No	<50%
SK-N-MC	Neuroblastoma humano	ATCC HTB-10	-	<25%
SK-N-SH	Neuroblastoma humano	ECACC 86012802	No	>60%
TE 189.T	Médula espinal	ATCC CRL-7947	No	>60%

Ejemplo II

5

Evaluación de las condiciones de crecimiento sobre la captación de neurotoxina en líneas celulares candidatas

El siguiente ejemplo ilustra cómo determinar las condiciones de crecimiento para líneas celulares establecidas que maximizan la condición de ser susceptibles de intoxicación por NTBo/A o tener la capacidad de captación de NTBo/A.

10

1. Efectos de la diferenciación celular sobre la captación de neurotoxina de líneas celulares candidatas.

Para determinar si la diferenciación celular mejoraba la captación de neurotoxina, se transfirieron líneas celulares que mostraban captación de NTBo/A 1 nM a medio libre de suero para inducir la diferenciación. Se sembró en placa una densidad adecuada de células de un cultivo madre de la línea celular que estaba sometándose a prueba en los pocillos de placas de cultivo tisular de 24 pocillos que contenían 1 ml de un medio libre de suero que contenía medio esencial mínimo con GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, 100 unidades/ml de penicilina y estreptomycin 100 µg/ml. Se incubaron estas células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que se diferenciaron las células, tal como se evaluó mediante criterios morfológicos convencionales y de rutina, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente de 2 a 3 días). Como control, se sembró en placa una densidad adecuada de células de un cultivo madre de la línea celular que estaba sometándose a prueba en los pocillos de placas de cultivo tisular de 24 pocillos que contenían 1 ml de un medio de crecimiento apropiado (tabla 1). Se hicieron crecer estas células control no diferenciadas en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que las células alcanzaron la densidad deseada (aproximadamente de 18 a 24 horas). Se aspiraron los medios de los cultivos control tanto diferenciados como no diferenciados de cada pocillo y se sustituyeron por medios recién preparados que contenían o bien 0 (muestra no tratada), 0,1 nM, 0,3 nM o bien 1 nM de un complejo de NTBo/A. Tras una incubación durante la noche, se lavaron las células y se recogieron tal como se describe en el ejemplo I.

Para detectar la presencia de productos de SNAP-25 cortados, se analizó una alícuota de cada muestra recogida mediante inmunotransferencia de tipo Western tal como se describe en el ejemplo I, excepto porque se separan las muestras recogidas mediante SDS-PAGE usando geles Criterion de 26 pocillos al 12% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y se usó el suero de anticuerpo policlonal de conejo α -SNAP-25₁₉₇ como anticuerpo primario (véase el ejemplo IV). La tabla 3 indica las líneas celulares que mostraron un producto de corte de SNAP-25 cuando se trataron con NTBo/A 0,1 nM. De las líneas celulares sometidas a prueba, sólo las líneas celulares SiMa y Neuro-2a mostraron una captación de NTBo/A 0,1 nM en el estado no diferenciado. Sin embargo, además de SiMa y Neuro-2a, las líneas celulares N18, LA1-55n, PC12 y SH-SY5Y mostraron todas ellas una captación de NTBo/A 0,1 nM en el estado diferenciado.

Tabla 3. Efectos de la diferenciación celular sobre la captación de neurotoxina de líneas celulares candidatas.

Línea celular	Descripción	Fuente	Captación de NTBo/A 0,1 nM	
			No diferenciadas	Diferenciadas
BE(2)-M17	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2267	No	No
Kelly	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 355	No	No
LA1-55n	Neuroblastoma humano	ECACC 06041203	No	Sí
N1E-115	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-2263	No	No sometida a prueba
N4TG3	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 101	No	No sometida a prueba
N18	Híbrido de neuroblastoma de ratón/glioma de rata	ECACC 88112301	No	Sí
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-131	Sí	Sí
NG108-15	Híbrido de neuroblastoma de ratón/glioma de rata	ECACC 88112302	Sí	No sometida a prueba
PC12	Feocromocitoma de rata	ATCC CRL-1721	No	Sí
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266	No	Sí
SiMa	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 164	Sí	Sí
SK-N-BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CR-2271	Sí	No sometida a prueba

2. Efectos del tratamiento con gangliósido sobre la captación de neurotoxina de líneas celulares candidatas diferenciadas.

Para determinar si tratamientos que mejoran la unión de baja afinidad de la neurotoxina podrían mejorar la captación de neurotoxina, se trataron con gangliósido GT1b líneas celulares diferenciadas que mostraban la captación de NTBo/A 1 nM. Se sembró en placa una densidad adecuada de células de un cultivo madre de la línea celular que estaba someténdose a prueba en los pocillos de placas de cultivo tisular de 24 pocillos que contenían medio libre de suero tal como se describió anteriormente, con o sin GT1b 25 µg/ml (Alexis Biochemicals, San Diego, CA). Se incubaron estas células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que se diferenciaron las células, tal como se evaluó mediante criterios morfológicos convencionales y de rutina tal como se describió anteriormente. Se aspiraron los medios de cada pocillo y se sustituyeron por medios libres de suero recién preparados que contenían cualquiera de 0 (muestra no tratada), 1,9 pM, 3,7 pM, 7,4 pM, 14,8 pM, 29,7 pM, 59,4 pM, 118,8 pM, 237,5 pM, 574 pM, 950 pM y 1900 pM de un complejo de NTBo/A. Se incubaron las líneas celulares en dos momentos diferentes, a las 24 horas y a las 48 horas. Tras la incubación con toxina, se lavaron las células y se recogieron tal como se describe en el ejemplo I.

5 Para detectar la presencia de productos de SNAP-25 cortados, se analizó una alícuota de cada muestra recogida mediante inmunotransferencia de tipo Western tal como se describe en el ejemplo I, excepto porque se separan las muestras recogidas mediante SDS-PAGE usando geles Criterion de 26 pocillos al 12% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y se usó el suero de anticuerpo policlonal de conejo α -SNAP-25₁₉₇ como anticuerpo primario (véase el ejemplo IV). La tabla 4 indica los efectos del tratamiento con gangliósidos sobre la capacidad de las líneas celulares diferenciadas para captar NTBo/A. Estos resultados indican la menor concentración de NTBo/A que producirá una banda detectable de producto de corte de SNAP-25 en la inmunotransferencia de tipo Western.

Tabla 4. Efectos del tratamiento con gangliósido sobre la captación de neurotoxina de líneas celulares candidatas diferenciadas.

Línea celular	Descripción	Fuente	Captación de NTBo/A	
			Incubación de 24 horas	Incubación 48 horas
BE(2)-M17	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2267	237,5 pM	118,8 pM
Kelly	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 355	No sometida a prueba	No sometida a prueba
LA1-55n	Neuroblastoma humano	ECACC 06041203	15 pM	7,4 pM
N1E-115	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-2263	No sometida a prueba	No sometida a prueba
N4TG3	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 101	No sometida a prueba	No sometida a prueba
N18	Híbrido de neuroblastoma de ratón/glioma de rata	ECACC 88112301	14,8 pM	7,4 pM
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-131	7,4 pM	7,4 pM
NG108-15	Híbrido de neuroblastoma de ratón/glioma de rata	ECACC 88112302	No sometida a prueba	No sometida a prueba
PC12	Feocromocitoma de rata	ATCC CRL-1721	7,4 pM	7,4 pM
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266	No sometida a prueba	No sometida a prueba
SiMa	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 164	1,9 pM	1,9 pM
SK-N-BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CR-2271	No sometida a prueba	No sometida a prueba

10 **3. Desarrollo de medios libres de suero con propiedades de diferenciación celular que potenciaban la captación de neurotoxina de líneas celulares candidatas.**

15 Para determinar si las mejoras de tratamiento que inducen diferenciación celular podrían mejorar la captación de neurotoxina, se hicieron crecer las líneas celulares SiMa, Neuro-2a y PC12 en diversos medios libres de suero para inducir diferenciación. Se sembró en placa una densidad adecuada de células de un cultivo madre de la línea celular que estaba sometándose a prueba en los pocillos de placas de cultivo tisular de 24 pocillos que contenían 1 ml de diversos medios libres de suero de prueba. Los parámetros sometidos a prueba fueron 1) el efecto de diferentes medios basales sobre la captación de NTBo/A (MEM y RPMI 1649); 2) el efecto de la presencia o ausencia de factores neurotróficos sobre la captación de NTBo/A (suplemento N2 y suplemento B27); 3) el efecto de la presencia o ausencia de factores de diferenciación sobre la captación de NTBo/A (ácido retinoico y factor de crecimiento nervioso); y 4) el efecto de la presencia o ausencia de suero sobre la captación de NTBo/A (medios libres de suero y medios con suero reducido). Como control, se sembró en placa una densidad adecuada de células de un cultivo madre de la línea celular que estaba sometándose a prueba en los pocillos de placas de cultivo tisular de 24 pocillos que contenían 1 ml de medios libres de suero control (medio esencial mínimo, GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, 100 unidades/ml de penicilina y estreptomocina 100 µg/ml). Se incubaron estas células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que se diferenciaron las células, tal como se evaluó mediante criterios morfológicos convencionales y de rutina, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente de 2 a 3 días). Se aspiraron los medios de cada pocillo y se sustituyeron por medios libres de suero recién preparados que contenían cualquiera de 0 (muestra no tratada), 0,005 pM, 0,015 pM, 0,05 pM, 0,14 pM, 0,42 pM, 1,2 pM, 3,7 pM, 11 pM, 33 pM, 100 pM y 300 pM de un complejo de NTBo/A. Además, se trataron las células no diferenciadas con NTBo/A durante 24 h seguido por un cambio de medio e incubación de 48 h en medios recién preparados sin toxina para permitir la acumulación de producto de corte de SNAP-25. Entonces se lavaron las células y se recogieron tal como se describe en el ejemplo I.

Tabla 5. Medios libres de suero usados para diferenciar líneas celulares.

Línea celular	Composición de medios libres en suero de prueba
LA1-55n	Medio esencial mínimo con GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM, suplemento N2 1 x y suplemento B27 1 x

Neuro-2a	Medio esencial mínimo con GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, suplemento B27 1 x, suplemento N2 1 x, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM
PC12	RPMI 1640, GlutaMAX™ I 2 mM, suplemento B27 1 x, suplemento N2 1 x, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina-estreptomina al 1% y factor de crecimiento nervioso 50 ng/ml
SiMa	Medio esencial mínimo con GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, suplemento B27 1 x, suplemento N2 1 x, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM

Para detectar la presencia de un producto de corte de SNAP-25, se analizó una alícuota de cada muestra recogida mediante inmunotransferencia de tipo Western tal como se describe en el ejemplo I, excepto porque se separan las muestras recogidas mediante SDS-PAGE usando geles Criterion de 26 pocillos al 12% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y se usó un suero de anticuerpo policlonal de conejo α -SNAP-25 (véase el ejemplo IV). Los medios más optimizados determinados para cada línea celular se muestran en la tabla 5. La tabla 6 indica la cantidad inferior de un producto de corte de SNAP-25 detectado cuando se hicieron crecer las líneas celulares en este medio libre de suero optimizado. El uso del medio libre de suero optimizado dio como resultado la detección de señales de actividad de NTBo/A con relaciones señal-ruido aceptables en las líneas celulares LA1-55n, Neuro-2a, PC-12 y SiMa (figura 2). Por ejemplo, las condiciones de diferenciación optimizadas dieron como resultado un aumento de 5 veces en la detección del producto de corte de SNAP-25 en comparación con los medios libres de suero control para las células Neuro-2a y PC12, y casi de 50 veces para las células SiMa. Además, se requiere una relación señal-ruido mínima de 3:1 para la asíntota inferior y de 10:1 para la asíntota superior para desarrollar un ensayo robusto susceptible de validación. Con la excepción de LA-1-55n, todas las líneas celulares optimizadas proporcionaron una relación señal-ruido para la asíntota inferior de al menos 3:1 cuando se comparó la señal detectada a partir de la dosis de 1,2 pM con la señal del fondo de NTBo/A 0 pM (figura 2). Además, todas las líneas celulares optimizadas proporcionaron una relación señal-ruido para la asíntota superior de al menos 100:1 cuando se comparó la señal procedente de la dosis de 300 pM con la señal del fondo de NTBo/A 0 pM (figura 2). Estos resultados indican que podría usarse cualquiera de estas líneas celulares para desarrollar un método de base inmunológica para detectar actividad de NTBo/A tal como se da a conocer en la presente memoria descriptiva porque el ensayo estaba detectando la presencia de cantidades pM de NTBo/A.

Línea celular	Descripción	Fuente	Captación de NTBo/A	
			Medios libres de suero control	Medios libres de suero optimizados
BE(2)-M17	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2267	No sometida a prueba	No sometida a prueba
Kelly	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 355	No sometida a prueba	No sometida a prueba
LA1-55n	Neuroblastoma humano	ECACC 06041203	7,4 pM	3,7 pM
N1E-115	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-2263	No sometida a prueba	No sometida a prueba
N4TG3	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 101	No sometida a prueba	No sometida a prueba
N18	Híbrido de neuroblastoma de ratón/glioma de rata	ECACC 88112301	No sometida a prueba	No sometida a prueba
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-131	3,7 pM	0,8 pM
NG108-15	Híbrido de neuroblastoma de ratón/glioma de rata	ECACC 88112302	No sometida a prueba	No sometida a prueba
PC12	Feocromocitoma de rata	ATCC CRL-1721	2,0 pM	0,42 pM
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266	No sometida a prueba	No sometida a prueba
SiMa	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 164	0,23 pM	0,005 pM
SK-N-BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CR-2271	No sometida a prueba	No sometida a prueba

Ejemplo III

Desarrollo de anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 que se unen selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A

El siguiente ejemplo ilustra cómo obtener anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A.

1. Generación de anticuerpos monoclonales α -SNAP-25.

Para desarrollar anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25, se diseñó el péptido CDSNKTRIDEANQ_{COOH} (SEQ ID NO: 38) de 13 residuos como un antígeno de producto de corte de SNAP-25. Este péptido comprende una región de ligador flexible y un residuo de cisteína N-terminal para la conjugación con KLH y los aminoácidos 186-197 de SNAP-25 humana (SEQ ID NO: 5) con una glutamina C-terminal carboxilada (SEQ ID NO: 38). La generación de anticuerpos monoclonales frente a secuencias peptídicas únicas, bien elegidas, proporciona control con respecto a la especificidad de epítipo, permitiendo la identificación de una subpoblación particular de proteínas entre un conjunto de isoformas estrechamente relacionadas. Las búsquedas en Blast revelaron que este péptido tiene alta homología sólo con SNAP-25 y casi no es posible la reactividad cruzada con otras proteínas en células neuronales. La secuencia también se inspeccionó cuidadosamente mediante la utilización de algoritmos informáticos para determinar el índice de hidropatía, la probabilidad de superficie de proteína, las regiones de flexibilidad y la estructura secundaria favorable, seguido por la orientación y presentación apropiadas de la secuencia peptídica elegida. Se sintetizó el péptido y se conjugó con hemocianina de lapa californiana (KLH) para aumentar la inmunogenicidad. Se inmunizaron seis ratones Balb/c con este péptido y tras tres inmunizaciones en aproximadamente ocho semanas, se extrajo sangre de los ratones para someterla a prueba. Se permitió que la sangre coagulara mediante incubación a 4°C durante 60 minutos. Se centrifugó la sangre coagulada a 10.000 x g a 4°C durante 10 minutos para sedimentar los residuos celulares. Se dispensó la muestra de suero resultante en alícuotas de 50 μ l y se almacenaron a -20°C hasta que se necesitaron.

Se usa una estrategia similar basada en otros antígenos de SNAP-25 dados a conocer en la presente memoria descriptiva para desarrollar anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25. Por ejemplo, el antígeno de SNAP-25 de SEQ ID NO: 45 puede conjugarse con KLH en vez del antígeno de SNAP-25 de SEQ ID NO: 38. Como otro ejemplo, los aminoácidos 186-197 de SNAP-25 humana del antígeno de SNAP-25 de SEQ ID NO: 38 pueden sustituirse por SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44.

2. Examen para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales α -SNAP-25.

Para determinar la presencia de un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A, se realizaron ELISA comparativo y ensayo de corte basado en células usando el suero de ratón extraído. Para el ELISA comparativo, se construyeron dos proteínas de fusión: BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ de SEQ ID NO: 48 y BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ de SEQ ID NO: 49. BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ comprendía un péptido de BirA de 16 aminoácidos biotinilados de manera natural de SEQ ID NO: 50 unido en el extremo amino-terminal a un péptido de SNAP-25 que comprendía los aminoácidos 134-197 de SEQ ID NO: 5. BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ comprendía un péptido de Bir de 16 aminoácidos biotinilados de manera natural de SEQ ID NO: 50 unido en el extremo amino-terminal a un péptido de SNAP-25 que comprendía los aminoácidos 134-206 de SEQ ID NO: 5. Se suspendieron estos dos sustratos en PBS 1 x a una concentración de BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ 10 μ g/ml y el BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆. Se recubrieron el BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ y el BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ sobre placas separadas mediante la adición de aproximadamente 100 μ l de la disolución de sustrato adecuada y la incubación de las placas a temperatura ambiente durante una hora. Se incubaron las placas lavadas a 37°C durante una hora en BSA al 0,5% en TBS 1 x que contenía una dilución de 1:10 a 1:100 de un suero que contenía anticuerpos derivado de uno de los seis ratones inmunizados (ratón 1, ratón 2, ratón 3, ratón 4, ratón 5 y ratón 6). Se lavaron las placas tratadas con sonda de anticuerpo primario cuatro veces durante 5 minutos cada vez en 200 μ l de TBS, TWEEN-20[®] al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Se incubaron las placas lavadas a 37°C durante 1 hora en TBS 1 x que contenía una dilución 1:10.000 de anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) como anticuerpo secundario. Se lavaron las placas tratadas con sonda de anticuerpo secundario cuatro veces en 200 μ l de TBS, TWEEN-20[®] al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Se visualizó la detección cromogénica de los productos de SNAP-25 marcados mediante detección cromogénica usando el kit de sustrato de TMB ImmunoPure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). El desarrollo de un color amarillo en las placas recubiertas con BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇, pero no en las placas recubiertas con BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆, indicó que el anticuerpo α -SNAP-25 reconocía preferentemente el producto de corte de SNAP-25₁₉₇. Los resultados indicaron que de los seis ratones usados para la inmunización, tres ratones (ratón 2, ratón 3 y ratón 4) tuvieron títulos superiores y más especificidad hacia un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A.

Estos resultados se confirmaron usando un ensayo de actividad de cadena ligera de ELISA. Se prepararon placas recubiertas con estreptavidina Reacti-Bind de 96 pocillos (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) mediante la adición de aproximadamente 100 μ l de la siguiente disolución de sustrato: Se recubrieron las filas A-C con 100 μ l de BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ a doce concentraciones diferentes; se recubrieron las filas D-H con 100 μ l de BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ a 10 μ g/ml. Se lavaron las placas mediante la aspiración de la disolución de sustrato y el aclarado de

5 cada pocillo tres veces con 200 μ l de TBS, TWEEN-20[®] al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Se redujeron previamente las diluciones de NTBo/A a 37°C durante 20 minutos en tampón de incubación de NTBo/A (HEPES 50 mM, pH 7,4, suero bovino fetal al 1%, ZnCl₂ 10 μ M, ditiotreitól 10 mM) y se añadieron 100 μ l de la NTBo/A reducida previamente a las placas recubiertas con sustrato y se incubaron a 37°C durante 90 minutos. Se lavaron las placas tratadas con NTBo/A mediante la aspiración del tampón de incubación de NTBo/A y el aclarado de cada placa tres veces con 200 μ l de TBS, TWEEN-20[®] al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Se incubaron las placas lavadas a 37°C durante una hora en BSA al 0,5% en TBS 1 x que contenía una dilución de 1:10 a 1:100 del suero que contenía anticuerpos que estaba sometiendo a prueba. Se lavaron las placas tratadas con sonda de anticuerpo primario cuatro veces durante 5 minutos cada vez en 200 μ l de TBS, TWEEN-20[®] al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Se incubaron las placas lavadas a 37°C durante 1 hora en TBS 1 x que contenía una dilución 1:10.000 de anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) como anticuerpo secundario. Se lavaron las placas tratadas con sonda de anticuerpo secundario cuatro veces en 200 μ l de TBS, TWEEN-20[®] al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Se visualizó la detección cromogénica de los productos de SNAP-25 marcados mediante detección cromogénica usando el kit de sustrato de TMB ImmunoPure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se detectó el desarrollo de un color amarillo, que se correlacionó con la presencia del producto de corte de SNAP-25₁₉₇ en las muestras tratadas con NTBo/A, pero no en los controles no tratados, usando suero que contenía anticuerpos derivado de los seis ratones inmunizados (ratón 1, ratón 2, ratón 3, ratón 4, ratón 5 y ratón 6). Por tanto, el análisis de ELISA análisis comparativo indicó que de los ratones usados para la inmunización, tres ratones (ratón 2, ratón 3 y ratón 4) tuvieron títulos superiores y más especificidad hacia un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A.

25 Para el ensayo de corte basado en células, se sembró en placa una densidad adecuada de células PC12 en placas de cultivo tisular de 60 mm² que contenían 3 ml de un medio de suero apropiado (tabla 1). Se hicieron crecer las células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que las células alcanzaron la densidad apropiada. Se prepararon 500 μ l de una disolución de transfección mediante la adición de 250 μ l de medio con suero reducido OPTI-MEM que contenía 15 μ l de LipofectAmine 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA), incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos a 250 μ l de medio con suero reducido OPTI-MEM que contenía 10 μ g de un constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (SEQ ID NO: 51). El constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC comprende un vector de expresión pQBI-25 (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA) cuyos elementos promotores están funcionalmente unidos a un polinucleótido que codifica para la cadena ligera de GFP-NTBo/A de SEQ ID NO: 52. Se incubó esta mezcla de transfección a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. Se sustituyeron los medios por medios no suplementados recién preparados y se añadieron los 500 μ l de disolución de transfección a las células. Entonces se incubaron las células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% durante aproximadamente de 6 a 18 horas. Se lavaron las células y se recogieron tal como se describe en el ejemplo II. Para detectar la presencia del producto de SNAP-25₁₉₇ cortado, se analizó una alícuota de cada muestra recogida mediante inmunotransferencia de tipo Western tal como se describe en el ejemplo II, excepto porque el anticuerpo primario usado fue una dilución 1:1.000 del suero que contenía anticuerpos y el anticuerpo secundario usado fue una dilución 1:20.000 de anticuerpo de ratón α -IgG conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se detectó una única banda correspondiente al producto de corte de SNAP-25₁₉₇ en las muestras tratadas con NTBo/A, pero no en los controles no tratados, usando suero que contenía anticuerpos derivado de tres ratones (ratón 2, ratón 3 y ratón 4). Por tanto, el ensayo de corte basado en células indicó que de los ratones usados para la inmunización, tres ratones (ratón 2, ratón 3 y ratón 4) tuvieron títulos superiores y más especificidad hacia un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A.

3. Producción de hibridomas.

50 Para obtener hibridomas que producen anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A, se recogió el bazo del ratón 2 tres días después de una inmunización “de refuerzo” final y se fusionaron las células de bazo con células de mieloma P3-X63 Ag8.653 usando protocolos de hibridoma convencionales. Se sembraron en placa estas células en cinco placas de 96 pocillos y se seleccionaron los híbridos usando medio HAT. En el plazo de 8-14 días tras la fusión, se llevó a cabo el primer examen de los 55 aproximadamente 480 clones originales usando ELISA comparativo con los péptidos BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ y BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ recubiertos en dos placas separadas. El ELISA comparativo proporcionó un método de examen rápido para identificar los hibridomas que producen anticuerpos específicos para la SNAP-25₁₉₇ cortada. Se sometieron los 18 clones superiores a examen adicional usando el ensayo de corte basado en células descrito anteriormente e inmunotinción de células transfectadas con LC/A (tabla 7).

Tabla 7. Análisis de sobrenadantes que contienen el anticuerpo monoclonal α -SNAP-25						
Clon	ELISA comparativo				Ensayo basado en células	
	DO SNAP-25 ₁₉₇	DO SNAP-25 ₂₀₆	Razón _{197/206}	Razón _{206/197}	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆
1D3	1,805	0,225	8,02	0,13	+++	-

1F12	0,365	0,093	3,92	0,25	-	-
1G10	0,590	0,137	4,31	0,23	++	-
1H1	0,335	0,121	2,77	0,36	-	-
1H8	0,310	0,302	1,03	0,97	+	-
2C9	0,139	0,274	0,51	1,97	-	-
2E2	0,892	0,036	24,78	0,04	++	-
2E4	0,228	0,069	3,30	0,30	+	-
2F11	1,095	1,781	0,61	1,63	-	-
3C1	1,268	0,053	23,92	0,04	++	-
3C3	0,809	0,052	15,56	0,06	++	-
3E1	0,086	0,155	0,55	1,80	0	-
3E8	2,048	0,053	38,64	0,03	+++	-
3G2	0,053	0,158	0,34	2,98	-	-
4D1	0,106	0,218	0,49	2,06	-	-
4G6	0,061	0,159	0,38	2,61	-	-
5A5	0,251	0,106	2,37	0,42	+	-
5F11	0,243	0,061	3,98	0,25	-	-

Los clones 1D3, 1G10, 2E2, 3C1, 3C3 y 3E8 se clonaron adicionalmente mediante dilución limitante porque los medios condicionados producidos por estos clones comprendían anticuerpos α -SNAP-25 con una especificidad de unión preferente que tenía una razón^{197/206} de al menos 4:1 para el producto de corte de SNAP-25¹⁹⁷ con relación al sustrato no cortado de SNAP-25²⁰⁶ y el producto de corte de SNAP-25¹⁹⁷ detectado usando el ensayo de corte basado en células y la inmunotinción de células PC12 transfectadas con GFP-LC/A. De manera similar, los clones 2C9, 2F11, 3G2, 4D1 y 4G6 se clonaron adicionalmente mediante dilución limitante porque los medios condicionados producidos mediante estos clones comprendían anticuerpos α -SNAP-25 con una especificidad de unión preferente que tenía una razón^{206/197} de al menos 1,5:1 para el sustrato no cortado de SNAP-25²⁰⁶ con relación al producto de corte de SNAP-25¹⁹⁷ y el sustrato no cortado de SNAP-25²⁰⁶ usando el ensayo de corte basado en células. Se examinaron de nuevo estos clones derivados de células individuales usando ELISA comparativo, corte basado en células e inmunotinción para confirmar su afinidad y especificidad, y se obtuvo el isotipo de los anticuerpos usando procedimientos convencionales. Se produjeron líquidos ascíticos a partir de los clones 1D3B8 (IgM.k), 1G10A12 (IgG3.k), 2C9B10 (IgG3.k), 2E2A6 (IgG3.k), 2F11B6 (IgM.k), 3C1A5 (IgG2a.k) y 3C3E2 (IgG2a.k). El clon 3E8 dejó de producir anticuerpos durante el proceso de clonación y no pudo evaluarse adicionalmente.

4. Evaluación de la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales α -SNAP-25.

Para evaluar la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A, se usaron líquidos ascíticos de los clones 1D3B8, 1G10A12, 2C9B10, 2E2A6, 2F11B6, 3C1A5 y 3C3E2 para detectar el producto de corte de SNAP-25 usando el ensayo de actividad basado en células, inmunocitoquímica e inmunoprecipitación.

Para el ensayo de actividad basado en células, se determinó la especificidad de unión mediante el análisis de la capacidad de los líquidos ascíticos que contenían anticuerpos α -SNAP-25 para detectar el sustrato de SNAP-25²⁰⁶ no cortado y el producto de SNAP-25¹⁹⁷ cortado mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se sembró en placa una densidad adecuada de células PC12 en placas de cultivo tisular de 60 mm² que contenían 3 ml de un medio de suero apropiado, se hicieron crecer en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que se alcanzó una densidad de células apropiada y se transfectaron con o bien una disolución de transfección que carecía del constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células no transfectadas) o bien una disolución de transfección que contenía el constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células transfectadas) tal como se describió anteriormente. Se lavaron las células y se recogieron tal como se describe en el ejemplo I. Para detectar la presencia tanto del sustrato de SNAP-25²⁰⁶ no cortado como del producto de SNAP-25¹⁹⁷ cortado, se analizó una alícuota de cada muestra recogida mediante inmunotransferencia de tipo Western tal como se describe en el ejemplo I, excepto porque el anticuerpo primario usado fue una dilución 1:100 de los líquidos ascíticos que contenían anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 y el anticuerpo secundario usado fue una dilución 1:20.000 del anticuerpo α -IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Además, se sometieron a prueba tres anticuerpos monoclonales de ratón α -SNAP-25 disponibles comercialmente. Se usó SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), un anticuerpo α -SNAP-25, que el fabricante indica que detecta tanto el sustrato de SNAP-25²⁰⁶ no cortado como el producto de SNAP-25¹⁹⁷ cortado, a una dilución de 15.000 según las recomendaciones del fabricante. Se usó MC-6050 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), un anticuerpo α -SNAP-25, que el fabricante indica que detecta tanto el sustrato de SNAP-25²⁰⁶ no cortado como el producto de SNAP-25¹⁹⁷ cortado, a una dilución 1:100 según las recomendaciones del fabricante. Se usó MC-6053 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), un anticuerpo α -SNAP-25 que el fabricante indica que detecta sólo el producto de SNAP-25¹⁹⁷ cortado, a una dilución 1:100 según las recomendaciones del fabricante.

La tabla 8 indica que los líquidos ascíticos que contenían anticuerpos α -SNAP-25 detectaban sólo el producto de corte de SNAP-25₁₉₇. El ensayo de corte basado en células indicó que los líquidos ascíticos producidos a partir de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 sintetizan un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que tiene alta especificidad de unión por el producto de corte de SNAP-25₁₉₇ que permite el reconocimiento selectivo de este producto de corte con relación al sustrato no cortado de SNAP-25₂₀₆. El anticuerpo SMI-81 comercial detectó el sustrato no cortado de SNAP-25₂₀₆, pero sólo reconoció escasamente el producto de corte de SNAP-25₁₉₇ (tabla 8). De manera sorprendente, el anticuerpo MC-6050 comercial sólo detectó el sustrato no cortado de SNAP-25₂₀₆ y no reconoció el producto de corte de SNAP-25₁₉₇ (tabla 8). Incluso de manera más sorprendente, el anticuerpo MC-6050 comercial sólo detectó el sustrato no cortado de SNAP-25₂₀₆ y no reconoció el producto de corte de SNAP-25₁₉₇, aun cuando el fabricante anuncia que este anticuerpo detecta selectivamente el producto de corte de SNAP-25₁₉₇ (tabla 8). Por tanto, este análisis indica que aunque 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 muestran una selectividad adecuada por el producto de corte de SNAP-25₁₉₇, 1G10A12 y 2F11B6 no lo hacen. Además, los anticuerpos SMI-81, MC-6050 y MC-6053 comerciales son todos ellos inadecuados para los métodos de base inmunológica dados a conocer en la presente solicitud porque ninguno detecta selectivamente el producto de corte de SNAP-25₁₉₇.

Para el análisis de inmunocitoquímica, se determinó la especificidad de unión mediante el análisis de la capacidad de los líquidos ascíticos que contenían anticuerpos α -SNAP-25 para detectar el sustrato de SNAP-25₂₀₆ no cortado y el producto de SNAP-25₁₉₇ cortado mediante inmunotinción. Véanse por ejemplo, Ester Fernandez-Salas *et al.*, Plasma Membrane Localization Signals in the Light Chain of Botulinum Neurotoxin, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(9): 3208-3213 (2004). Se sembró en placa una densidad adecuada de células PC12, se hicieron crecer y se transfectoraron con o bien una disolución de transfección que carecía del constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células no transfectadas) o bien una disolución de transfección que contenía el constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células transfectadas) tal como se describió anteriormente. Se lavaron las células en PBS 1 x y se fijaron en 5 ml de PAF a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavaron las células fijadas en solución salina tamponada con fosfato, se incubaron en 5 ml de Triton® X-100 al 0,5% (éter de octilfenol de polietilenglicol) en PBS 1 x, se lavaron en PBS 1 x y se permeabilizaron en 5 ml de metanol a -20°C durante seis minutos. Se bloquearon las células permeabilizadas en 5 ml de glicina 100 mM a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavaron en PBS 1 x y se bloquearon en 5 ml de BSA al 0,5% en PBS 1 x a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavaron las células bloqueadas en PBS 1 x y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas en BSA al 0,5% en PBS 1 x que contenía una dilución 1:10 de un líquido ascítico procedente de una línea celular de hibridoma clonal que estaba sometándose a prueba. Se lavaron las células tratadas con sonda de anticuerpo primario tres veces durante 5 minutos cada vez en PBS 1 x. Se incubaron las células lavadas a temperatura ambiente durante 2 horas en PBS 1 x que contenía una dilución 1:200 de anticuerpo policlonal de cabra anti-cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina G (IgG, H+L) de ratón conjugado con ALEXA® FLUOR 568 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) como anticuerpo secundario. Se lavaron las células tratadas con sonda de anticuerpo secundario tres veces durante 5 minutos cada vez en PBS 1 x. Se prepararon las células lavadas para el examen al microscopio mediante su montaje en medio de montaje VECTASHIELD® (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se colocaron en portaobjetos. Se obtuvieron imágenes de detección de señales con un microscopio confocal Leica usando ajustes de láser apropiados. La tabla 8 indica que los líquidos ascíticos que contenían anticuerpos α -SNAP-25 que detectaban específicamente el producto de corte de SNAP-25₁₉₇. El análisis de inmunocitoquímica indicó que los líquidos ascíticos producidos a partir de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 sintetizan un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 que tiene alta especificidad de unión por el producto de corte de SNAP-25₁₉₇ que permite el reconocimiento preferente de este producto de corte con relación al sustrato no cortado de SNAP-25₂₀₆.

Para el análisis de inmunoprecipitación, se determinó la especificidad de unión mediante el análisis de la capacidad de la proteína A (columnas HP de proteína A HiTrap™, GE Healthcare, Amersham, Piscataway, NJ), anticuerpos monoclonales purificados α -SNAP-25, para precipitar el sustrato de SNAP-25₂₀₆ no cortado y el producto de SNAP-25₁₉₇ cortado. Véase por ejemplo, el capítulo 8 de Storing and Purifying Antibodies, págs. 309-311, Harlow & Lane, citado anteriormente, 1998a. Se sembró en placa una densidad adecuada de células PC12, se hicieron crecer y se transfectoraron con o bien una disolución de transfección que contenía un constructo de expresión pQBI-25/GFP (células control; SEQ ID NO: 53) o una disolución de transfección que contenía el constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células experimentales) tal como se describió anteriormente. El constructo de expresión pQBI-25/GFP comprende un vector de expresión cuyos elementos promotores están unidos funcionalmente a un polinucleótido que codifica para GFP de SEQ ID NO: 54. Tras una incubación durante la noche, se lavaron las células mediante la aspiración de los medios de crecimiento y el aclarado de cada pocillo con 200 μ l de PBS 1 x. Para recoger las células, se aspiró el PBS, se lisaron las células mediante la adición de un tampón de lisis de inmunoprecipitación que comprendía HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EGDT 1 mM, glicerol al 10%, Triton® X-100 (éter de octilfenol de polietilenglicol) al 1% y un cóctel de inhibidor de proteasa COMPLETE™ 1 x (Roche Applied Biosciences, Indianápolis, EN) y la incubación a 4°C durante una hora. Se centrifugaron las células lisadas a 3.000 x g a 4°C durante 10 minutos para eliminar los residuos celulares y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se diluyó hasta obtener una concentración de proteína de aproximadamente 1 mg/ml. Se añadieron aproximadamente 5 μ g de anticuerpo monoclonal purificado a 0,5 ml de sobrenadante diluido y se incubó a 4°C durante dos horas. Tras la incubación con anticuerpo primario, se añadieron aproximadamente 50 μ l de proteína G inmovilizada (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) al sobrenadante diluido y se incubó a 4°C durante una hora. Se

lavó el sobrenadante incubado tres veces durante 30 minutos cada vez mediante la adición de 0,5 ml de tampón de lisis de inmunoprecipitación, la centrifugación a 300 x g a 4°C durante un minuto para sedimentar la proteína G inmovilizada y la decantación del sobrenadante. Tras el lavado, se resuspendió el sedimento en 30 µl de tampón de carga SDS 1 x y se calentó la muestra hasta 95°C durante 5 minutos. Para detectar la presencia tanto del sustrato de SNAP-25₂₀₆ no cortado como del producto de SNAP-25₁₉₇ cortado, se analizó una alícuota de cada muestra recogida mediante inmunotransferencia de tipo Western tal como se describe en el ejemplo I, excepto porque el anticuerpo primario usado fue una dilución 1:1.000 del suero con anticuerpo policlonal α-SNAP-25 (véase el ejemplo IV) y el anticuerpo secundario usado fue una dilución 1:20.000 de anticuerpo de conejo α-IgG – peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). La tabla 8 indica los líquidos ascíticos que contienen anticuerpos α-SNAP-25 que extrajeron específicamente el producto de corte de SNAP-25₁₉₇ mediante análisis de inmunoprecipitación. El análisis de inmunoprecipitación indicó que los líquidos ascíticos producidos a partir de los clones 2E2A6 y 3C1A5 sintetizan un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 que tiene alta especificidad de unión por el producto de corte de SNAP-25₁₉₇ que permite el reconocimiento preferente de este producto de corte con relación al sustrato no cortado de SNAP-25₂₀₆.

Tabla 8. Análisis de líquidos ascíticos clonales que contienen el anticuerpo monoclonal α-SNAP-25

Clon	Ensayo basado en células		Inmunocitoquímica		Inmunoprecipitación	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆
1D3B8	++	-	++	-	No sometido a prueba	No sometido a prueba
1G10A12	++	++	No sometido a prueba			
2C9B10	++	-	++	-	No sometido a prueba	No sometido a prueba
2E2A6	++	-	++	-	++	-
2F11B6	+	+	+	+	No sometido a prueba	No sometido a prueba
3C1A5	++	-	++	-	++	-
3C3E2	+	-	No sometido a prueba			
MC-6050	-	+	No sometido a prueba			
MC-6053	-	+	No sometido a prueba			
SMI-81	-/+	++	No sometido a prueba			

5. Evaluación de la afinidad de unión de anticuerpos monoclonales α-SNAP-25.

Para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 que muestra alta especificidad de unión por o bien el producto de corte de SNAP-25₁₉₇ o bien el sustrato no cortado de SNAP-25₂₀₆, se realizaron ensayos de afinidad de unión en un instrumento BIAcore 3000 usando chips sensores de carboximetildextrano (CM5) (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Se realizaron series a 25°C con tampón HBS-EP que comprendía HEPES 10 mM (pH 7,4), cloruro de sodio 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005% (v/v) a una velocidad de flujo de 10 µl/min. Los péptidos de SNAP-25 que comprendían los aminoácidos 134-197 de SEQ ID NO: 5 (SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇) o los aminoácidos 134-206 de SEQ ID NO: 5 (SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆) se unieron de manera covalente a la superficie de los chips sensores de CM5 usando acoplamiento de amina convencional. Brevemente, se activaron los chips de CM5 mediante una inyección de 7 minutos de una mezcla de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida 0,2 M y N-hidroxisuccinimida 0,05 M; entonces se inyectaron los péptidos de SNAP-25 en acetato de sodio 10 mM (pH 4,0) durante 20 min a una velocidad de flujo de 10 µl/min; y se bloquearon los ésteres de succinimida sin reaccionar mediante una inyección de 7 min de clorhidrato de etanolamina 1 M, pH 8,5. Se reflejó la cantidad inmovilizada de SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ o SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ sobre el chip mediante un aumento de 100-150 en las unidades de respuesta (aproximadamente 0,10-0,15 ng/mm²). Se hicieron pasar muestras de anticuerpos que comprendían o bien líquidos ascíticos o bien anticuerpos monoclonales purificados producidos a partir de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2, así como, anticuerpos α-SNAP-25 disponibles comercialmente, sobre la superficie de los chips de CM5 permitiendo un tiempo de asociación de 10 min y un tiempo de disociación de 20 min. Se regeneraron las superficies entre series mediante una inyección de 1 minuto de glicina-HCl 10 mM (pH 2,5) a una velocidad de flujo de 15 µl/min. Se ajustaron las curvas del sensograma a un modelo de unión cinética 1:1 con el software BIAevaluation 3.0.

Los resultados indican que tanto 2E2A6 como 3C1A5 eran altamente específicos para el producto de SNAP-25₁₉₇ cortado con respecto al sustrato no cortado de SNAP-25 (tabla 9). Cuando se compararon las afinidades de unión de MC-6050 y MC-6053, 1D3B6 tenía una constante de disociación de equilibrio aproximadamente 10 veces superior para el producto de corte de SNAP-25 con relación a estos anticuerpos comerciales (tabla 9). Resulta interesante

que, 2E2A6 sólo tenía una constante de disociación de equilibrio ligeramente inferior para el producto de corte de SNAP-25 con relación a estos anticuerpos comerciales (0,405 nM frente a 0,497 y 0,508) (tabla 9). Dado que ninguno de estos anticuerpos comerciales α -SNAP-25 reconocieron selectivamente el producto de corte de SNAP-25 (tabla 8), aparece una constante de disociación de equilibrio inferior a aproximadamente 0,5 nM, en parte, crítica para lograr tal selectividad. De manera similar, en comparación con las afinidades de unión de MC-6050 y MC-6053, 2E2A6 tuvo una constante de disociación/velocidad de disociación aproximadamente al menos una vez más lenta ($6,74 \times 10^{-5}$ frente a $8,82 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $1,18 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$) (tabla 9). Esto sugiere además que aparece una constante de disociación/velocidad de disociación inferior a aproximadamente $8,82 \times 10^{-4}$, en parte, crítica para lograr la unión selectiva para el producto de corte de SNAP-25. Este resultado concuerda con 1D3B8, que tuvo una constante de disociación/velocidad de disociación de $5,78 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (tabla 9).

Tabla 9. Análisis de afinidad de unión de anticuerpos monoclonales α -SNAP-25				
Parámetro de SPR	1D3B8		2E2A6*	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^a	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^b
Ka ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$1,06 \times 10^6$	-	$1,70 \times 10^6$ ($1,66 \times 10^5$)	- (-)
Kd (s^{-1})	$5,78 \times 10^{-5}$	-	$1,53 \times 10^{-4}$ ($6,74 \times 10^{-5}$)	- (-)
KD (nM)	0,050	-	0,090 (0,405)	(-)
Parámetro de SPR	3C1AA		2C9B10	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^c	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^d
Ka ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$2,17 \times 10^5$	-	$1,15 \times 10^4$	-
Kd (s^{-1})	$2,88 \times 10^{-4}$	-	$3,11 \times 10^{-4}$	-
KD (nM)	1,33	-	27,1	-
Parámetro de SPR	MC-6050		MC-6053	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆
Ka ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$1,78 \times 10^6$	$3,06 \times 10^2$	$2,32 \times 10^6$	$1,06 \times 10^2$
Kd (s^{-1})	$8,82 \times 10^{-4}$	$6,07 \times 10^{-3}$	$1,18 \times 10^{-3}$	$2,56 \times 10^{-5}$
KD (nM)	0,497	19.800	0,508	240

* Se realizaron dos series independientes para este anticuerpo con dos chips diferentes.
^a No se observó unión cuando se hicieron pasar hasta 125 nM del anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 1D3B8 sobre la superficie del chip sensor de CM5 tras un tiempo de asociación de 10 minutos.
^b No se observó unión cuando se hicieron pasar hasta 10 μM del anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 2E2A6 sobre la superficie del chip sensor de CM5 tras un tiempo de asociación de 10 minutos.
^c No se observó unión cuando se hicieron pasar hasta 100 nM del anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 3C1A5 sobre la superficie del chip sensor de CM5 tras un tiempo de asociación de 10 minutos.
^d No se observó unión cuando se hicieron pasar hasta 100 nM del anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 2C9B10 sobre la superficie del chip sensor de CM5 tras un tiempo de asociación de 10 minutos.

6. Secuenciación del epítipo a partir de anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 aislados.

Para determinar el epítipo de un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 aislado que puede unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A, se secuenció la molécula de polinucleótido que codifica para las cadenas pesada variable (V_H) y ligera variable (V_L) del anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 producido por los hibridomas 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2. Se extrajo el ARNm y se purificó a partir de cada hibridoma usando protocolos convencionales y se sometió a transcripción inversa para dar ADNc usando o bien un cebador antisentido de oligo dT o bien un cebador antisentido específico para el gen (C_L kappa y C_H de la IgG1 murina). Se usaron cebadores de dominio constante humano y murino específicos para amplificar el ADNc mediante PCR tras la producción del ADNc para determinar el isotipo del anticuerpo. Se usaron cebadores de V_H y V_L degenerados para amplificar los dominios variables del ADNc. Para realizar 5'RACE, se añadió una cola de dCTP homopolimérica al extremo 3' del ADNc. Entonces se amplificaron las cadenas pesada y ligera con un cebador sentido de oligo dG y un cebador antisentido específico para el gen (C_H/K_C). Los productos de la PCR incluyeron la secuencia del péptido señal, los dominios variables y los dominios constantes hasta el cebador antisentido. Se purificaron en gel los productos de la PCR para eliminar los fragmentos pequeños y se clonaron en un vector romo o TA para la secuenciación. Se secuenciaron cinco clones independientes para cada cadena y se determinaron las alineaciones de cadenas V_H y V_L y las secuencias consenso (tabla 10). Los métodos usados para determinar las secuencias de aminoácidos de V_H y V_L se describen en, por ejemplo, Roger A. Sabbadini, *et al.*, Novel Bioactive Lipid Derivatives and Methods of Making and Using Same, publicación de patente estadounidense 2007/0281320; y Peter Amersdorfer, *et al.*, Molecular Characterization of Murine Humoral Immune Response to Botulinum Neurotoxin Type A Binding Domain as Assessed by Using Phage Antibody Libraries, 65(9) Infect. Immun. 3743-3752, cada uno de los cuales se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad. Además, están disponibles servicios comerciales para secuenciar las cadenas pesada variable (V_H) y ligera variable (V_L) de un anticuerpo e identificar las regiones CDR, véase, por ejemplo,

Fusion Antibodies Ltd., Irlanda del Norte.

5 La secuencia de polinucleótido que comprende las cadenas V_H y V_L del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25
 producido por los hibridomas dados a conocer en la presente memoria descriptiva es tal como sigue: V_H de 1D3B8
 (SEQ ID NO: 71), V_H de 2C9B10 (SEQ ID NO: 73), V_H de 2E2A6 (SEQ ID NO: 75), variante 1 de V_H de 3C1A5 (SEQ
 ID NO: 77), variante 2 de V_H de 3C1A5 (SEQ ID NO: 79), V_H de 3C3E2 (SEQ ID NO: 81); V_L de 1D3B8 (SEQ ID NO:
 83), V_L de 2C9B10 (SEQ ID NO: 85), V_L de 2E2A6 (SEQ ID NO: 87), V_L de 3C1A5 (SEQ ID NO: 89) y V_L de 3C3E2
 (SEQ ID NO: 91). La secuencia de aminoácidos que comprende las cadenas V_H y V_L del anticuerpo monoclonal α-
 10 SNAP-25 producido por los hibridomas dados a conocer en la presente memoria descriptiva es tal como sigue: V_H de
 1D3B8 (SEQ ID NO: 72), V_H de 2C9B10 (SEQ ID NO: 74), V_H de 2E2A6 (SEQ ID NO: 76), variante 1 de V_H de
 3C1A5 (SEQ ID NO: 78), variante 2 de V_H de 3C1A5 (SEQ ID NO: 80), V_H de 3C3E2 (SEQ ID NO: 82); V_L de 1D3B8
 (SEQ ID NO: 84), V_L de 2C9B10 (SEQ ID NO: 86), V_L de 2E2A6 (SEQ ID NO: 88), V_L de 3C1A5 (SEQ ID NO: 90) y
 V_L de 3C3E2 (SEQ ID NO: 92). Las secuencias de aminoácidos que comprenden los dominios CDR de V_H y V_L del
 15 anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producido por los hibridomas 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 se
 facilitan en la tabla 10.

Tabla 10. Secuencias de CDR de dominios de V _H y V _L de anticuerpos monoclonales α-SNAP-25			
CDR	Secuencia	Identificado en	SEQ ID NO:
CDR 1 de V _H	TFTDHSIH	2E2A6 2C9810 Variante 2 de 3C1A5	93
CDR 1 de V _H	TFTNYVIH	Variante 1 de 3C1A5 3C3E2	94
CDR 1 de V _H	IFTDHALH	1D3B8	95
CDR 2 de V _H	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
CDR 2 de V _H	YLFPNGNGFEYNEKFKG	2C9B10 Variante 2 de 3C1A5	97
CDR 2 de V _H	YINPYNDGSKYNEKFKG	Variante 1 de 3C1A5 3C3E2	98
CDR 2 de V _H	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
CDR 3 de V _H	KRMGY	2E2A6 Variante 2 de 3C1A5	100
CDR 3 de V _H	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101
CDR 3 de V _H	ARHLANTYFFFYFDY	Variante 1 de 3C1A5 3C3E2	102
CDR 1 de V _L	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
CDR 1 de V _L	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
CDR 1 de V _L	RASKSVSTSGYSYMH	2E2A6	105
CDR 1 de V _L	KASQDIKSYLS	3C1A5	106
CDR 1 de V _L	RASQNIGNYLH	3C3E2	107
CDR 2 de V _L	KVSNRFS	1D3B8	108
CDR 2 de V _L	NAKSLAE	2C9B10	109
CDR 2 de V _L	LVSNLES	2E2A6	110
CDR 2 de V _L	YATSLAD	3C1A5	111
CDR 2 de V _L	YASQSIG	3C3E2	112
CDR 3 de V _L	FQGSHVPPT	1D3B8	113
CDR 3 de V _L	QHHYGTPYT	2C9B10	114
CDR 3 de V _L	QHIRELTRS	2E2A6	115
CDR 3 de V _L	LQHGESPF	3C1A5	116
CDR 3 de V _L	QQSDTWPLT	3C3E2	117

20 Los ejemplos no limitativos de secuencias de aminoácidos que comprenden variantes del dominio de CDR de V_H del
 anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producido por los hibridomas dados a conocer en la presente memoria
 descriptiva incluyen SEQ ID NO: 118 de variante de CDR1 de V_H para 1D3B8; SEQ ID NO: 119 de variante CDR1
 de V_H para 2C9B10, 2E2A6 y variante 2 de V_H de 3C1A5; SEQ ID NO: 120 de variante de CDR1 de V_H para variante
 1 de V_H de 3C1A5 y 3C3E2; SEQ ID NO: 121 de variante de CDR2 de V_H para 1D3B8 y 2E2A6; SEQ ID NO: 122 de
 variante de CDR2 de V_H para 2C9B10 y variante 2 de V_H de 3C1A5; SEQ ID NO: 123 de variante de CDR2 de V_H
 para variante 1 de V_H de 3C1A5 y 3C3E2; variante MDY de CDR3 de V_H para 1D3B8 y 2C9B10; variante MGY de
 25 CDR3 de V_H para 2E2A6 y variante 2 de V_H de 3C1A5; y SEQ ID NO: 124 de variante de CDR3 de V_H para variante
 1 de V_H de 3C1A5 y 3C3E2. Los ejemplos no limitativos de secuencias de aminoácidos que comprenden variantes
 del dominio de CDR de V_L del anticuerpo α-SNAP-25 monoclonal producido por los hibridomas dados a conocer en
 la presente memoria descriptiva incluyen SEQ ID NO: 125 de variante de CDR1 de V_L para 1D3B8; SEQ ID NO: 126
 de variante de CDR1 de V_L para 2C9B10; SEQ ID NO: 127 de variante de CDR1 de V_L para 2E2A6; SEQ ID NO:

128 de variante de CDR1 de V_L para 3C1A5; SEQ ID NO: 129 de variante de CDR1 de V_L para 3C3E2; variante KVS de CDR2 de V_L para 1D3B8; variante NAK de CDR2 de V_L para 2C9B10; variante LVS de CDR2 de V_L para 2E2A6; variante YAT de CDR2 de V_L para 3C1A5; y variante YAS de CDR2 de V_L para 3C3E2.

5 Ejemplo IV

Desarrollo de anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que se unen selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A

10 El siguiente ejemplo ilustra cómo obtener anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A.

15 Para desarrollar anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25, se diseñó el péptido CGGGRIDEANQ (SEQ ID NO: 46) de 10 residuos como un antígeno de producto de corte de SNAP-25. Este péptido que comprende un residuo de cisteína N-terminal para la conjugación con KLH, un espaciador flexible, espaciador de G (GGG) unido a los aminoácidos 191-197 de la SNAP-25 humana (SEQ ID NO: 5) y tiene una glutamina C-terminal carboxilada. Las búsquedas en Blast revelaron que este péptido tiene alta homología sólo con SNAP-25 y casi no es posible la reactividad cruzada con otras proteínas en células neuronales. La secuencia también se inspeccionó cuidadosamente mediante la utilización de algoritmos informáticos para determinar el índice de hidropatía, la probabilidad de superficie de proteína, las regiones de flexibilidad y la estructura secundaria favorable, seguido por la orientación y presentación apropiadas de la secuencia peptídica elegida. Se sintetizó el péptido y se conjugó con hemocianina de lapa californiana (KLH) para aumentar la inmunogenicidad. Antes de inmunizar a los animales, se examinaron en primer lugar conejos no tratados previamente frente a lisados celulares procedentes de las líneas celulares candidatas en una inmunotransferencia de tipo Western con el fin de identificar animales que no tenían inmunorreactividad con las proteínas presentes en los lisados celulares. Se inmunizaron con este péptido dos conejos examinados previamente y tras tres inmunizaciones en aproximadamente ocho semanas, se extrajo sangre de los conejos para someterla a prueba. Se permitió que la sangre coagulara mediante incubación a 4°C durante 60 minutos. Se centrifugó la sangre coagulada a 10.000 x g a 4°C durante 10 minutos para sedimentar los residuos celulares. Se dispuso la muestra de suero resultante en alícuotas de 50 μ l y se almacenaron a -20°C hasta que se necesitaron.

35 Se usa una estrategia similar basada en otros antígenos de SNAP-25 dados a conocer en la presente memoria descriptiva para desarrollar anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que se unen a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25. Por ejemplo, el antígeno de SNAP-25 de SEQ ID NO: 47 puede conjugarse con KLH en vez del antígeno de SNAP-25 de SEQ ID NO: 46. Como otro ejemplo, los aminoácidos 191-197 de SNAP-25 humana del antígeno de SNAP-25 de SEQ ID NO: 38 pueden sustituirse por SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147 o SEQ ID NO: 148.

2. Examen para determinar la presencia de anticuerpos policlonales α -SNAP-25.

45 Para determinar la presencia de anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A, se realizaron ELISA comparativo y ensayos de corte basados en células usando el suero de conejo extraído tal como se describe en el ejemplo III. El suero de ambos conejos contenía anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A. Los anticuerpos policlonales de conejo α -SNAP-25 se designaron como NTP 22 y NTP 23.

3. Purificación de anticuerpos policlonales α -SNAP-25.

55 Para purificar anticuerpos policlonales α -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A, NTP 22 y NTP 23, se purificaron anticuerpos de suero de conejo usando columnas de afinidad que contenían el antígeno de SNAP-25 de SEQ ID NO: 46.

60 4. Evaluación de la especificidad de unión de anticuerpos policlonales α -SNAP-25.

Para evaluar la especificidad de unión de un anticuerpo policlonal α -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A, se usaron anticuerpos policlonales α -SNAP-25, NTP 22 y NTP 23 purificados, para detectar el producto de corte usando el ensayo de actividad basado en células, inmunocitoquímica e inmunoprecipitación tal

como se describe en el ejemplo III. El ensayo de corte basado en células, el análisis de inmunocitoquímica y el análisis de inmunoprecipitación indicaron todos ellos que los anticuerpos policlonales α -SNAP-25, NTP 22 y NTP 23, no tenían reactividad cruzada con SNAP-25 no cortada. Por tanto, tanto NTP 22 como NTP 23 tienen alta especificidad de unión por el producto de corte de SNAP-25₁₉₇ que permite el reconocimiento preferente de este producto de corte con relación al sustrato no cortado de SNAP-25₂₀₆. La afinidad por los antígenos puede determinarse usando SPR en el instrumento BiAcore tal como se describe en el ejemplo III.

Ejemplo V

Preparación de componentes y condiciones para un ELISA de tipo sándwich

El siguiente ejemplo ilustra cómo identificar y preparar los componentes y condiciones necesarios para realizar un ELISA de tipo sándwich útil para llevar a cabo métodos de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A mediante la detección de un producto de corte de SNAP-25 usando un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 específico para una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A.

1. Preparación de lisados celulares de células tratadas con NTBo/A.

Para obtener un lisado de células tratadas con NTBo/A para análisis, se sembró una densidad adecuada de células de un cultivo madre de Neuro-2a en un matraz T175 que contenía 50 ml de un medio libre de suero que contenía medio esencial mínimo, GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, suplemento B27 1 x, suplemento N2 1 x, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM. Se incubaron estas células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que se diferenciaron las células, tal como se evaluó mediante criterios morfológicos convencionales y de rutina, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente de 2 a 3 días). Como control, se sembró una densidad adecuada de células de un cultivo madre de Neuro-2a en un matraz T175 que contenía 50 ml de un medio de crecimiento apropiado (tabla 1). Se hicieron crecer estas células control no diferenciadas en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que se alcanzó una confluencia del 50% (aproximadamente 18 horas). Se aspiraron de cada pocillo los medios de los cultivos control tanto diferenciados como no diferenciados y se sustituyeron por medios recién preparados que contenían o bien 0 (muestra no tratada) o bien 10 nM de un complejo de NTBo/A. Tras una incubación durante la noche, se lavaron las células y se recogieron las células mediante lisis en tampón de lisis Triton X-100 recién preparado (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1%) a 4°C durante 30 minutos con agitación constante. Se centrifugaron las células lisadas a 4000 rpm durante 20 min a 4°C para eliminar los residuos usando una centrifuga de mesa. Se midieron las concentraciones de proteínas de los lisados celulares mediante el ensayo de Bradford.

2. Preparación e identificación de los componentes de ELISA de tipo sándwich.

Para identificar un par de anticuerpo de captura-anticuerpo de detección apropiado, se llevó a cabo un análisis de ELISA de tipo sándwich ECL en veintiséis combinaciones diferentes de pares de anticuerpos de captura y detección que comprendían once anticuerpos de captura α -SNAP-25 diferentes y siete anticuerpos de detección α -SNAP-25 diferentes (tabla 12). Los anticuerpos α -SNAP-25 usados eran anticuerpos monoclonales de ratón α -SNAP-25, 2E2A6 y 3C1A5, dados a conocer en la presente memoria descriptiva, anticuerpos monoclonales de ratón α -SNAP-25, SMI-81, MC-6050 y MC-6053, dados a conocer en la presente memoria descriptiva, anticuerpos policlonales de conejo α -SNAP-25, NTP 23, dados a conocer en la presente memoria descriptiva, anticuerpos policlonales de conejo α -SNAP-25 S9684 (Sigma, San Luis, MO), anticuerpos policlonales de conejo α -SNAP-25 H-50 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), anticuerpos policlonales de cabra α -SNAP-25 C-18 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), anticuerpos policlonales de cabra α -SNAP-25 N-19 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) y anticuerpos policlonales de ratón α -SNAP-25 SP12 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

Para preparar la disolución de anticuerpo de captura, se purificaron los anticuerpos monoclonales α -SNAP-25 contenidos en los líquidos ascíticos de las líneas celulares de hibridoma 2E2A6 y 3C1A5 así como los anticuerpos monoclonales α -SNAP-25, MC-6050 y MC-6053, usando un protocolo de purificación de proteína A convencional. Todos los demás anticuerpos α -SNAP-25 se adquirieron como anticuerpos purificados.

Para preparar la disolución de anticuerpo de detección, se conjugó el anticuerpo α -SNAP-25 apropiado con el reactivo de marcado éster de NHS de tris-bipiridin-(4-metilsulfonato) de rutenio (II) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) según las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Se realizó la reacción de conjugación mediante la adición de 30 μ l de disolución madre de MSD SULFO-TAG™ reconstituida con agua destilada a 200 μ l de anticuerpos policlonales α -SNAP-25 2 mg/ml y la incubación de la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas en la oscuridad. Se purificaron los anticuerpos marcados usando un protocolo de columna de centrifugación convencional y se determinó la concentración de proteína usando un ensayo de proteínas colorimétrico convencional. Se midió la absorbancia del conjugado anticuerpo α -SNAP-25/MSD SULFO-TAG™ a 455 nm usando un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. Se almacenó la disolución

de anticuerpo a 4°C hasta que se necesitó.

Para preparar el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura que es específico para un producto de corte de SNAP-25, se añaden aproximadamente 5 µl de la disolución de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 apropiada (20 µg/ml en PBS 1 x) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos MSD High Bind y se permite que se seque al aire la disolución en una cabina de seguridad biológica durante 2-3 horas con el fin de evaporar líquido de la disolución. Luego se bloquearon los pocillos con anticuerpo de captura unido mediante la adición de 150 µl de tampón de bloqueo que comprende reactivo de bloqueo de Amersham al 2% (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y suero de cabra al 10% (VWR, West Chester, PA) a temperatura ambiente durante 2 horas. Se sellaron las placas bloqueadas y se almacenaron a 4°C hasta que se necesitaron.

Para detectar la presencia de un producto de corte de SNAP-25 cortado mediante análisis de ELISA de tipo sándwich ECL, se aspiró de los pocillos el tampón de bloqueo de las placas almacenadas, se añadieron 25 µl de un lisado de células tratadas con NTBo/A, tal como se describió anteriormente, a cada pocillo y se incubaron las placas a 4°C durante la noche. Se lavaron los pocillos de las placas tres veces mediante la aspiración del lisado celular y el aclarado de cada pocillo tres veces con 200 µl de PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadieron 25 µl de la disolución 5 µg/ml de anticuerpo de detección que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano) a cada pocillo, se selló la placa y se incubó la placa sellada a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Tras la incubación del anticuerpo de detección, se lavaron los pocillos tres veces con 200 µl de PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadieron 150 µl de tampón de lectura 1 x (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y se leyeron las placas usando un lector de imágenes SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Se calculó una razón dividiendo la señal obtenida a la dosis de 10 nM para cada par de anticuerpos entre la señal obtenida a la dosis de 0 nM para cada par de anticuerpos (tabla 12). Estos resultados indicaron que entre las veintiséis combinaciones diferentes de pares de anticuerpos sometidos a prueba, sólo tres pares de anticuerpos tenían relaciones señal-ruido por encima de 10:1 para la mayor dosis sometida a prueba: n.º de par 1 (AcM de ratón 2E2A6 y AcP de conejo AS9684), n.º de par 4 (AcM de ratón 3C1A5 y AcP de conejo S9684) y n.º de par 18 (AcP de conejo S9684 y AcM de ratón 2E2A6). Se eligió el par de anticuerpos 1 para el desarrollo de ensayo adicional.

N.º de par de anticuerpos	Anticuerpo de captura	Anticuerpo de detección	Detección del producto de corte de SNAP-25	Detección de sustrato no cortado de SNAP-25	Relación señal/ruido (10 nM/0 nM)
1	AcM de ratón 2E2A6	AcP de conejo S9684	Sí	No	26,6:1
2	AcM de ratón 2E2A6	AcP de cabra N-19	Sí	No	7,3:1
3	AcM de ratón 2E2A6	AcP de conejo H-50	Sí	No	0,9:1
4	AcM de ratón 3C1A5	AcP de conejo S9684	Sí	No	12,1:1
5	AcM de ratón 3C1A5	AcP de cabra N-19	Sí	No	1,9:1
6	AcM de ratón 3C1A5	AcP de conejo H-50	Sí	No	0,9:1
7	AcP de cabra C-18	AcP de conejo S9684	No	No	0,8:1
8	AcP de cabra C-18	AcP de cabra N-19	No	No	0,9:1
9	AcP de cabra C-18	AcP de conejo H-50	No	No	0,9:1
10	AcP de conejo H-50	AcM de ratón 2E2A6	Sí	No	0,9:1
11	AcP de conejo H-50	AcP de cabra C-18	No	No	1,0:1
12	AcP de cabra N-19	AcM de ratón 2E2A6	Sí	No	0,9:1
13	AcP de cabra N-19	AcP de cabra C-18	No	No	1,1:1
14	AcP de conejo NTP 23	AcP de cabra N-19	Sí	No	1,2:1
15	AcP de conejo NTP 23	AcP de cabra C-18	No	No	1,1:1
16	AcP de conejo NTP 23	AcP de ratón SP12	Sí	No	1,3:1
17	AcP de conejo NTP 23	AcP de conejo H-50	Sí	No	1,1:1
18	AcP de conejo S9684	AcM de ratón 2E2A6	Sí	No	21,3:1
19	AcP de conejo S9684	AcP de cabra C-18	No	No	0,7:1
20	AcP de conejo S9684	AcM de ratón SMI-81	Sí	Sí	1,2:1
21	AcM de ratón SMI-81	AcP de conejo S9684	Sí	Sí	1,1:1
22	AcM de ratón SMI-81	AcP de cabra N-19	Sí	Sí	1,0:1
23	AcM de ratón SMI-81	AcP de cabra C-18	No	No	0,8:1
24	AcP de ratón SP12	AcP de cabra C-18	No	No	1,0:1
25	AcM de ratón MC-6050	AcP de conejo S9684	Sí	Sí	5,0:1
26	AcM de ratón MC-6053	AcP de conejo S9684	Sí	Sí	7,1:1

3. Optimización de las condiciones de diferenciación celular.

5 Para determinar las condiciones de diferenciación óptimas para una línea celular que comprende células susceptibles de intoxicación por NTBo/A cuando se usa un sistema de detección de ELISA de tipo sándwich, se sometieron a prueba tanto diversos medios de cultivo celular como la duración del tiempo de diferenciación.

10 Para determinar un medio de diferenciación óptimo, se sembró en placa una densidad adecuada de células de una línea celular SiMa en los pocillos de placas de cultivo celular de 24 pocillos recubiertas con colágeno IV que contenían 1 ml de uno de los siguientes medios y suplementos de diferenciación: 1) RPMI 1640, suero bovino fetal al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%, L-glutamina 2 mM y GT1b 25 µg/ml; 2) RPMI-1640, suplemento B27 1 x, suplemento N2 1 x y GT1b 25 µg/ml; 3) medio esencial mínimo, suplemento B27 1 x, suplemento N2 1 x y GT1b 25 µg/ml; y 4) RPMI-1640, BSA al 10%, suplemento N2 1 x, suplemento NGF 1 x y GT1b 25 µg/ml. Se incubaron las células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que se diferenciaron las células, tal como se evaluó mediante criterios morfológicos convencionales y de rutina, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 3 días). Se aspiraron los medios de cada pocillo y se sustituyeron por medios recién preparados que contenían o bien 0 (muestra no tratada), 0,2 pM, 2 pM o bien 20 pM de un complejo de NTBo/A. Tras un tratamiento durante la noche, se lavaron las células, se incubaron durante unos dos días adicionales sin toxina para permitir el corte del sustrato de SNAP-25 y se recogieron tal como se describió anteriormente en la sección 1. Se midieron las concentraciones de proteínas de los lisados celulares mediante el ensayo de Bradford. Se realizó la detección de la presencia de producto de SNAP-25 de corte mediante análisis de ELISA de tipo sándwich ECL tal como se describió anteriormente usando el par de anticuerpos 1. Tal como se comentó en el ejemplo I, las células no diferenciadas no captaban la toxina de manera tan eficaz como las células diferenciadas. El medio de diferenciación más eficaz para aumentar la captación de NTBo/A y por consiguiente el corte de SNAP-25 fue el medio 3 (MEM+N2+B27), seguido por el medio 2 (RPMI-1640+N2+B27) y el medio 4 (RPMI-1640+N2+NGF+BSA) (figura 3). Las células cultivadas en el medio 2 dieron como resultado más corte de la SNAP-25 en comparación con los otros medios.

30 Para determinar un tiempo de diferenciación óptimo, se sembró en placa una densidad adecuada de células de una línea celular SiMa en los pocillos de placas de cultivo celular de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina que contenían 100 µl de un medio libre de suero que contenía medio esencial mínimo, GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, suplemento B27 1 x, suplemento N2 1 x, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM y GT1b 25 µg/ml. Se sembraron en placa células en cuatro días diferentes para obtener pruebas del curso de tiempo de diferenciación a las 6 h, 24 h, 48 h y 72 h, y se incubaron en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5%. Se aspiraron los medios de cada pocillo y se sustituyeron por medios recién preparados que contenían o bien 0 (muestra no tratada), 0,1 pM, 0,2 pM, 0,4 pM, 0,8 pM, 1,6 pM, 3,1 pM, 6,25 pM, 12,5 pM o bien 25 pM de un complejo de NTBo/A. Tras un tratamiento durante la noche, se lavaron las células, se incubaron durante unos dos días adicionales sin toxina para permitir el corte del sustrato de SNAP-25 y se recogieron tal como se describió anteriormente en la sección 1. Tras la recogida, se obtuvieron las concentraciones de proteínas de los lisados celulares y la detección de la presencia de producto de SNAP-25 cortado mediante análisis de ELISA de tipo sándwich ECL tal como se describió anteriormente. Se transfirieron entonces los datos sin procesar obtenidos del generador de imágenes ECL a SigmaPlot v. 9.0 y se usó un ajuste de logística de 4 parámetros para definir las curvas de dosis-respuesta. No se usaron restricciones para la función logística de 4 parámetros cuando se representaron gráficamente los datos. Se generaron informes gráficos usando el siguiente análisis: R2 (coeficiente de correlación), a (Max para el ajuste de datos), b (pendiente) y X0 ± E.E. (valor de CE₅₀ ± error estándar). Los resultados indicaron que podían lograrse valores de CE₅₀ de menos de 2 pM con células diferenciadas durante 48-72 h (figura 4). El hallazgo de que podían usarse células diferenciadas entre 48 h y 72 h de diferenciación, sin cambios significativos sobre el rendimiento de las células, subraya la robustez del ensayo. Aunque periodos de tiempo de diferenciación de menos de 48 h pueden no ser adecuados para pruebas picomolares del producto formulado, estos tiempos de diferenciación menores son suficientemente sensibles para las pruebas de principios activos a granel.

4. Optimización del tiempo de tratamiento con NTBo/A.

55 Para determinar la duración de tiempo óptima en que las células forman una línea celular que es necesario tratar con NTBo/A, se sometieron a prueba diversas duraciones de tiempo de tratamiento con NTBo/A. Se sembró en placa una densidad adecuada de células de una línea celular SiMa en los pocillos de placas de cultivo celular de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina que contenían 100 µl de un medio libre de suero que contenía medio esencial mínimo, GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, suplemento B27 1 x, suplemento N2 1 x, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM y GT1b 25 µg/ml. Se sembraron en placa las células y se incubaron en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que se diferenciaron las células, tal como se evaluó mediante criterios morfológicos convencionales y de rutina, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 3 días). Se aspiraron los medios de cada pocillo y se sustituyeron por medios recién preparados que contenían o bien 0 (muestra no tratada), 0,1 pM, 0,2 pM, 0,4 pM, 0,8 pM, 1,6 pM, 3,1 pM, 6,3 pM, 12,5 pM o bien 25 pM de un complejo de NTBo/A en medio de crecimiento RPMI 1640 por triplicado para generar una

5 respuesta de dosis completa. Se realizaron cinco regímenes de duración de tratamiento con NTBo/A diferentes: 1) un tratamiento con NTBo/A de 6 h, retirada y lavado de las células, una incubación de las células durante 18 h sin NTBo/A y recogida de las células tal como se describió anteriormente en la sección 1; 2) un tratamiento con NTBo/A de 24 h, retirada y lavado de las células, y recogida de las células tal como se describió anteriormente en la sección 1; 3) un tratamiento con NTBo/A de 24 h, retirada y lavado de las células, una incubación de las células durante 24 h sin NTBo/A, y recogida de las células tal como se describió anteriormente en la sección 1; 4) una incubación con NTBo/A de 24 h, retirada y lavado de las células, una incubación de las células durante 48 h sin NTBo/A, y recogida de las células tal como se describió anteriormente en la sección 1; y 5) una incubación con NTBo/A de 24 h, retirada y lavado de las células, una incubación de las células durante 72 h sin NTBo/A, y recogida de las células tal como se describió anteriormente en la sección 1. Tras la recogida, se obtuvieron las concentraciones de proteínas de los lisados celulares, la detección del producto de corte de SNAP-25 mediante ELISA de tipo sándwich ECL y se calculó la CE_{50} tal como se describió anteriormente. Los resultados indican que podían lograrse valores de CE_{50} de menos de 2 pM con cualquiera de los tratamientos con NTBo/A sometidos a prueba (figura 5). Resulta interesante que los regímenes de tratamiento con NTBo/A de 24 h + 24 h, 24 h + 48 h y 24 h + 73 h generaron esencialmente los mismos valores de CE_{50} , 1,0 pM, 1,1 pM y 0,9 pM, respectivamente. Los valores de CE_{50} generados para los regímenes de tratamiento con NTBo/A de 6 h + 18 h y 24 h + 0 h fueron de 1,7 pM y 1,6 pM, respectivamente. Aunque la cantidad de señal obtenida fue inferior, estos resultados indican que pueden usarse tiempos de tratamiento con NTBo/A de entre 6 h y 24 h más incubación tras el tratamiento de un día a tres días para generar una CE_{50} que es adecuada para detectar la actividad de NTBo/A y dar flexibilidad en el curso de tiempo global del ensayo.

5. Sensibilidad del método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A.

25 Para evaluar la sensibilidad de los métodos de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A dados a conocer en la presente memoria descriptiva, se determinó el momento de captación de NTBo/A por células susceptibles de intoxicación por NTBo/A. Se sembró en placa una densidad adecuada de células de una línea celular SiMa en los pocillos de placas de cultivo celular de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina que contenían 100 μ l de un medio libre de suero que contenía medio esencial mínimo, GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, suplemento B27 1 x, suplemento N2 1 x, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM y GT1b 20 μ g/ml. Se incubaron las células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que se diferenciaron las células, tal como se evaluó mediante criterios morfológicos convencionales y de rutina, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 3 días). Se aspiraron los medios de cada pocillo, se sustituyeron por medios recién preparados que contenían 1 nM de un complejo de NTBo/A y se incubaron las células tratadas con NTBo/A en seis puntos de tiempo diferentes de 0 min (neurotoxina añadida y luego retirada inmediatamente), 5 min, 35 10 min, 20 min, 30 min y 60 min. Se usó un control negativo de medios sin NTBo/A (0 nM). Tras la incubación, se lavaron las células y se recogieron tal como se describió anteriormente en la sección 1. Tras la recogida, se obtuvieron las concentraciones de proteínas de los lisados celulares, la detección del producto de corte de SNAP-25 mediante ELISA de tipo sándwich ECL y se calculó la CE_{50} tal como se describió anteriormente. Los resultados indicaron que la captación de NTBo/A por las células llevó menos de un minuto antes de producir cantidades significativas de producto de corte de SNAP-25 con respecto al fondo (figura 6).

6. Especificidad del método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A.

45 Para evaluar la especificidad de los métodos de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A dados a conocer en la presente memoria descriptiva, se determinó la capacidad de células susceptibles de intoxicación por NTBo/A para distinguir de manera exacta NTBo/A para la exclusión de NTBo/A inactivada parcialmente. Se sembró en placa una densidad adecuada de células de una línea celular SiMa en los pocillos de placas de cultivo celular de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina que contenían 100 μ l de un medio libre de suero que contenía medio esencial mínimo, GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, suplemento B27 1 x, suplemento N2 1 x, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM y GT1b 25 μ g/ml. Se incubaron las células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que se diferenciaron las células, tal como se evaluó mediante criterios morfológicos convencionales y de rutina, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 3 días). Se aspiraron los medios de cada pocillo y se sustituyeron por medios recién preparados que contenían o bien 1) 0 (muestra no tratada), 0,03 pM, 0,1 pM, 0,31 pM, 0,93 pM, 2,78 pM, 8,33 pM y 25 pM, de un complejo de NTBo/A; 2) 55 0, 0,14 nM, 0,41 nM, 1,23 nM, 3,7 nM, 11,11 nM, 33,33 nM y 100 nM de una NTBo/A inactiva (iNTBo/A); o bien 3) 0, 0,14 nM, 0,41 nM, 1,23 nM, 3,7 nM, 11,11 nM, 33,33 nM y 100 nM de un fragmento LH_N/A. La iNTBo/A contiene una mutación en el dominio de unión a zinc de la cadena ligera que inactiva completamente la actividad metaloproteasa de la neurotoxina, véase, por ejemplo, Liqing Zhou, *et al.*, Expression and Purification of the Light Chain of Botulinum Neurotoxin A: A Single Mutation Abolishes its Cleavage of SNAP-25 and Neurotoxicity after Reconstitution with the Heavy Chain, *Biochemistry* 34: 15175-15181 (1995), que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad. El fragmento LH_N/A carece del dominio de unión, pero contiene un dominio de translocación intacto y la cadena ligera, véase, por ejemplo, Clifford C. Shone, *et al.*, Recombinant Toxin Fragments, patente estadounidense 6.461.617, que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad. Tras el tratamiento de 24 h, se lavaron las células, se incubaron durante unos dos días adicionales sin toxina para permitir el corte del sustrato de SNAP-25 y se recogieron tal como se describió anteriormente en la sección 1. Tras la recogida, se obtuvieron las concentraciones de proteínas de los lisados celulares, la detección del producto de corte de SNAP-25 mediante

ELISA de tipo sándwich ECL y se calculó la CE_{50} tal como se describió anteriormente. Los resultados indican que la afinidad de unión de células por iNTBo/A y LH_N/A ($CE_{50} > 100$ nM) es inferior en al menos 60.000 unidades a la afinidad de unión por NTBo/A ($CE_{50} = 1,6$ pM) (figura 7). No se detectó ningún producto de corte de SNAP-25 en las células tratadas con iNTBo/A en ninguna de las concentraciones sometidas a prueba. Aunque se detectó una baja cantidad de producto de corte de SNAP-25 en las células tratadas con la mayor dosis del fragmento LH_N/A, esta actividad se debe a la captación no específica de este fragmento debido a la actividad del dominio de translocación. Por tanto, los resultados indican que los métodos de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A dados a conocer en la presente memoria descriptiva pueden medir todas las etapas implicadas en el proceso de intoxicación mediante el cual una NTBo/A corta de manera proteolítica un sustrato de SNAP-25 y engloba la unión de una NTBo/A a un receptor de NTBo/A, la internalización del complejo neurotoxina/receptor, la translocación de la cadena ligera de NTBo/A desde una vesícula intracelular en el citoplasma y el corte proteolítico de una SNAP-25.

Ejemplo VI

Método de detección de base inmunológica de actividad de NTBo/A usando ELISA de tipo sándwich ECL

El siguiente ejemplo ilustra métodos de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A mediante la detección de un producto de corte de SNAP-25 usando un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 específico para un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A usando ELISA de tipo sándwich ECL.

Para preparar un lisado de células tratadas con una NTBo/A, se sembró en placa una densidad adecuada de células de una línea celular establecida en los pocillos de placas de cultivo de 96 pocillos que contenían 100 μ l de un medio libre de suero que contenía medio esencial mínimo, GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, suplemento B27 1 x, suplemento N2 1 x, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM y GT1b 25 μ g/ml (véanse los ejemplos I y II). Se incubaron estas células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que se diferenciaron las células, tal como se evaluó mediante criterios morfológicos convencionales y de rutina, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 3 días). Se aspiraron los medios de las células diferenciadas de cada pocillo y se sustituyeron por medios recién preparados que contenían cualquiera de 0 (muestra no tratada), 0,03 pM, 0,1 pM, 0,3 pM, 0,9 pM, 2,8 pM, 8,3 pM y 25 pM de un complejo de NTBo/A. Tras un tratamiento de 24 h, se lavaron las células y se incubaron durante unos dos días adicionales sin toxina. Se recogieron las células tal como se describe en el ejemplo V.

Para preparar la disolución del anticuerpo de captura α -SNAP-25, se purificó el anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 contenido en los líquidos ascíticos de la línea celular de hibridoma 2E2A6 usando un protocolo de purificación de proteína A convencional. Para preparar la disolución de anticuerpo de detección α -SNAP-25, se conjugó anticuerpo policlonal de conejo α -SNAP-25 S9684 (Sigma, San Luis, MO) con el reactivo de marcado éster de NHS de trispiridín-(4-metilsulfonato) de rutenio (II) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) según las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). La reacción de conjugación, la purificación del anticuerpo α -SNAP-25 marcado, la determinación de la concentración y el almacenamiento fueron tal como se describe en el ejemplo V.

Para preparar el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura que es específico para un producto cortado de SNAP-25, se añadieron aproximadamente 5 μ l de disolución de anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 2E2A6 (20 μ g/ml en PBS 1 x) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos MSD High Bind y se permitió que se secase al aire la disolución en una cabina de seguridad biológica durante 2-3 horas con el fin de evaporar líquido de la disolución. Luego se bloquearon los pocillos con anticuerpo de captura unido y se usaron directamente para detectar actividad de NTBo/A.

Para detectar la presencia de un producto de SNAP-25 cortado mediante análisis de ELISA de tipo sándwich ECL, se aspiró de los pocillos el tampón de bloqueo de las placas almacenadas, se añadieron 25 μ l de un lisado de células tratadas con NTBo/A a cada pocillo y se incubaron las placas a 4°C durante la noche. Se lavaron los pocillos de las placas tres veces mediante la aspiración del lisado celular y el aclarado de cada pocillo tres veces con 200 μ l de PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadieron 25 μ l de la disolución 5 μ g/ml de anticuerpo de detección que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano) a cada pocillo, se selló la placa y se incubó la placa sellada a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Tras la incubación del anticuerpo de detección, se lavaron los pocillos tres veces con 200 μ l de PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadieron 150 μ l de tampón de lectura 1 x (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y se leyeron las placas usando un lector de imágenes SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Se analizaron los datos recogidos y se calculó la CE_{50} tal como se describe en el ejemplo V. En la figura 8 se muestra un resultado representativo. Estos resultados indicaron que en promedio se detectó 1,0 pM de NTBo/A a la CE_{50} (un intervalo de aproximadamente 0,3 pM a aproximadamente 2,0 pM) con una relación señal-ruido para la asíntota inferior de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 20:1 y una relación señal-ruido para la asíntota superior de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 500:1.

Ejemplo VIIMétodo de detección de base inmunológica de actividad de NTBo/A usando ELISA de tipo sándwich CL

El siguiente ejemplo ilustra métodos de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A mediante la detección de un producto de corte de SNAP-25 usando un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 específico para una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A mediante ELISA de tipo sándwich CL.

Se prepararon el lisado de células tratadas con una NTBo/A y la disolución de anticuerpo de captura α -SNAP-25 tal como se describe en el ejemplo VI.

Para preparar la disolución de anticuerpo de detección α -SNAP-25, se conjugó el anticuerpo policlonal α -SNAP-25 S9684 (Sigma, San Luis, MO) con peroxidasa de rábano (HRP) según las instrucciones del fabricante (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). Se realizó la reacción de conjugación mediante la adición a 500 μ l de anticuerpos policlonales 1 mg/ml α -SNAP-25 a un vial que contenía peroxidasa activada liofilizada, el mezclado de los componentes y luego la adición de 10 μ l de cianoborohidruro de sodio. Se incubó esta mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora en una campana extractora. Tras extinguir la reacción, se purificaron los anticuerpos marcados usando un protocolo de columna de centrifugación convencional y se determinó la concentración de proteína usando un ensayo de proteínas colorimétrico convencional. Se midió la absorbancia del conjugado anticuerpo policlonal α -SNAP-25/HRP a 455 nm usando un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. Se almacenó la disolución de anticuerpo α -SNAP-25 a 4°C hasta que se necesitó.

Para preparar el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura α -SNAP-25 que es específico para el producto cortado de SNAP-25, se añadieron aproximadamente 100 μ l de disolución de anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 2E2A6 (1 mg/ml en PBS 1 x) a cada pocillo de una placa blanca Greiner de 96 pocillos y se incubaron las placas a 4°C durante la noche, y luego se desechó cualquier cantidad de disolución de anticuerpo en exceso. Entonces se bloquearon los pocillos con anticuerpo de captura unido mediante la adición de 150 μ l de tampón de bloqueo que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y suero de cabra al 10% (VWR, West Chester, PA) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se desechó el tampón de bloqueo y se secaron las placas sobre toallitas de papel mediante inversión y golpeo. Entonces se bloquearon los pocillos con anticuerpo de captura unido y se usaron directamente para detectar actividad de NTBo/A.

Para detectar la presencia de un producto de SNAP-25 cortado mediante análisis de ELISA de tipo sándwich CL, se añadieron 50 μ l de un lisado de células tratadas con NTBo/A a cada pocillo, se selló la placa y se incubó la placa sellada en un agitador que rotaba a 500 rpm a 4°C durante de 2-4 horas a toda la noche. Se lavaron los pocillos de las placas tres veces mediante la aspiración del lisado celular y el aclarado de cada pocillo tres veces con 200 μ l de PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,05% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadieron 100 μ l de la disolución 1 mg/ml de anticuerpo policlonal α -SNAP-25/anticuerpo de detección-HRP que comprendía el reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano) a cada pocillo, se selló la placa y se incubó la placa sellada en un agitador que rotaba a 650 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la incubación del anticuerpo de detección, se lavaron los pocillos tres veces con 200 μ l de PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,05% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadieron 100 μ l de mezcla 1:1 de SuperSignal ELISA Pico (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) a cada pocillo y se leyeron las placas usando un luminómetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 395 nm. Se analizaron los datos recogidos y se calculó la CE₅₀ tal como se describe en el ejemplo V. Estos resultados indicaron que en promedio se detectó 1,0 pM de NTBo/A a la CE₅₀ (un intervalo de aproximadamente 0,3 pM a aproximadamente 2,0 pM) con una relación señal-ruido para la asíntota inferior de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 20:1 y una relación señal-ruido para la asíntota superior de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 500:1.

Ejemplo VIIIMétodo de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A usando ELISA de tipo sándwich ECL múltiplex

El siguiente ejemplo ilustra métodos de base inmunológica múltiplex de detección de actividad de NTBo/A mediante la detección de un producto de corte de SNAP-25 usando un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 específico para un producto de corte de SNAP-25 y un segundo par de anticuerpos para una proteína diferente.

1. Preparación e identificación del par anticuerpo de captura-anticuerpo de detección para una segunda proteína.

Para obtener un lisado celular no tratado para análisis, se sembró una densidad adecuada de células de un cultivo madre de células SiMa en un matraz T175 que contenía 40 ml de un medio de crecimiento que contenía RPMI 1640 1X, FBS al 10%, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM y 100 U/100 μ g de

penicilina-estreptomicina. Se incubaron estas células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que las células fueron confluentes en aproximadamente el 70-90%. Se lavaron las células y se recogieron mediante lisis en tampón de lisis Triton-X recién preparado (Tris 20 mM pH 7,5, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 0,001 M, EGTA 1 mM y Triton-X-100 al 1%) a 4°C durante aproximadamente 30 minutos con agitación constante. Se centrifugaron las células lisadas a aproximadamente 3300-3330 x g durante 40 minutos a 8°C para eliminar los residuos usando una centrífuga de mesa.

Para identificar un par anticuerpo de captura-anticuerpo de detección apropiado para una segunda proteína, se llevó a cabo un análisis de ELISA de tipo sándwich ECL con 21 combinaciones diferentes de pares de anticuerpos de captura y detección que comprendían cinco proteínas diferentes (tabla 13). Los anticuerpos usados eran anticuerpo monoclonal de ratón α -sintaxina 1A-HPC S0664 (Sigma, San Luis, MO), anticuerpo monoclonal de ratón α -GAPDH MAB374 (Chemicon, Temecula, CA), anticuerpo policlonal de conejo α -sintaxina 1 S1172-1 (Sigma, San Luis, MO), anticuerpo policlonal de conejo α -GAPDH 2275-PC-1 (R & D Systems, Mineápolis, MN), anticuerpo policlonal de conejo α -sintaxina 2 S5687 (Sigma, San Luis, MO), anticuerpo monoclonal de ratón α -sintaxina 2 humana MAB2936 (R & D Systems, Mineápolis, MN), anticuerpo policlonal de cabra α -sintaxina 2 de ratón AF2568 (Sigma, San Luis, MO), anticuerpo policlonal de conejo α -sintaxina 2 AB5596 (Sigma, San Luis, MO), anticuerpo policlonal de conejo α -sintaxina 1 S1172-2 (Sigma, San Luis, MO), anticuerpo policlonal de oveja α -h, m, r-actina AF4000 (R & D Systems, Mineápolis, MN), anticuerpo monoclonal de ratón α -beta-actina A1978 (Sigma, San Luis, MO), anticuerpo policlonal de ratón α -beta-actina A2228 (Sigma, San Luis, MO), anticuerpo monoclonal de ratón α -GAPDH de ratón G8795 (Sigma, San Luis, MO), anticuerpo policlonal de conejo α -GAPDH G9595 (Sigma, San Luis, MO).

Para preparar la disolución de anticuerpo de captura de segunda proteína, se adquirieron los anticuerpos monoclonales como anticuerpos purificados. Para preparar la disolución de anticuerpo de detección de segunda proteína, se conjugó el anticuerpo apropiado con el reactivo de marcado éster de NHS de tris-bipiridin-(4-metilsulfonato) de rutenio (II) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) según las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Se realizó la reacción de conjugación mediante la adición de 30 μ l de disolución madre de MSD SULFO-TAG™ reconstituida con agua destilada hasta 200 μ l de anticuerpos policlonales 2 mg/ml y la incubación de la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas en la oscuridad. Se purificaron los anticuerpos marcados usando un protocolo de columna de centrifugación convencional y se determinó la concentración de proteína usando un ensayo de proteínas colorimétrico convencional. Se midió la absorbancia del conjugado anticuerpo/MSD SULFO-TAG™ a 455 nm usando un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. Se almacenó la disolución de anticuerpo de detección a 4°C hasta que se necesitó.

Para preparar el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura que es específico para un producto cortado de SNAP-25, se añadieron aproximadamente 5 μ l de disolución de anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 2E2A6 (20 μ g/ml en PBS 1 x) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos MSD High Bind y se permitió que se secase al aire la disolución en una cabina de seguridad biológica durante 2-3 horas con el fin de evaporar líquido de la disolución, y luego se sellaron las placas y se almacenaron a 4°C hasta que se necesitaron. Luego se bloquearon los pocillos con anticuerpo de captura secado unido mediante la adición de 150 μ l de tampón de bloqueo que comprendía BSA al 3% (Pierce, Rockford, IL) suero de cabra al 10% (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA), y leche desnatada al 1% de Difco (BD BioSciences Franklin Lakes, NJ) en Tween-20 PBS al 5% a temperatura ambiente durante 1-2 horas.

Para detectar la presencia de proteína mediante análisis de ELISA de tipo sándwich ECL, se aspiró de los pocillos el tampón de bloqueo de las placas almacenadas, se añadieron 25 μ l de un lisado de células tratadas con NTBo/A, tal como se describió anteriormente, a cada pocillo y se incubaron las placas a 4°C durante la noche. Se lavaron los pocillos de las placas tres veces mediante la aspiración del lisado celular y el aclarado de cada pocillo tres veces con 200 μ l de PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadieron 25 μ l de la disolución 5 μ g/ml de anticuerpo de detección de segunda proteína apropiada, resuspendida en el tampón de bloqueo tal como se describió anteriormente, a cada pocillo, se selló la placa y se incubó la placa sellada a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora con agitación. Tras la incubación del anticuerpo de detección, se lavaron los pocillos tres veces con 250 μ l de PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadieron 150 μ l de tampón de lectura 1 x (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y se leyeron las placas usando un lector de imágenes SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Se calculó una razón dividiendo la señal obtenida de los lisados celulares no tratados para cada par de anticuerpos entre la señal obtenida para el control de tampón de lisis (dosis de 0 nM) para cada par de anticuerpos (tabla 13). Estos resultados indicaron que entre las veintiuna combinaciones diferentes de pares de anticuerpos sometidos a prueba, sólo dos pares de anticuerpos tenían relaciones señal-ruído por encima de 10:1 para la mayor dosis sometida a prueba: n.º de par 16: anticuerpo monoclonal de ratón α -GAPDH MAB374 y anticuerpo policlonal de conejo α -GAPDH RDS2275-PC-1; y par 21 : anticuerpo monoclonal de ratón α -GAPDH MAB374 y anticuerpo policlonal de conejo α -GAPDH G9545. Se seleccionó el par de anticuerpo monoclonal de ratón α -GAPDH MAB374 y el anticuerpo policlonal de conejo α -GAPDH G9545 como el par de anticuerpo de captura-anticuerpo de detección de segunda proteína para el ELISA de tipo sándwich ECL múltiplex.

Tabla 13. Examen de combinaciones de anticuerpos de segunda proteína				
N.º de par de anticuerpos	Anticuerpo de captura	Anticuerpo de detección	Detección de proteína	Relación señal/ruido (lisado/tampón)
1	AcP α -sintaxina 2 S5687	AcM α -sintaxina 2 MAB2936	No	0,92
2	AcP α -sintaxina 2 AF2568	AcP α -sintaxina 2 AB5596	No	1,1
3	α -sintaxina 2 AF2568	AcP α -sintaxina 2 S5687	No	1,11
4	AcP α -sintaxina 2 AF2936	AcP α -sintaxina 2 AB5596	Sí	1,63
5	AcP α -sintaxina 2 AF2936	AcP α -sintaxina 2 S5687	Sí	1,6
6	AcP α -sintaxina 2 AB5596	AcP α -sintaxina 2 S5687	No	0,82
7	AcP α -sintaxina 2 AB5596	AcM α -sintaxina 2 MAB2936	No	0,87
8	AcM α -sintaxina 2 MAB2936	AcM α -sintaxina 2 AB5596	Sí	1,2
9	AcP α -sintaxina 2 MAB2936	AcM α -sintaxina 2 S5687	No	1,07
10	AcM α -sintaxina S0664	AcP α -sintaxina 1 S1172-1	Sí	4,23
11	AcM α -sintaxina S0664	AcP α -sintaxina 1 S1172-2	No	1,21
12	AcP α -sintaxina 1 S1172-1	AcM α -sintaxina S0664	Sí	5,5
13	AcP α -sintaxina 1 S1172-2	AcM α -sintaxina S0664	Sí	2,5
14	AcP α -h, m, r-actina AF4000	AcM α -beta-actina A1978	No	1,04
15	AcP α -h, m, r-actina AF4000	AcM α -beta-actina A2228	No	1,08
16	AcM α -GAPDH MAB374	AcP α -GAPDH 2275-PC-1	Sí	20,04
17	AcM α -GAPDH MAB374	AcM α -GAPDH G8795	No	0,89
18	AcP α -GAPDH 2275-PC-1	AcM α -GAPDH MAB374	No	1,08
19	AcP α -GAPDH 2275-PC-1	AcM α -GAPDH G8795	Sí	1,27
20	AcM α -GAPDH G8795	AcP α -GAPDH 2275-PC-1	Sí	2,74
21	AcM α -GAPDH MAB374	AcP α -GAPDH G9545	Sí	≥ 100

2. Método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/ A usando ELISA de tipo sándwich ECL múltiplex.

5 Para obtener un lisado de células tratadas con NTBo/A para análisis, se sembró una densidad adecuada de células de un cultivo madre de una línea celular SiMa en una placa de 96 pocillos con poli-D-lisina que contenía un medio libre de suero que contenía medio esencial mínimo, GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, suplemento B27 1 x, suplemento N2 1 x, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM. Se incubaron estas células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que se diferenciaron las células, tal como se evaluó mediante criterios morfológicos convencionales y de rutina, tales como detención del crecimiento y crecimiento de neuritas (aproximadamente 3 días). Se aspiraron los medios de cada pocillo y se sustituyeron por medios recién preparados que contenían o bien 0 (muestra no tratada), 0,67 U/ml, 2,35 U/ml, 8,23 U/ml, 28,82 U/ml, 101 U/ml, o bien 353 U/ml de un complejo de NTBo/A. Tras un tratamiento de 24 h, se lavaron las células, se incubaron durante unos dos días adicionales sin toxina. Se lavaron las células, se recogieron y se procesaron tal como se describió anteriormente en la sección 1.

20 Se prepararon la disolución de anticuerpo de captura α -SNAP-25 y la disolución de anticuerpo de detección α -SNAP-25, tal como se describe en el ejemplo VII. Para preparar la disolución de anticuerpo de captura α -GAPDH, se preparó el anticuerpo monoclonal de ratón α -GAPDH MAB374 (Chemicon, Temecula, CA) tal como se describe en la sección 1 anteriormente. Para preparar la disolución de anticuerpo de detección α -GAPDH, se conjugó el anticuerpo policlonal de conejo α -GAPDH G9545 (Sigma, San Luis, MO) con el reactivo de marcado éster de NHS de tris-bipiridin-(4-metilsulfonato) de rutenio (II) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) según las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). La reacción de conjugación, la purificación del anticuerpo α -SNAP-25 marcado, la determinación de la concentración y el almacenamiento fueron tal como se describen en la sección 1 anteriormente.

30 Para preparar el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura α -SNAP-25 y el anticuerpo de captura α -GAPDH, se añadieron aproximadamente 2,5 nl de la disolución de anticuerpo de captura α -SNAP-25 (45 μ g/ml en PBS 1 x) y se añadieron 2,5 nl de la disolución de anticuerpo de captura α -GAPDH (120 μ g/ml en PBS 1 x) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos MSD High Bind en un formato múltiplex usando un sistema robótico. Se permitió que se secase al aire la disolución en una cabina de seguridad biológica durante al menos 2-3 horas para evaporar líquido de la disolución. Entonces se bloquearon los pocillos con anticuerpo de captura unido y se usaron directamente para detectar actividad de NTBo/A y la proteína GAPDH.

35 Para detectar la presencia de producto de corte de SNAP-25 mediante análisis de ELISA de tipo sándwich ECL múltiplex, se aspiró de los pocillos el tampón de bloqueo de las placas almacenadas, se añadieron 25 μ l de un lisado de células tratadas con NTBo/A, tal como se describió anteriormente, a cada pocillo y se incubaron las placas a 4°C

durante la noche. Se lavaron los pocillos de las placas tres veces mediante la aspiración del lisado celular y el aclarado de cada pocillo tres veces con 200 μ l de PBS 1 x, TWEEN-20[®] al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadieron 25 μ l de la disolución 5 μ g/ml de anticuerpo de detección α -SNAP-25 y 25 μ l de la disolución 5 μ g/ml de anticuerpo de detección α -GAPDH, tal como se describió anteriormente, a cada pocillo, se selló la placa y se incubó la placa sellada a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora con agitación. Tras la incubación del anticuerpo de detección, se lavaron los pocillos tres veces con 250 μ l de PBS 1 x, TWEEN-20[®] al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadieron 150 μ l de tampón de lectura 1 x (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y se leyeron las placas usando un lector de imágenes SECTOR[™] Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Se analizaron los datos recogidos y se calculó la potencia relativa a partir de los datos normalizados tal como se describe en el ejemplo V, excepto porque se usó software PLA 2.0 (Stegmann Systems, GmbH, Alemania).

Como comparación, también se realizó la detección de producto de corte de SNAP-25 usando el ELISA de tipo sándwich ECL monoplex tal como se describe en el ejemplo VI.

Los resultados indicaron que los datos de SNAP-25 obtenidos del ELISA de tipo sándwich ECL monoplex, o a partir de los datos de SNAP-25 no normalizados obtenidos del ELISA de tipo sándwich ECL múltiple, revelaron una dosis de muestra aberrante que no se ajustó en la curva de dosis-respuesta. Sin embargo, la normalización de los datos de SNAP-25 frente a los datos de GAPDH proporcionó un mejor ajuste de la curva y la potencia estaba más próxima al valor esperado.

Ejemplo IX

Método de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A usando ELISA de tipo sándwich EC múltiple

El siguiente ejemplo ilustra métodos de base inmunológica múltiple de detección de actividad de NTBo/A mediante la detección de un producto de corte de SNAP-25 usando un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 específico para un producto de corte de SNAP-25 y un segundo par de anticuerpos para una proteína diferente.

Se preparó el lisado de células tratadas con una NTBo/A tal como se describe en el ejemplo VI. Se prepararon la disolución de anticuerpo de captura α -SNAP-25, la disolución de anticuerpo de detección α -SNAP-25 y el soporte de fase sólida de α -SNAP-25 tal como se describe en el ejemplo VII.

Para preparar la disolución de anticuerpo de captura α -GAPDH, se adquirió el anticuerpo monoclonal α -GAPDH MAB374 (Millipore, Billerica, MA) como anticuerpo purificado. Para preparar la disolución de anticuerpo de detección α -GAPDH, se conjugó un anticuerpo policlonal α -GAPDH G9545 (Sigma, San Luis, MO) con peroxidasa de rábano (HRP) según las instrucciones del fabricante (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). La reacción de conjugación, la determinación de la concentración y el almacenamiento fueron tal como se describen en el ejemplo VII.

Para preparar el soporte de fase sólida que comprende un segundo anticuerpo de captura específico para la segunda proteína, se añadieron aproximadamente 100 μ l de disolución de anticuerpo monoclonal que comprendía 1 μ g/ml de anticuerpo monoclonal α -GAPDH MAB374 a cada pocillo de una placa blanca Greiner de 96 pocillos y se incubaron las placas a 4°C durante la noche, y luego se desechó cualquier cantidad de disolución de anticuerpo en exceso. Entonces se bloquearon los pocillos con anticuerpo de captura α -GAPDH unido mediante la adición de 150 μ l de tampón de bloqueo que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y suero de cabra al 10% (VWR, West Chester, PA) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se desechó el tampón de bloqueo y se secaron las placas sobre toallitas de papel mediante inversión y golpeo. Entonces se bloquearon los pocillos con anticuerpo de captura unido y se usaron directamente para detectar actividad de NTBo/A.

Para detectar la presencia de un producto de SNAP-25 cortado mediante análisis de ELISA de tipo sándwich CL múltiple, se añadieron 50 μ l de lisados celulares de células tratadas con NTBo/A a cada pocillo del soporte de fase sólida de anticuerpo de captura α -SNAP-25 y el soporte de fase sólida de anticuerpo de captura α -GAPDH, se selló la placa y se incubó la placa sellada en un agitador que rotaba a 500 rpm a 4°C durante de 2-4 horas a toda la noche. Se lavaron los pocillos de las placas tres veces mediante la aspiración del lisado celular y el aclarado de cada pocillo tres veces con 200 μ l de PBS 1 x, TWEEN-20[®] al 0,05% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadieron 100 μ l de la disolución de anticuerpo de detección que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en PBS 1 x, TWEEN-20[®] al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano), y 1 mg/ml de anticuerpo policlonal α -SNAP-25/HRP a cada pocillo del soporte de fase sólida de anticuerpo de captura α -SNAP-25, se selló la placa y se incubó la placa sellada en un agitador que rotaba a 650 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. De manera similar, se añadieron 100 μ l de una disolución de anticuerpo de detección que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en PBS 1 x, TWEEN-20[®] al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano) y 0,25 mg/ml de anticuerpo policlonal α -GAPDH G9545/HRP (Sigma Co., San Luis, MO) a cada pocillo del soporte de fase sólida de anticuerpo de captura α -GAPDH, se selló la placa y se colocó la

placa sellada en un agitador que rotaba a 650 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la incubación del anticuerpo de detección, se lavaron los pocillos tres veces con 200 μ l de PBS 1 x, TWEEN-20[®] al 0,05% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadieron 100 μ l de mezcla 1:1 de SuperSignal ELISA Pico (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) a cada pocillo y se leyeron las placas usando un luminómetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 395 nm. Se analizaron los datos recogidos y se calculó la CE₅₀ tal como se describe en el ejemplo V. Los resultados indicaron que los puntos de datos recogidos para las cantidades de complejo antígeno-anticuerpo α -SNAP-25 detectado fueron un mejor ajuste tras la normalización con las cantidades de complejo antígeno-anticuerpo α -GAPDH detectado, produciendo de ese modo una lectura más exacta. Estos resultados indicaron que en promedio se detectó 1,0 pM de NTBo/A a la CE₅₀ (un intervalo de aproximadamente 0,3 pM a aproximadamente 2,0 pM) con una relación señal-ruido para la asíntota inferior de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 20:1 y una relación señal-ruido para la asíntota superior de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 500:1.

Puede usarse un diseño similar para métodos de base inmunológica múltiplex de detección de actividad de NTBo/A mediante la detección de un producto de corte de SNAP-25 usando un anticuerpo monoclonal α -SNAP-25 específico para un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A usando ELISA de tipo sándwich ECL con el mismo par de anticuerpos α -GAPDH.

Ejemplo X

Método de base inmunológica para detectar cantidades picomolares de NTBo/A

El siguiente ejemplo ilustra cómo realizar métodos de base inmunológica de detección de actividad de NTBo/A que pueden detectar cantidades picomolares del producto farmacéutico de NTBo/A, tal como, por ejemplo, BOTOX[®] DYSPORE[®]/RELOXIN[®], PURTOX[®], XEOMIN[®], NEURONOX[®] o BTX-A.

1. Método de base inmunológica de detección de NTBo/A usando ELISA de tipo sándwich ECL.

Para preparar un lisado de células tratadas con una NTBo/A, se sembraron en placa aproximadamente de 50.000 a 150.000 células de una línea celular establecida en los pocillos de placas con poli-D-lisina de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían 100 μ l de un medio libre de suero que contenía medio esencial mínimo, GlutaMAX[™] I 2 mM con sales de Earle, suplemento B27 1x, suplemento N2 1x, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM y GT1b 25 μ g/ml (véanse los ejemplos I y II). Se incubaron estas células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que se diferenciaron las células, tal como se evaluó mediante criterios morfológicos convencionales y de rutina, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente de 2 a 3 días). Se aspiraron los medios de las células diferenciadas de cada pocillo y se sustituyeron por medios recién preparados que contenían o bien 0 (muestra no tratada), 0,03 pM, 0,1 pM, 0,3 pM, 0,9 pM, 2,8 pM, 8,3 pM o bien 25 pM de un producto farmacéutico de NTBo/A reconstituido en una disolución libre de cloruro de sodio; o 0 (muestra no tratada), 0,7 U/ml, 2,1 U/ml, 6,2 U/ml, 18,5 U/ml, 55,6 U/ml, 166,7 U/ml o 500 U/ml de un producto farmacéutico de NTBo/A reconstituido en un medio libre de cloruro de sodio. Dado que el producto farmacéutico de NTBo/A contiene cloruro de sodio, su adición al medio de cultivo dio como resultado un medio hipertónico que era perjudicial para la viabilidad celular. Para solventar el problema de la hipertonicidad, se usaron 200 μ l de medio MEM preparado sin cloruro de sodio para reconstituir el producto farmacéutico de NTBo/A proporcionando una concentración final de NTBo/A 25 pM (500 U/ml). Se mantuvo constante la matriz para todas las concentraciones a lo largo de la curva de dosis-respuesta mediante la adición de cloruro de sodio en el medio usado para hacer que las diluciones concuerden con la cantidad de excipientes presentes a la mayor concentración usada (25 pM o 500 U/ml). Tras un tratamiento de 24 h, se lavaron las células y se incubaron durante unos dos días adicionales sin toxina. Para recoger las células, se aspiró el medio, se lavó con PBS 1 x, y se lisó mediante la adición de 30 μ l de tampón de lisis que comprendía HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1% a cada pocillo y se incubó la placa en un agitador que rotaba a 500 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se centrifugó la placa a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C para sedimentar los residuos celulares y se transfirió el sobrenadante a una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpo de captura para realizar la etapa de detección.

Se prepararon la disolución de anticuerpo de captura α -SNAP-25, la disolución de anticuerpo de detección α -SNAP-25 y el soporte de fase sólida que comprendía el anticuerpo de captura que es específico para un producto cortado de SNAP-25 tal como se describe en el ejemplo VI.

Para detectar la presencia de un producto de SNAP-25 cortado mediante análisis de ELISA de tipo sándwich ECL, se aspiró el tampón de bloqueo de las placas almacenadas, se añadieron 25 μ l de un lisado de células tratadas con NTBo/A a cada pocillo y se incubaron las placas a 4°C durante o bien 2 h o bien 24 h. Se lavaron los pocillos de las placas tres veces mediante la aspiración del lisado celular y el aclarado de cada pocillo tres veces con 200 μ l de PBS 1 x, TWEEN-20[®] al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadieron 25 μ l de la disolución 5 μ g/ml de anticuerpo de detección α -SNAP-25 que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en PBS 1 x, TWEEN-20[®] al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano) a cada pocillo, se selló la

placa y se incubó la placa sellada a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Tras la incubación del anticuerpo de detección α -SNAP-25, se lavaron los pocillos tres veces con 200 μ l de PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se procesaron las placas, se analizaron los datos recogidos y se calculó la CE_{50} tal como se describe en el ejemplo V. Estos resultados indicaron que en promedio se detectó 1,0 pM de NTBo/A a la CE_{50} (un intervalo de aproximadamente 0,3 pM a aproximadamente 2,0 pM) con una relación señal-ruido para la asíntota inferior de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 20:1 y una relación señal-ruido para la asíntota superior de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 500:1 (figura 9). Este método también puede realizarse en un modo múltiplex tal como se describe en el ejemplo VIII.

2. Método de base inmunológica de detección de NTBo/A usando ELISA de tipo sándwich CL.

Se prepararán el lisado de células tratadas con una NTBo/A y la disolución de anticuerpo de captura α -SNAP-25 tal como se describe en el ejemplo VI. Se prepararán la disolución de anticuerpo de detección α -SNAP-25 y el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura que es específico para un producto cortado de SNAP-25 tal como se describe en el ejemplo VII.

Para detectar la presencia de un producto de SNAP-25 cortado mediante análisis de ELISA de tipo sándwich CL, se añadirán 25 μ l de un lisado de células tratadas con NTBo/A a cada pocillo, se sellará la placa y se incubará la placa sellada en un agitador que rota a 500 rpm a 4°C durante o bien 2 h o bien 24 h. Se lavarán los pocillos de las placas tres veces mediante la aspiración del lisado celular y el aclarado de cada pocillo tres veces con 200 μ l de PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,05% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadirán 100 μ l de disolución 1 mg/ml de anticuerpo de detección de anticuerpo policlonal α -SNAP-25/HRP que comprende reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,1% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano) a cada pocillo, se sellará la placa y se incubará la placa sellada en un agitador que rota a 650 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la incubación del anticuerpo de detección, se lavarán los pocillos tres veces con 200 μ l de PBS 1 x, TWEEN-20® al 0,05% (monolaureato de polioxietileno (20) y sorbitano). Tras el lavado, se añadirán 100 μ l de mezcla 1:1 de SuperSignal ELISA Pico (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) a cada pocillo y se leerán las placas usando un luminómetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 395 nm. Se analizarán los datos recogidos y se calculará la CE_{50} tal como se describe en el ejemplo V. Este método también puede realizarse en un modo múltiplex tal como se describe en el ejemplo VIII.

Ejemplo XI

Método de base inmunológica para detectar anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A

El siguiente ejemplo ilustra cómo realizar un método de base inmunológica que puede detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A.

NTBo/A, se usa actualmente para una amplia variedad de indicaciones médicas incluyendo de hiperactividad muscular, oftalmológicas, gastrointestinales, urológicas y cosméticas. Con el tratamiento a largo plazo repetido de NTBo/A, un paciente puede desarrollar anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A frente a la toxina que conducen a inmunorresistencia. Los anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A inhiben la actividad de NTBo/A mediante la detención de la captación de la toxina en células neuronales mediante la unión al dominio de unión (H_c) y/o el dominio de translocación (H_N) de NTBo/A. Algunos estudios han sugerido que hasta el 5-10% de los pacientes tratados repetidamente para distonía con formulaciones de NTBo/A tienen inmunorresistencia debido al desarrollo de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A. El ensayo establecido para determinar la presencia de los anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A en la sangre del paciente es el ensayo de protección de ratón (MPA). Actualmente, se incubaba NTBo/A con el suero de un paciente antes de la inyección en ratones. La presencia de anticuerpos se manifiesta por una disminución de la respuesta a la neurotoxina en el animal. Puesto que el MPA es un ensayo basado *in vivo*, sería más rentable en cuanto a tiempo y coste si se sustituyera por un ensayo basado en células.

Para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A, pueden usarse los métodos de base inmunológica de determinación de actividad de NTBo/A dados a conocer en la presente memoria descriptiva. Una manera es determinar la cantidad de producto de corte de SNAP-25 presente tras el tratamiento con diversas concentraciones de NTBo/A usando un método de detección de inmunotransferencia de tipo Western, la otra manera era usar un método de detección de ELISA de tipo sándwich ECL.

Para preparar una muestra que comprendía anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A y una muestra de control negativo que se sabía que carecía de anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A, se aisló el suero de la sangre de diferentes individuos. Los individuos que declinaron las inmunizaciones se denominaron individuos no tratados previamente. Los individuos que aceptaron la inmunización se denominaron individuos inmunizados. Se extrajo la sangre en un tubo de suero con un activador de la coagulación (BD Biosciences, Bedford, MA). Se obtuvo el suero mediante centrifugación de la sangre a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se obtuvo el suero de dos donantes: se inmunizó un individuo frente a NTBo/A mientras que el otro no.

- 5 Para preparar un lisado de células tratadas con una muestra que comprendía NTBo/A, se sembraron células SiMa en una placa de 96 pocillos con poli-D-lisina y se diferenciaron tal como se describe en el ejemplo VI. Se diluyeron los sueros humanos en serie 1 :100 -1 :152.000 mediante incrementos de 2,5 veces usando medios libres de suero. Se suspendió la NTBo/A en 0,5 ml de medios de cultivo SiMa a una concentración de 10 pM. Se mezclaron los medios que contenían NTBo/A y anticuerpos α -NTBo/A y se incubaron durante 15 min o 1 h a temperatura ambiente. Se trataron las células con NTBo/A con suero humano durante 2 h seguido por una incubación de 15 h en medios de crecimiento recién preparados. También se trataron las células durante 15 h sin tiempo de incubación adicional.
- 10 Para detectar la presencia de un producto de SNAP-25 cortado mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western, se aspiraron los medios de cada pocillo, se suspendieron las células en 50 μ l de tampón de carga de SDS-PAGE, y luego se calentaron hasta 95°C durante 5 minutos. Se analizó una alícuota de cada muestra recogida mediante inmunotransferencia de tipo Western tal como se describe en el ejemplo I, excepto porque se separan las muestras recogidas mediante SDS-PAGE usando geles Criterion de 26 pocillos al 12% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), y se usó el suero de anticuerpo policlonal de conejo α -SNAP-25₁₉₇ como anticuerpo primario (véase el ejemplo IV). Los resultados indican que las muestras de prueba dieron como resultado un corte reducido de SNAP25 en comparación con la muestra de control negativo, demostrando que el suero del individuo inmunizado contenía anticuerpos neutralizantes α -NTBo/A.
- 20 Para detectar la presencia de un producto de SNAP-25 cortado mediante ELISA de tipo sándwich ECL, se retiraron los medios de cada pocillo y se lisaron las células tal como se describe en el ejemplo V. Se prepararon la disolución de anticuerpo de captura α -SNAP-25, la disolución de anticuerpo de detección α -SNAP-25 y el soporte de fase sólida de α -SNAP-25 tal como se describe en el ejemplo VII. Se transfirieron los sobrenadantes al soporte de fase sólida de α -SNAP-25 y se realizó un ensayo de ELISA de tipo sándwich ECL tal como se detalla en el ejemplo V. Se analizaron los datos recogidos y se calculó la CE_{50} tal como se describe en el ejemplo V, excepto porque se obtuvo la CE_{50} que es la dilución en suero necesaria para inhibir la actividad de la NTBo/A hasta $\frac{1}{2}$ de su máximo y la razón de señal máxima (señal_{Máx.}) con respecto a la señal mínima (señal_{Mín.}) dividiendo la señal del producto de corte de SNAP-25 obtenida con la mayor dilución de suero entre la señal obtenida con la menor dilución de suero.
- 30 Los resultados indican que podría detectarse la presencia de α -NTBo/A neutralizante en suero humano. La actividad del complejo de NTBo/A incubado en suero del individuo inmunizado disminuyó a medida que disminuyó la dilución del suero, mientras que la presencia de suero no tratado previamente no tuvo ningún impacto sobre el ensayo en cada dilución sometida a prueba. Este ensayo puede realizarse usando un producto farmacéutico de NTBo/A formulado, un complejo de NTBo/A a granel o una neurotoxina purificada.

35 Ejemplo XII

40 Método de base inmunológica para detectar actividad de NTBo/A usando células modificadas mediante ingeniería genética

El siguiente ejemplo ilustra cómo introducir una molécula de polinucleótido que codifica para un receptor de NTBo/A en células de una línea celular establecida para mejorar adicionalmente la susceptibilidad a la intoxicación por NTBo/A o mejorar la capacidad de captación de NTBo/A.

- 45 Para introducir un receptor de NTBo/A exógeno en células que comprendían una línea celular establecida, se transfirió un constructo de expresión que comprendía una molécula de polinucleótido de SEQ ID NO: 130 que codifica para el FGFR2 de SEQ ID NO: 59, o una molécula de polinucleótido de SEQ ID NO: 139 que codifica para el FGFR3 de SEQ ID NO: 25, en células de una línea celular establecida mediante un método con lípido catiónico. Se siembra en placa una densidad adecuada (aproximadamente 5×10^6 células) de células de una línea celular establecida en una placa de cultivo tisular de 100 mm que contiene 5 ml de medios de cultivo completos y se hacen crecer en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que las células alcanzan una densidad apropiada para la transfección. Se preparan 3 ml de disolución de transfección mediante la adición de 1,5 ml de medio con suero reducido OPTI-MEM que contiene 60 μ l de LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos a 1,5 ml de medio con suero reducido OPTI-MEM que contiene 24 μ g de un constructo de expresión que codifica para un FGFR2 o un FGFR3, o un constructo de expresión de control que codifica para una proteína fluorescente verde (GFP). Se incubó esta mezcla de transfección a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Se sustituyen los medios completos por los 3 ml de disolución de transfección y se incuban las células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% durante aproximadamente 8 horas. Se sustituyen los medios de transfección por 3 ml de medios de cultivo completos recién preparados y se incuban las células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% durante aproximadamente 24 horas. Se sustituyen los medios por 3 ml de medios de cultivo completos recién preparados que contienen G418 aproximadamente 1 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se incuban las células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% durante aproximadamente 1 semana, se sustituyen los medios antiguos por medios de cultivo completos recién preparados que contienen G418 0,5 mM. Una vez que se establecen colonias resistentes a antibióticos, se vuelven a sembrar en placa clones resistentes en nuevas placas de cultivo de 100 mm que contienen medios de cultivo completos recién

preparados, se complementan con G418 aproximadamente 0,5 mM hasta que estas células alcanzan una densidad de 6 a 20x10⁵ células/ml.

5 Para determinar si la sobreexpresión de receptores de NTBo/A mejoraba la susceptibilidad celular a la intoxicación por NTBo/A o mejoraba la capacidad de captación de NTBo/A, se generó una curva de dosis-respuesta usando células tratadas con diferente dosis de un complejo de NTBo/A. Para preparar un lisado de células tratadas con una NTBo/A, se sembró en placa una densidad adecuada de células de una línea celular transfectada establecida en los pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían 100 µl de un medio libre de suero apropiado (tabla 5). Se incubaron estas células en un incubador a 37°C bajo dióxido de carbono al 5% hasta que se diferenciaron las células, tal como se evaluó mediante criterios morfológicos convencionales y de rutina, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 3 días). Se aspiraron los medios de las células diferenciadas de cada pocillo y se sustituyeron por medios recién preparados que contenían cualquiera de 0 (muestra no tratada), 0,01 nM, 0,04 nM, 0,12 nM, 0,37 nM, 1,1 nM, 3,3 nM y 10 nM de un complejo de NTBo/A para células que comprendían una línea celular transfectada SiMa o PC12; y 0 (muestra no tratada), 0,14 nM, 0,40 nM, 1,2 nM, 3,7 nM, 11 nM, 33 nM y 100 nM de un complejo de NTBo/A para células que comprendían una línea celular transfectada Neuro-2a. Se trataron las células con medios que contenían NTBo/A durante 6 h seguido por incubación con medios recién preparados durante 15 h y se recogieron mediante la adición de 40 µl de tampón de carga 2 x de SDS-PAGE y calentamiento de la placa hasta 95°C durante 5 min.

20 Para detectar la presencia de producto de corte de SNAP-25, se analizó una alícuota de cada muestra recogida mediante inmunotransferencia de tipo Western tal como se describe en el ejemplo I, excepto porque se separan las muestras recogidas mediante SDS-PAGE usando geles Criterion de 26 pocillos al 12% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), y se usaron los siguientes anticuerpos primarios a una dilución 1:1.000 de suero de anticuerpo policlonal de conejo α-SNAP-25 (ejemplo IV) (AGN, anticuerpo policlonal), una dilución 1:500 de anticuerpo policlonal de conejo α-FGFR2 C-17 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) o una dilución 1:500 de anticuerpo policlonal de conejo α-FGFR3 C-15 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Se calculó la intensidad de la proteína de interés de cada muestra usando el aparato Image Quant (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y se estimó la CE₅₀ para cada una de las líneas celulares usando el software SigmaPlot.

30 Los resultados indican que las células transfectadas con FGFR2 o FGFR3 eran más sensibles a NTBo/A que las células transfectadas con GFP y también mostraron un mayor nivel de corte de SNAP-25 (tabla 14). Los valores de CE₅₀ para células que sobreexpresan FGFR2 o FGFR3 fueron menores que los valores de CE₅₀ presentados por células que sobreexpresan GFP, lo que indica que la introducción de FGFR2 o FGFR3 mejoró la sensibilidad celular a la intoxicación por NTBo/A o mejoró la capacidad de captación de NTBo/A.

35

Tabla 14. Efectos de introducir receptores de NTBo/A exógenos sobre la susceptibilidad celular a la intoxicación por NTBo/A o la captación de NTBo/A			
Células	Gen transfectado	CE ₅₀ (nM)	Señal máx.
SiMa	GFP	0,0812 ± 0,010	22.733.787
SiMa	FGFR2	0,0459 ± 0,003	26.136.578
SiMa	FGFR3	0,0377 ± 0,006	24.326.271
PC-12	GFP	3,3362 ± 1,881	26.956.063
PC-12	FGFR2	0,3429 ± 0,059	25.376.114
PC-12	FGFR3	0,2634 ± 0,026	24.102.459
Neuro-2a	GFP	61,80 ± 9,710	4.605.974
Neuro-2a	FGFR2	31,59 ± 8,800	23.279.765
Neuro-2a	FGFR3	11,55 ± 5,240	28.347.413

También puede realizarse la detección para determinar la presencia de producto de corte de SNAP-25 usando ELISA de tipo sándwich tal como se describe en los ejemplos VI-X.

40 **Lista de secuencias**

<100> Fernandez-Salas, Ester
Wang, Joanne
Garay, Patton E.
45 Wong, Lina S.
Hodges, D. Dianne
Aoki, Kei Roger

<120> Ensayos de actividad de serotipo A de toxina botulínica de base inmunológica

50 <130> 18383 (BOT)

ES 2 755 505 T3

<150> Documento US 61/036.723

<151> 14-03-2008

<160> 148

5

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 1296

10

<212> PRT

<213> *Clostridium botulinum*

<400> 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 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

```

ES 2 755 505 T3

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

ES 2 755 505 T3

	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	Leu	
	1010					1015					1020					
Asn	Asn	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	Asn	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	Gln	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				

ES 2 755 505 T3

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

<210> 2

<211> 1296

5 <212> PRT

<213> *Clostridium botulinum*

<400> 2

ES 2 755 505 T3

Met	Pro	Phe	Val	Asn	Lys	Gln	Phe	Asn	Tyr	Lys	Asp	Pro	Val	Asn	Gly
1				5					10					15	
Val	Asp	Ile	Ala	Tyr	Ile	Lys	Ile	Pro	Asn	Ala	Gly	Gln	Met	Gln	Pro
			20					25					30		
Val	Lys	Ala	Phe	Lys	Ile	His	Asn	Lys	Ile	Trp	Val	Ile	Pro	Glu	Arg
		35					40					45			
Asp	Thr	Phe	Thr	Asn	Pro	Glu	Glu	Gly	Asp	Leu	Asn	Pro	Pro	Pro	Glu
	50					55					60				
Ala	Lys	Gln	Val	Pro	Val	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ser	Thr
65					70					75					80
Asp	Asn	Glu	Lys	Asp	Asn	Tyr	Leu	Lys	Gly	Val	Thr	Lys	Leu	Phe	Glu
				85					90					95	
Arg	Ile	Tyr	Ser	Thr	Asp	Leu	Gly	Arg	Met	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Val
			100					105					110		
Arg	Gly	Ile	Pro	Phe	Trp	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Asp	Thr	Glu	Leu	Lys
		115				120						125			
Val	Ile	Asp	Thr	Asn	Cys	Ile	Asn	Val	Ile	Gln	Pro	Asp	Gly	Ser	Tyr
	130					135					140				
Arg	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Leu	Val	Ile	Ile	Gly	Pro	Ser	Ala	Asp	Ile
145					150					155					160
Ile	Gln	Phe	Glu	Cys	Lys	Ser	Phe	Gly	His	Asp	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	Glu	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	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Asn	Lys	Ala	Lys	Ser	Ile	Ile
	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	Asn	Phe	Phe	Lys	Val	Ile	Asn	Arg	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn
		355					360					365			
Phe	Asp	Lys	Ala	Val	Phe	Arg	Ile	Asn	Ile	Val	Pro	Asp	Glu	Asn	Tyr

ES 2 755 505 T3

Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Val Asn Thr Ser Ile Leu Ser
 865 870 875 880
 Ile Val Tyr Lys Lys Asp Asp Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Gly Ala
 885 890 895
 Lys Ile Asn Ile Gly Asp Arg Val Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Lys Asn
 900 905 910
 Gln Ile Lys Leu Ile Asn Leu Glu Ser Ser Thr 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 Lys Ile Pro Lys Tyr Phe Ser Lys Ile Asn Leu Asn Asn
 945 950 955 960
 Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Ile Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
 965 970 975
 Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Asn Lys Gln
 980 985 990
 Asn Ile Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Val 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
 Thr 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 Pro Arg Arg Tyr Ile Met 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 Ser Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr
 1090 1095 1100
 Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Phe Asp Pro Asn
 1105 1110 1115 1120
 Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Ile Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu
 1125 1130 1135
 Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Val Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser
 1140 1145 1150
 Thr Leu Tyr Glu Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly
 1155 1160 1165
 Asn Glu 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 Asp Asp Gln Gly Ile Arg
 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 Leu Tyr Asp Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser
 1250 1255 1260
 Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Val Gly Lys Ala Ser Arg Thr Phe Gly Cys
 1265 1270 1275 1280
 Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Ser Ser Leu
 1285 1290 1295

<210> 3
<211> 1292
<212> PRT
5 <213> *Clostridium botulinum*
<400> 3

ES 2 755 505 T3

Met Pro Phe Val Asn Lys Pro Phe Asn Tyr Arg Asp Pro Gly 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 Glu Gly Val 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 Ile Lys Leu Phe Asp
85 90 95
Arg Ile Tyr Ser Thr Gly Leu Gly Arg Met Leu Leu Ser Phe Ile Val
100 105 110
Lys 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 Glu Pro Gly Gly Ser Tyr
130 135 140
Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Thr Gly Pro Ser Ala Asp Ile
145 150 155 160
Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Asp Val Phe 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 Thr Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
210 215 220
Leu Ile His Ala Ala His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
225 230 235 240
Arg Val Leu Lys Val Lys 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 Asn Asp Thr Asn
260 265 270
Phe Ile Asp Ser Leu Trp Gln Lys Lys Phe Ser Arg Asp Ala Tyr Asp
275 280 285
Asn Leu Gln Asn Ile Ala Arg Ile Leu Asn Glu Ala Lys Thr Ile Val
290 295 300
Gly Thr Thr Thr Pro Leu Gln Tyr Met Lys Asn Ile Phe Ile Arg Lys
305 310 315 320
Tyr Phe Leu Ser Glu Asp Ala Ser Gly Lys Ile Ser Val Asn Lys Ala
325 330 335
Ala Phe Lys Glu Phe Tyr Arg Val Leu Thr Arg Gly Phe Thr Glu Leu
340 345 350
Glu Phe Val Asn Pro Phe Lys Val Ile Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
355 360 365
Phe Asp Lys Ala Val Phe Arg Ile Asn Ile Val Pro Asp Glu Asn Tyr
370 375 380
Thr Ile Asn Glu Gly Phe Asn Leu Glu Gly Ala Asn Ser Asn Gly Gln
385 390 395 400
Asn Thr Glu Ile Asn Ser Arg Asn Phe Thr Arg Leu Lys Asn Phe Thr
405 410 415
Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro
420 425 430
Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Tyr
435 440 445
Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu
450 455 460
Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asp Lys Val Glu Glu Ile Thr Ala Asp
465 470 475 480

ES 2 755 505 T3

Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Ser Asp Leu Ile Gln
 485 490 495
 Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asp Phe Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile Ser
 500 505 510
 Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu Pro Met Pro
 515 520 525
 Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr
 530 535 540
 Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His Gly Asp Ser
 545 550 555 560
 Arg Ile Ile Leu Thr Asn Ser Ala Glu Glu Ala Leu Leu Lys Pro Asn
 565 570 575
 Val Ala Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Lys Tyr Val Lys Lys Ile Asn Lys
 580 585 590
 Ala Val Glu Ala Val Ile Phe Leu Ser Trp Ala Glu Glu Leu Val Tyr
 595 600 605
 Asp Phe Thr Asp Glu Thr Asn Glu Val Thr Thr Met Asp Lys Ile Ala
 610 615 620
 Asp Ile Thr Ile Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly
 625 630 635 640
 Asn Met Val Ser Lys Gly Glu Phe Val Glu Ala Ile Leu Phe Thr Gly
 645 650 655
 Val Val Ala Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Tyr Ser Leu Pro Val Phe
 660 665 670
 Gly Thr Phe Ala Ile Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val
 675 680 685
 Gln Thr Ile Asn Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu
 690 695 700
 Val Tyr Lys Tyr Thr Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln
 705 710 715 720
 Ile Asp Leu Ile Arg Glu Lys Met Lys Lys Ala Leu Glu Asn Gln Ala
 725 730 735
 Glu Ala Thr Arg Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu
 740 745 750
 Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys
 755 760 765
 Leu Asn Arg Ser Ile Asn Arg Ala Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu
 770 775 780
 Asp Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Ala
 785 790 795 800
 Val Lys Arg Leu Lys Asp Phe Asp Ala Ser Val Arg Asp Val Leu Leu
 805 810 815
 Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Leu Gln Val Asp Arg
 820 825 830
 Leu Lys Asp Glu Val Asn Asn Thr Leu Ser Ala Asp Ile Pro Phe Gln
 835 840 845
 Leu Ser Lys Tyr Val Asn Asp Lys Lys Leu Leu Ser Thr Phe Thr Glu
 850 855 860
 Tyr Ile Lys Asn Ile Val Asn Thr Ser Ile Leu Ser Ile Val Tyr Lys
 865 870 875 880
 Lys Asp Asp Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Gly Ala Lys Ile Asn Ile
 885 890 895
 Gly Asp Arg Val Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Lys Asn Gln Ile Lys Leu
 900 905 910
 Ile Asn Leu Glu Ser Ser Thr Ile Glu Val Ile Leu Lys Asn Ala Ile
 915 920 925
 Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser Phe Trp Ile Lys
 930 935 940
 Ile Pro Lys Tyr Phe Ser Lys Ile Asn Leu Asn Asn Glu Tyr Thr Ile
 945 950 955 960
 Ile Asn Cys Ile Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn Tyr

ES 2 755 505 T3

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

<210> 4

<211> 1296

5 <212> PRT

<213> *Clostridium botulinum*

<400> 4

ES 2 755 505 T3

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

ES 2 755 505 T3

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Ile Ser Ile Val
 100 105 110
 Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Gly Lys Ile Asp Thr Glu Leu Lys
 115 120 125
 Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Ile Ile Gln Leu Asp Asp Ser Tyr
 130 135 140
 Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Ala Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asn Ile
 145 150 155 160
 Ile Glu Ser Gln Cys Ser Ser Phe Arg Asp Asp 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 Val Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
 195 200 205
 Gly Ala Gly Lys Phe Ala Gln Asp Pro Ala Val Ala Leu Ala His Glu
 210 215 220
 Leu Ile His Ala Glu His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Thr Asn
 225 230 235 240
 Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ala Gly Leu
 245 250 255
 Glu Val Ser Leu Glu Glu Leu Ile Thr Phe Gly Gly Asn Asp Ala Lys
 260 265 270
 Phe Ile Asp Ser Leu Gln Lys Lys Glu Phe Ser 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 Ala Thr Gly Lys Phe Leu Val Asp Arg Leu
 325 330 335
 Lys Phe Asp Glu Leu Tyr Lys Leu 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 Asp Val Asn Tyr
 370 375 380
 Thr Ile His Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
 385 390 395 400
 Phe Asn Gly Gln Asn Ile Glu Ile Asn Asn Lys Asn Phe Asp 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 Glu Gly Tyr Asn Lys
 435 440 445
 Ala Leu Asn Glu 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 Asp Lys Val 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 Tyr Tyr Leu Asn Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
 500 505 510
 Glu Asn Thr Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
 515 520 525
 Glu Pro Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
 530 535 540
 Leu Asn Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Lys
 545 550 555 560
 His Ser Asn Ser Arg Ile Ile Leu Thr Asn Ser Ala Lys Glu Ala Leu
 565 570 575
 Leu Lys Pro Asn Ile Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Lys Tyr Ile Lys

ES 2 755 505 T3

			580					585				590			
Ala	Ile	Asn	Lys	Ala	Val	Glu	Ala	Val	Thr	Phe	Val	Asn	Trp	Ile	Glu
		595					600					605			
Asn	Leu	Val	Tyr	Asp	Phe	Thr	Asp	Glu	Thr	Asn	Glu	Val	Ser	Thr	Met
	610					615					620				
Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Thr	Ile	Val	Ile	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala
625					630						635				640
Leu	Asn	Ile	Gly	Asn	Met	Ile	Tyr	Lys	Gly	Glu	Phe	Val	Glu	Ala	Ile
				645					650					655	
Ile	Phe	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Glu	Ile	Val	Pro	Glu	Ile	Ala
			660					665					670		
Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Tyr	Val	Ser	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	Ile
705					710					715					720
Val	Asn	Thr	Gln	Ile	Asn	Leu	Ile	Arg	Glu	Lys	Met	Lys	Lys	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	Ser	Ala	Met	Ile	Asn	Ile
	770					775					780				
Asn	Lys	Phe	Leu	Asp	Gln	Cys	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu	Met	Asn	Ser	Met
785					790					795					800
Ile	Pro	Tyr	Ala	Val	Lys	Arg	Leu	Lys	Asp	Phe	Asp	Ala	Ser	Val	Arg
			805						810						815
Asp	Val	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Asn	Arg	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly
			820					825							830
Gln	Val	Asn	Arg	Leu	Lys	Asp	Lys	Val	Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Ala	Asp
		835					840					845			
Ile	Pro	Phe	Gln	Leu	Ser	Lys	Tyr	Val	Asp	Asn	Lys	Lys	Leu	Leu	Ser
	850					855					860				
Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr	Ile	Lys	Asn	Ile	Thr	Asn	Ala	Ser	Ile	Leu	Ser
865					870					875					880
Ile	Val	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Leu	Ile	Asp	Leu	Ser	Arg	Tyr	Gly	Ala
			885						890						895
Glu	Ile	Tyr	Asn	Gly	Asp	Lys	Val	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ile	Asp	Lys	Asn
			900					905					910		
Gln	Ile	Arg	Leu	Ile	Asn	Leu	Glu	Ser	Ser	Thr	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	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	Phe	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	Ile
	1010					1015						1020			
Thr	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	Pro	His	Arg	Tyr	Ile	Val	Ile	Lys	Tyr	Phe
			1060					1065							1070

ES 2 755 505 T3

Asn	Leu	Phe	Asp	Lys	Glu	Leu	Ser	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	Ser	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	Asp	Asn	Val	Met	Thr	Thr	Asn	Ile	Tyr	Leu	Asn	Ser
			1140					1145					1150		
Ser	Leu	Tyr	Met	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	Gln	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	Arg	Glu	Arg	Pro	Leu
				1285					1290					1295	

<210> 5
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

ES 2 755 505 T3

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

- <210> 6
- 5 <211> 206
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 6

ES 2 755 505 T3

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

<210> 7

<211> 206

<212> PRT

5 <213> *Macaca mulatta*

<400> 7

Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
 20 25 30
 Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
 35 40 45
 Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
 50 55 60
 Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
 65 70 75 80
 Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
 85 90 95
 Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
 100 105 110
 Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
 115 120 125
 Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
 130 135 140

ES 2 755 505 T3

Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
 145 150 155 160
 Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
 165 170 175
 Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
 180 185 190
 Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
 195 200 205

<210> 8
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

5

<400> 8
 Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
 20 25 30
 Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
 35 40 45
 Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Val Glu Glu Gly Met
 50 55 60
 Asn His Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Lys Asp
 65 70 75 80
 Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Phe Ile Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
 85 90 95
 Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
 100 105 110
 Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
 115 120 125
 Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
 130 135 140
 Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
 145 150 155 160
 Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
 165 170 175
 Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
 180 185 190
 Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
 195 200 205

10

<210> 9
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

15

<400> 9

ES 2 755 505 T3

```

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

          85          90          95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
          100          105          110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
          115          120          125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
          130          135          140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
          145          150          155          160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
          165          170          175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
          180          185          190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
          195          200          205

```

- <210> 10
- 5 <211> 206
- <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 10

ES 2 755 505 T3

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

<210> 11
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> *Gallus gallus*

5

<400> 11
 Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
 20 25 30

ES 2 755 505 T3

```

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

```

<210> 12
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> *Carassius auratus*

5

<400> 12

ES 2 755 505 T3

```

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

```

<210> 13
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> *Carassius auratus*

5

<400> 13

ES 2 755 505 T3

```

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

```

<210> 14
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

5

<400> 14

ES 2 755 505 T3

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

<210> 16
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> *Torpedo marmorata*

5

<400> 16
 Met Glu Asn Ser Val Glu Asn Ser Met Asp Pro Arg Ser Glu Gln Glu
 1 5 10 15
 Glu Met Gln Arg Cys Ala Asp Gln Ile Thr Asp Glu Ser Leu Glu Ser
 20 25 30
 Thr Arg Arg Met Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile
 35 40 45
 Arg Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile
 50 55 60
 Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys
 65 70 75 80
 Asn Leu Ser Asp Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys
 85 90 95
 Asn Lys Leu Lys Asn Phe Glu Ala Gly Gly Ala Tyr Lys Lys Val Trp
 100 105 110
 Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Met
 115 120 125
 Asp Asp Arg Glu Gln Met Ala Met Ser Gly Gly Tyr Ile Arg Arg Ile

ES 2 755 505 T3

	130					135					140					
Thr	Asp	Asp	Ala	Arg	Glu	Asn	Glu	Met	Glu	Glu	Asn	Leu	Asp	Gln	Val	
145					150					155					160	
Gly	Ser	Ile	Ile	Gly	Asn	Leu	Arg	His	Met	Ala	Leu	Asp	Met	Ser	Asn	
				165					170					175		
Glu	Ile	Gly	Ser	Gln	Asn	Ala	Gln	Ile	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Lys	Gly	
			180					185					190			
Asp	Met	Asn	Lys	Ala	Arg	Ile	Asp	Glu	Ala	Asn	Lys	His	Ala	Thr	Lys	
		195					200					205				
Met	Leu															
	210															

<210> 17
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*

5

	<400> 17															
Met	Ala	Asp	Asp	Ala	Asp	Met	Arg	Asn	Glu	Leu	Glu	Glu	Met	Gln	Arg	
1				5					10					15		
Arg	Ala	Asp	Gln	Leu	Ala	Asp	Glu	Ser	Leu	Glu	Ser	Thr	Arg	Arg	Met	
			20					25					30			
Leu	Gln	Tyr	Val	Glu	Gly	Ser	Lys	Asp	Ala	Gly	Ile	Arg	Thr	Leu	Val	
		35					40					45				
Met	Leu	Asp	Glu	Gln	Gly	Glu	Gln	Leu	Asp	Arg	Val	Glu	Glu	Gly	Met	
	50					55					60					
Asn	His	Ile	Asn	Gln	Asp	Met	Lys	Glu	Ala	Glu	Lys	Asn	Leu	Lys	Asp	
65					70					75					80	
Leu	Gly	Lys	Cys	Cys	Gly	Leu	Phe	Ile	Cys	Pro	Cys	Asn	Lys	Leu	Lys	
			85						90					95		
Ser	Ser	Gly	Ala	Tyr	Asn	Lys	Ala	Trp	Gly	Asn	Asn	Gln	Asp	Gly	Val	
			100					105					110			
Val	Ala	Ser	Gln	Pro	Ala	Arg	Val	Val	Asp	Glu	Arg	Glu	Gln	Met	Ala	
		115					120					125				
Ile	Ser	Gly	Gly	Phe	Val	Arg	Arg	Val	Thr	Asn	Asp	Ala	Arg	Glu	Thr	
	130					135					140					
Glu	Met	Asp	Glu	Asn	Leu	Glu	Gln	Val	Gly	Gly	Ile	Ile	Gly	Asn	Leu	
145					150					155					160	
Arg	His	Met	Ala	Leu	Asp	Met	Gly	Asn	Glu	Ile	Asp	Thr	Gln	Asn	Arg	
				165					170					175		
Gln	Ile	Asp	Arg	Ile	Met	Glu	Lys	Ala	Asp	Ser	Asn	Lys	Ala	Arg	Ile	
		180						185					190			
Asp	Glu	Ala	Asn	Lys	His	Ala	Thr	Lys	Met	Leu	Gly	Ser	Gly			
		195					200						205			

<210> 18
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*

10

15

<400> 18

ES 2 755 505 T3

```

Met Ala Asp Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1          5          10          15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
 20          25          30
Leu Gln Tyr Val Glu Gly Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
 35          40          45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
 50          55          60

Glu Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65          70          75          80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
 85          90          95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
100          105          110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
115          120          125
Ile Ser Gly Gly Phe Val Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Thr
130          135          140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145          150          155          160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
165          170          175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Ala Arg Ile
180          185          190
Asp Glu Ala Asn Lys His Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195          200          205

```

- 5 <210> 19
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> *Strongylocentrotus purpuratus*
 <400> 19

ES 2 755 505 T3

```

Met Glu Asp Gln Asn Asp Met Asn Met Arg Ser Glu Leu Glu Glu Ile
 1      5      10      15
Gln Met Gln Ser Asn Met Gln Thr Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg
 20      25      30
Arg Met Leu Gln Met Ala Glu Glu Ser Gln Asp Met Gly Ile Lys Thr
 35      40      45
Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Ile Glu Glu
 50      55      60
Gly Met Asp Gln Ile Asn Thr Asp Met Arg Glu Ala Glu Lys Asn Leu
 65      70      75      80
Thr Gly Leu Glu Lys Cys Cys Gly Ile Cys Val Cys Pro Trp Lys Lys
 85      90      95
Leu Gly Asn Phe Glu Lys Gly Asp Asp Tyr Lys Lys Thr Trp Lys Gly
 100     105     110
Asn Asp Asp Gly Lys Val Asn Ser His Gln Pro Met Arg Met Glu Asp
 115     120     125
Asp Arg Asp Gly Cys Gly Gly Asn Ala Ser Met Ile Thr Arg Ile Thr
 130     135     140
Asn Asp Ala Arg Glu Asp Glu Met Asp Glu Asn Leu Thr Gln Val Ser
 145     150     155     160
Ser Ile Val Gly Asn Leu Arg His Met Ala Ile Asp Met Gln Ser Glu
 165     170     175
Ile Gly Ala Gln Asn Ser Gln Val Gly Arg Ile Thr Ser Lys Ala Glu
 180     185     190
Ser Asn Glu Gly Arg Ile Asn Ser Ala Asp Lys Arg Ala Lys Asn Ile
 195     200     205
Leu Arg Asn Lys
 210

```

<210> 20

<211> 212

5 <212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 20

ES 2 755 505 T3

Met Pro Ala Asp Pro Ser Glu Glu Val Ala Pro Gln Val Pro Lys Thr
 1 5 10 15
 Glu Leu Glu Glu Leu Gln Ile Asn Ala Gln Gly Val Ala Asp Glu Ser
 20 25 30
 Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ala Leu Cys Glu Glu Ser Lys Glu
 35 40 45
 Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val Ala Leu Asp Asp Gln Gly Glu Gln Leu
 50 55 60
 Asp Arg Ile Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Ala Asp Met Arg Glu
 65 70 75 80
 Ala Glu Lys Asn Leu Ser Gly Met Glu Lys Cys Cys Gly Ile Cys Val
 85 90 95
 Leu Pro Cys Asn Lys Ser Gln Ser Phe Lys Glu Asp Asp Gly Thr Trp
 100 105 110
 Lys Gly Asn Asp Asp Gly Lys Val Val Asn Asn Gln Pro Gln Arg Val
 115 120 125
 Met Asp Asp Arg Asn Gly Met Met Ala Gln Ala Gly Tyr Ile Gly Arg
 130 135 140
 Ile Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asp Glu Met Glu Glu Asn Met Gly Gln
 145 150 155 160
 Val Asn Thr Met Ile Gly Asn Leu Arg Asn Met Ala Leu Asp Met Gly
 165 170 175
 Ser Glu Leu Glu Asn Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Asn Arg Lys
 180 185 190
 Gly Glu Ser Asn Glu Ala Arg Ile Ala Val Ala Asn Gln Arg Ala His
 195 200 205
 Gln Leu Leu Lys
 210

<210> 21
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> *Hirudo medicinalis*

5

<400> 21

ES 2 755 505 T3

```

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

  Thr Ser Asn Gln Leu Arg Ile Ser Asp Ala Asn Lys Arg Ala Ser Lys
      195        200        205
Leu Leu Lys Glu
      210

```

- 5 <210> 22
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> *Loligo pealei*
 <400> 22

ES 2 755 505 T3

Met Ser Ala Asn Gly Glu Val Glu Val Pro Lys Thr Glu Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Ile Gln Gln Gln Cys Asn Gln Val Thr Asp Asp Ser Leu Glu Ser Thr
 20 25 30
 Arg Arg Met Leu Asn Met Cys Glu Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ile Arg
 35 40 45
 Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Ile Glu
 50 55 60
 Glu Gly Leu Asp Gln Ile Asn Gln Asp Met Lys Asp Ala Glu Lys Asn
 65 70 75 80
 Leu Glu Gly Met Glu Lys Cys Cys Gly Leu Cys Val Leu Pro Trp Lys
 85 90 95
 Arg Gly Lys Ser Phe Glu Lys Ser Gly Asp Tyr Ala Asn Thr Trp Lys
 100 105 110
 Lys Asp Asp Asp Gly Pro Thr Asn Thr Asn Gly Pro Arg Val Thr Val
 115 120 125
 Gly Asp Gln Asn Gly Met Gly Pro Ser Ser Gly Tyr Val Thr Arg Ile
 130 135 140
 Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asp Asp Met Glu Asn Asn Met Lys Glu Val
 145 150 155 160
 Ser Ser Met Ile Gly Asn Leu Arg Asn Met Ala Ile Asp Met Gly Asn
 165 170 175
 Glu Ile Gly Ser Gln Asn Arg Gln Val Asp Arg Ile Gln Gln Lys Ala
 180 185 190
 Glu Ser Asn Glu Ser Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys Lys Ala Thr Lys
 195 200 205
 Leu Leu Lys Asn
 210

<210> 23
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> *Lymnaea stagnalis*

5

<400> 23
 Met Thr Thr Asn Gly Glu Ile Leu Pro Val Gly Glu Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Gly Glu Asp Ala Leu Leu Arg Lys Gln Ile Asp Cys Asn Thr
 20 25 30
 Asn Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ser Leu Cys Glu Glu
 35 40 45
 Ser Lys Glu Ala Gly Ile Lys Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly
 50 55 60
 Glu Gln Leu Asp Arg Ile Glu Glu Gly Met Gly Gln Ile Asn Gln Asp
 65 70 75 80
 Met Arg Asp Ala Glu Lys Asn Leu Glu Gly Leu Glu Lys Cys Cys Gly
 85 90 95
 Leu Cys Val Leu Pro Trp Lys Arg Ser Lys Asn Phe Glu Lys Gly Ser

ES 2 755 505 T3

			100					105				110			
Asp	Tyr	Asn	Lys	Thr	Trp	Lys	Ala	Ser	Glu	Asp	Gly	Lys	Ile	Asn	Thr
		115					120					125			
Asn	Gly	Pro	Arg	Leu	Val	Val	Asp	Gln	Gly	Asn	Gly	Ser	Gly	Pro	Thr
		130					135					140			
Gly	Gly	Tyr	Ile	Thr	Arg	Ile	Thr	Asn	Asp	Ala	Arg	Glu	Asp	Glu	Met
145					150					155					160
Glu	Gln	Asn	Ile	Gly	Glu	Val	Ala	Gly	Met	Val	Ser	Asn	Leu	Arg	Asn
				165					170						175
Met	Ala	Val	Asp	Met	Gly	Asn	Glu	Ile	Glu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Leu
			180						185				190		
Asp	Arg	Ile	Asn	Gln	Lys	Gly	Gly	Ser	Leu	Asn	Val	Arg	Val	Asp	Glu
		195					200						205		
Ala	Asn	Lys	Arg	Ala	Asn	Arg	Ile	Leu	Arg	Lys	Gln				
	210					215					220				

<210> 24
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> *Caenorhabditis elegans*

5

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

<210> 25
 <211> 808
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

15

<400> 25

ES 2 755 505 T3

Met	Gly	Ala	Pro	Ala	Cys	Ala	Leu	Ala	Leu	Cys	Val	Ala	Val	Ala	Ile
1				5					10					15	
Val	Ala	Gly	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Leu	Gly	Thr	Glu	Gln	Arg	Val	Val
			20					25					30		

ES 2 755 505 T3

Gly Arg Ala Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln
 35 40 45
 Leu Val Phe Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro
 50 55 60
 Gly Gly Gly Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly
 65 70 75 80
 Leu Val Pro Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val
 85 90 95
 Leu Asn Ala Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg
 100 105 110
 Leu Thr Gln Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr
 130 135 140
 Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp
 145 150 155 160
 Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys
 165 170 175
 Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly
 180 185 190
 Arg Glu Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His
 195 200 205
 Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly
 210 215 220
 Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr
 225 230 235 240
 Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
 245 250 255
 Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu
 260 265 270
 Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu
 275 280 285
 Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro
 290 295 300
 Tyr Val Thr Val Leu Lys Ser Trp Ile Ser Glu Ser Val Glu Ala Asp
 305 310 315 320
 Val Arg Leu Arg Leu Ala Asn Val Ser Glu Arg Asp Gly Gly Glu Tyr
 325 330 335
 Leu Cys Arg Ala Thr Asn Phe Ile Gly Val Ala Glu Lys Ala Phe Trp
 340 345 350
 Leu Ser Val His Gly Pro Arg Ala Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala
 355 360 365
 Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Ile Leu Ser Tyr Gly Val Gly
 370 375 380
 Phe Phe Leu Phe Ile Leu Val Val Ala Ala Val Thr Leu Cys Arg Leu
 385 390 395 400
 Arg Ser Pro Pro Lys Lys Gly Leu Gly Ser Pro Thr Val His Lys Ile
 405 410 415
 Ser Arg Phe Pro Leu Lys Arg Gln Val Ser Leu Glu Ser Asn Ala Ser
 420 425 430
 Met Ser Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Ala Arg Leu Ser Ser Gly
 435 440 445
 Glu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp
 450 455 460
 Pro Lys Trp Glu Leu Ser Arg Ala Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu
 465 470 475 480
 Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile
 485 490 495
 Asp Lys Asp Arg Ala Ala Lys Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu
 500 505 510
 Lys Asp Asp Ala Thr Asp Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met

ES 2 755 505 T3

	515					520					525					
Glu	Met	Met	Lys	Met	Ile	Gly	Lys	His	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Leu	Leu	
	530					535					540					
Gly	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Gly	Pro	Leu	Tyr	Val	Leu	Val	Glu	Tyr	Ala	
545					550					555					560	
Ala	Lys	Gly	Asn	Leu	Arg	Glu	Phe	Leu	Arg	Ala	Arg	Arg	Pro	Pro	Gly	
				565					570					575		
Leu	Asp	Tyr	Ser	Phe	Asp	Thr	Cys	Lys	Pro	Pro	Glu	Glu	Gln	Leu	Thr	
			580					585					590			
Phe	Lys	Asp	Leu	Val	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Val	Ala	Arg	Gly	Met	Glu	
		595					600						605			
Tyr	Leu	Ala	Ser	Gln	Lys	Cys	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	
	610					615					620					
Val	Leu	Val	Thr	Glu	Asp	Asn	Val	Met	Lys	Ile	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	
625					630					635					640	
Ala	Arg	Asp	Val	His	Asn	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr	Asn	Gly	
				645					650					655		
Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp	Arg	Val	
			660					665						670		
Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Glu	
		675					680					685				
Ile	Phe	Thr	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro	Tyr	Pro	Gly	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	
	690					695					700					
Leu	Phe	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	His	Arg	Met	Asp	Lys	Pro	Ala	Asn	
705					710					715					720	
Cys	Thr	His	Asp	Leu	Tyr	Met	Ile	Met	Arg	Glu	Cys	Trp	His	Ala	Ala	
				725					730					735		
Pro	Ser	Gln	Arg	Pro	Thr	Phe	Lys	Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	
			740					745						750		
Val	Leu	Thr	Val	Thr	Ser	Thr	Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Ala	Pro	
		755					760					765				
Phe	Glu	Gln	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gly	Gln	Asp	Thr	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	
	770					775					780					
Ser	Gly	Asp	Asp	Ser	Val	Phe	Ala	His	Asp	Leu	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	
785					790					795					800	
Pro	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Arg	Thr									
				805												

<210> 26
 <211> 806
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 26

ES 2 755 505 T3

Met	Gly	Ala	Pro	Ala	Cys	Ala	Leu	Ala	Leu	Cys	Val	Ala	Val	Ala	Ile
1				5					10					15	
Val	Ala	Gly	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Leu	Gly	Thr	Glu	Gln	Arg	Val	Val
			20					25					30		
Gly	Arg	Ala	Ala	Glu	Val	Pro	Gly	Pro	Glu	Pro	Gly	Gln	Gln	Glu	Gln
		35					40					45			
Leu	Val	Phe	Gly	Ser	Gly	Asp	Ala	Val	Glu	Leu	Ser	Cys	Pro	Pro	Pro
	50					55					60				
Gly	Gly	Gly	Pro	Met	Gly	Pro	Thr	Val	Trp	Val	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly
65					70					75					80
Leu	Val	Pro	Ser	Glu	Arg	Val	Leu	Val	Gly	Pro	Gln	Arg	Leu	Gln	Val
				85					90					95	
Leu	Asn	Ala	Ser	His	Glu	Asp	Ser	Gly	Ala	Tyr	Ser	Cys	Arg	Gln	Arg
			100					105					110		
Leu	Thr	Gln	Arg	Val	Leu	Cys	His	Phe	Ser	Val	Arg	Val	Thr	Asp	Ala
		115					120					125			

ES 2 755 505 T3

Pro Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr
 130 135 140
 Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp
 145 150 155 160
 Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys
 165 170 175
 Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly
 180 185 190
 Arg Glu Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His
 195 200 205
 Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly
 210 215 220
 Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr
 225 230 235 240
 Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
 245 250 255
 Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu
 260 265 270
 Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu
 275 280 285
 Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro
 290 295 300
 Tyr Val Thr Val Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu
 305 310 315 320
 Leu Glu Val Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu
 325 330 335
 Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala
 340 345 350
 Trp Leu Val Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu
 355 360 365
 Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Ile Leu Ser Tyr Gly Val Gly Phe Phe
 370 375 380
 Leu Phe Ile Leu Val Val Ala Ala Val Thr Leu Cys Arg Leu Arg Ser
 385 390 395 400
 Pro Pro Lys Lys Gly Leu Gly Ser Pro Thr Val His Lys Ile Ser Arg
 405 410 415
 Phe Pro Leu Lys Arg Gln Val Ser Leu Glu Ser Asn Ala Ser Met Ser
 420 425 430
 Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Ala Arg Leu Ser Ser Gly Glu Gly
 435 440 445
 Pro Thr Leu Ala Asn Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp Pro Lys
 450 455 460
 Trp Glu Leu Ser Arg Ala Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu
 465 470 475 480
 Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile Asp Lys
 485 490 495
 Asp Arg Ala Ala Lys Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp
 500 505 510
 Asp Ala Thr Asp Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met
 515 520 525
 Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala
 530 535 540
 Cys Thr Gln Gly Gly Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys
 545 550 555 560
 Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Leu Asp
 565 570 575
 Tyr Ser Phe Asp Thr Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe Lys
 580 585 590
 Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu
 595 600 605
 Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu

ES 2 755 505 T3

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

<210> 27
 <211> 694
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 27

ES 2 755 505 T3

Met	Gly	Ala	Pro	Ala	Cys	Ala	Leu	Ala	Leu	Cys	Val	Ala	Val	Ala	Ile
1				5					10					15	
Val	Ala	Gly	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Leu	Gly	Thr	Glu	Gln	Arg	Val	Val
			20					25					30		
Gly	Arg	Ala	Ala	Glu	Val	Pro	Gly	Pro	Glu	Pro	Gly	Gln	Gln	Glu	Gln
		35					40					45			
Leu	Val	Phe	Gly	Ser	Gly	Asp	Ala	Val	Glu	Leu	Ser	Cys	Pro	Pro	Pro
	50					55					60				
Gly	Gly	Gly	Pro	Met	Gly	Pro	Thr	Val	Trp	Val	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly
65					70					75					80
Leu	Val	Pro	Ser	Glu	Arg	Val	Leu	Val	Gly	Pro	Gln	Arg	Leu	Gln	Val
				85					90					95	
Leu	Asn	Ala	Ser	His	Glu	Asp	Ser	Gly	Ala	Tyr	Ser	Cys	Arg	Gln	Arg
			100					105					110		
Leu	Thr	Gln	Arg	Val	Leu	Cys	His	Phe	Ser	Val	Arg	Val	Thr	Asp	Ala
		115					120					125			
Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Asp	Thr
	130					135					140				
Gly	Val	Asp	Thr	Gly	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Arg	Pro	Glu	Arg	Met	Asp
145					150					155					160
Lys	Lys	Leu	Leu	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Arg	Phe	Arg	Cys
				165					170					175	
Pro	Ala	Ala	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Ser	Ile	Ser	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly
			180					185					190		
Arg	Glu	Phe	Arg	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Arg	His
		195					200					205			
Gln	Gln	Trp	Ser	Leu	Val	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly
	210					215					220				

ES 2 755 505 T3

Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr
 225 230 235 240
 Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
 245 250 255
 Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu
 260 265 270
 Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu
 275 280 285
 Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro
 290 295 300
 Tyr Val Thr Val Leu Lys Val Ser Leu Glu Ser Asn Ala Ser Met Ser
 305 310 315 320
 Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Ala Arg Leu Ser Ser Gly Glu Gly
 325 330 335
 Pro Thr Leu Ala Asn Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp Pro Lys
 340 345 350
 Trp Glu Leu Ser Arg Ala Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu
 355 360 365
 Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile Asp Lys
 370 375 380
 Asp Arg Ala Ala Lys Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp
 385 390 395 400
 Asp Ala Thr Asp Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met
 405 410 415
 Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala
 420 425 430
 Cys Thr Gln Gly Gly Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys
 435 440 445
 Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Leu Asp
 450 455 460
 Tyr Ser Phe Asp Thr Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe Lys
 465 470 475 480
 Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu
 485 490 495
 Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu
 500 505 510
 Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg
 515 520 525
 Asp Val His Asn Leu Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu
 530 535 540
 Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr
 545 550 555 560
 His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe
 565 570 575
 Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe
 580 585 590
 Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr
 595 600 605
 His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser
 610 615 620
 Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Val Leu
 625 630 635 640
 Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Ala Pro Phe Glu
 645 650 655
 Gln Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser Ser Ser Ser Ser Gly
 660 665 670
 Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro Pro Ala Pro Pro Ser
 675 680 685
 Ser Gly Gly Ser Arg Thr
 690

<210> 28
<211> 604
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

ES 2 755 505 T3

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

ES 2 755 505 T3

Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Phe	Leu	His	Asn	Lys	Glu	Gly	Cys	Pro	Leu	Asp
		435					440					445			
Val	Thr	Gly	Thr	Gly	Glu	Gly	Ala	Tyr	Met	Val	Tyr	Phe	Val	Ser	Phe
	450					455					460				
Leu	Gly	Thr	Leu	Ala	Val	Leu	Pro	Gly	Asn	Ile	Val	Ser	Ala	Leu	Leu
465					470					475					480
Met	Asp	Lys	Ile	Gly	Arg	Leu	Arg	Met	Leu	Ala	Gly	Ser	Ser	Val	Met
				485				490						495	
Ser	Cys	Val	Ser	Cys	Phe	Phe	Leu	Ser	Phe	Gly	Asn	Ser	Glu	Ser	Ala
			500					505					510		
Met	Ile	Ala	Leu	Leu	Cys	Leu	Phe	Gly	Gly	Val	Ser	Ile	Ala	Ser	Trp
		515					520					525			
Asn	Ala	Leu	Asp	Val	Leu	Thr	Val	Glu	Leu	Tyr	Pro	Ser	Asp	Lys	Arg
		530				535					540				
Thr	Thr	Ala	Phe	Gly	Phe	Leu	Asn	Ala	Leu	Cys	Lys	Leu	Ala	Ala	Val
545					550					555					560
Leu	Gly	Ile	Ser	Ile	Phe	Thr	Ser	Phe	Val	Gly	Ile	Thr	Lys	Ala	Ala
				565					570					575	
Pro	Ile	Leu	Phe	Ala	Ser	Ala	Ala	Leu	Ala	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Ala
			580					585					590		
Leu	Lys	Leu	Pro	Glu	Thr	Arg	Gly	Gln	Val	Leu	Gln				
		595					600								

<210> 29
 <211> 683
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 29

ES 2 755 505 T3

Met	Asp	Asp	Tyr	Lys	Tyr	Gln	Asp	Asn	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Ala	Pro	Ser
1				5					10					15	
Asp	Gly	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Asn	Glu	Ser	Asn	Pro	Glu	Glu	Asp	Ala	Gln
			20					25					30		
Ser	Asp	Val	Thr	Glu	Gly	His	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Ile	Tyr	Glu	Gly
		35					40					45			
Glu	Tyr	Gln	Gly	Ile	Pro	His	Pro	Asp	Asp	Val	Lys	Ala	Lys	Gln	Ala
	50					55					60				
Lys	Met	Ala	Pro	Ser	Arg	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Gly	Gln	Thr	Asp	Leu
65					70					75					80
Met	Ala	Glu	Arg	Leu	Glu	Asp	Glu	Glu	Gln	Leu	Ala	His	Gln	Tyr	Glu
				85					90					95	
Thr	Ile	Met	Asp	Glu	Cys	Gly	His	Gly	Arg	Phe	Gln	Trp	Ile	Leu	Phe
			100					105					110		
Phe	Val	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Met	Ala	Asp	Gly	Val	Glu	Val	Phe	Val
		115					120					125			
Val	Ser	Phe	Ala	Leu	Pro	Ser	Ala	Glu	Lys	Asp	Met	Cys	Leu	Ser	Ser
	130					135					140				
Ser	Lys	Lys	Gly	Met	Leu	Gly	Met	Ile	Val	Tyr	Leu	Gly	Met	Met	Ala
145					150					155					160
Gly	Ala	Phe	Ile	Leu	Gly	Gly	Leu	Ala	Asp	Lys	Leu	Gly	Arg	Lys	Arg
				165					170					175	
Val	Leu	Ser	Met	Ser	Leu	Ala	Val	Asn	Ala	Ser	Phe	Ala	Ser	Leu	Ser
			180					185					190		
Ser	Phe	Val	Gln	Gly	Tyr	Gly	Ala	Phe	Leu	Phe	Cys	Arg	Leu	Ile	Ser
		195					200					205			
Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Leu	Pro	Ile	Val	Phe	Ala	Tyr	Phe	Ser
	210					215					220				
Glu	Phe	Leu	Ser	Arg	Glu	Lys	Arg	Gly	Glu	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Gly
225					230					235					240
Ile	Phe	Trp	Met	Thr	Gly	Gly	Leu	Tyr	Ala	Ser	Ala	Met	Ala	Trp	Ser

				245					250					255			
Ile	Ile	Pro	His	Tyr	Gly	Trp	Gly	Phe	Ser	Met	Gly	Thr	Asn	Tyr	His		
			260					265					270				
Phe	His	Ser	Trp	Arg	Val	Phe	Val	Ile	Val	Cys	Ala	Leu	Pro	Cys	Thr		
		275					280					285					
Val	Ser	Met	Val	Ala	Leu	Lys	Phe	Met	Pro	Glu	Ser	Pro	Arg	Phe	Leu		
	290					295					300						
Leu	Glu	Met	Gly	Lys	His	Asp	Glu	Ala	Trp	Met	Ile	Leu	Lys	Gln	Val		
305				310						315					320		
His	Asp	Thr	Asn	Met	Arg	Ala	Lys	Gly	Thr	Pro	Glu	Lys	Val	Phe	Thr		
			325						330					335			
Val	Ser	Asn	Ile	Lys	Thr	Pro	Lys	Gln	Met	Asp	Glu	Phe	Ile	Glu	Ile		
		340						345					350				
Gln	Ser	Ser	Thr	Gly	Thr	Trp	Tyr	Gln	Arg	Trp	Leu	Val	Arg	Phe	Lys		
		355					360					365					
Thr	Ile	Phe	Lys	Gln	Val	Trp	Asp	Asn	Ala	Leu	Tyr	Cys	Val	Met	Gly		
	370					375					380						
Pro	Tyr	Arg	Met	Asn	Thr	Leu	Ile	Leu	Ala	Val	Val	Trp	Phe	Ala	Met		
385				390						395					400		
Ala	Phe	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Thr	Val	Trp	Phe	Pro	Asp	Met	Ile	Arg		
			405					410						415			
Tyr	Phe	Gln	Asp	Glu	Glu	Tyr	Lys	Ser	Lys	Met	Lys	Val	Phe	Phe	Gly		
			420					425					430				
Glu	His	Val	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ile	Asn	Phe	Thr	Met	Glu	Asn	Gln	Ile		
		435					440					445					
His	Gln	His	Gly	Lys	Leu	Val	Asn	Asp	Lys	Phe	Thr	Arg	Met	Tyr	Phe		
	450					455					460						
Lys	His	Val	Leu	Phe	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Asp	Glu	Cys	Tyr	Phe	Glu		
465				470						475					480		
Asp	Val	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Tyr	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Ile	Glu	Ser		
			485					490						495			
Thr	Ile	Phe	Tyr	Asn	Thr	Asp	Leu	Tyr	Glu	His	Lys	Phe	Ile	Asn	Cys		
			500					505					510				
Arg	Phe	Ile	Asn	Ser	Thr	Phe	Leu	Glu	Gln	Lys	Glu	Gly	Cys	His	Met		
		515					520					525					
Asp	Leu	Glu	Gln	Asp	Asn	Asp	Phe	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Phe	Leu		
	530					535					540						
Gly	Ser	Leu	Ser	Val	Leu	Pro	Gly	Asn	Ile	Ile	Ser	Ala	Leu	Leu	Met		
545				550						555					560		
Asp	Arg	Ile	Gly	Arg	Leu	Lys	Met	Ile	Gly	Gly	Ser	Met	Leu	Ile	Ser		
			565						570					575			
Ala	Val	Cys	Cys	Phe	Phe	Leu	Phe	Phe	Gly	Asn	Ser	Glu	Ser	Ala	Met		
			580					585					590				
Ile	Gly	Trp	Gln	Cys	Leu	Phe	Cys	Gly	Thr	Ser	Ile	Ala	Ala	Trp	Asn		
		595					600					605					
Ala	Leu	Asp	Val	Ile	Thr	Val	Glu	Leu	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gln	Arg	Ala		
	610					615					620						
Thr	Ala	Phe	Gly	Ile	Leu	Asn	Gly	Leu	Cys	Lys	Phe	Gly	Ala	Ile	Leu		
625				630						635					640		
Gly	Asn	Thr	Ile	Phe	Ala	Ser	Phe	Val	Gly	Ile	Thr	Lys	Val	Val	Pro		
			645						650					655			
Ile	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Ser	Leu	Val	Gly	Gly	Gly	Leu	Ile	Ala	Leu		
			660					665					670				
Arg	Leu	Pro	Glu	Thr	Arg	Glu	Gln	Val	Leu	Ile							
		675					680										

<210> 30
<211> 727
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*
<400> 30

ES 2 755 505 T3

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

ES 2 755 505 T3

465					470					475					480
Phe	Thr	Ile	Asn	Phe	Thr	Met	Glu	Asn	Gln	Ile	His	Thr	Gly	Met	Glu
				485.					490					495	
Tyr	Asp	Asn	Gly	Arg	Phe	Ile	Gly	Val	Lys	Phe	Lys	Ser	Val	Thr	Phe
			500					505					510		
Lys	Asp	Ser	Val	Phe	Lys	Ser	Cys	Thr	Phe	Glu	Asp	Val	Thr	Ser	Val
		515					520					525			
Asn	Thr	Tyr	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Phe	Ile	Asp	Thr	Val	Phe	Asp	Asn
	530					535					540				
Thr	Asp	Phe	Glu	Pro	Tyr	Lys	Phe	Ile	Asp	Ser	Glu	Phe	Lys	Asn	Cys
545					550					555				560	
Ser	Phe	Phe	His	Asn	Lys	Thr	Gly	Cys	Gln	Ile	Thr	Phe	Asp	Asp	Asp
				565					570					575	
Tyr	Ser	Ala	Tyr	Trp	Ile	Tyr	Phe	Val	Asn	Phe	Leu	Gly	Thr	Leu	Ala
			580					585					590		
Val	Leu	Pro	Gly	Asn	Ile	Val	Ser	Ala	Leu	Leu	Met	Asp	Arg	Ile	Gly
		595					600					605			
Arg	Leu	Thr	Met	Leu	Gly	Gly	Ser	Met	Val	Leu	Ser	Gly	Ile	Ser	Cys
	610				615						620				
Phe	Phe	Leu	Trp	Phe	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Met	Met	Ile	Gly	Met	Leu
625				630						635				640	
Cys	Leu	Tyr	Asn	Gly	Leu	Thr	Ile	Ser	Ala	Trp	Asn	Ser	Leu	Asp	Val
				645					650					655	
Val	Thr	Val	Glu	Leu	Tyr	Pro	Thr	Asp	Arg	Arg	Ala	Thr	Gly	Phe	Gly
		660						665					670		
Phe	Leu	Asn	Ala	Leu	Cys	Lys	Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Asn	Leu	Ile
		675					680					685			
Phe	Gly	Ser	Leu	Val	Ser	Ile	Thr	Lys	Ser	Ile	Pro	Ile	Leu	Leu	Ala
	690				695					700					
Ser	Thr	Val	Leu	Val	Cys	Gly	Gly	Leu	Val	Gly	Leu	Cys	Leu	Pro	Asp
705				710						715				720	
Thr	Arg	Thr	Gln	Val	Leu	Met									
				725											

<210> 31
 <211> 742
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 31

ES 2 755 505 T3

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

ES 2 755 505 T3

His Gly Arg Phe Gln Trp Thr Leu Tyr Phe Val Leu Gly Leu Ala Leu
 165 170 175
 Met Ala Asp Gly Val Glu Val Phe Val Val Gly Phe Val Leu Pro Ser
 180 185 190
 Ala Glu Lys Asp Met Cys Leu Ser Asp Ser Asn Lys Gly Met Leu Gly
 195 200 205
 Leu Ile Val Tyr Leu Gly Met Met Val Gly Ala Phe Leu Trp Gly Gly
 210 215 220
 Leu Ala Asp Arg Leu Gly Arg Arg Gln Cys Leu Leu Ile Ser Leu Ser
 225 230 235 240
 Val Asn Ser Val Phe Ala Phe Phe Ser Ser Phe Val Gln Gly Tyr Gly
 245 250 255
 Thr Phe Leu Phe Cys Arg Leu Leu Ser Gly Val Gly Ile Gly Gly Ser
 260 265 270
 Ile Pro Ile Val Phe Ser Tyr Phe Ser Glu Phe Leu Ala Gln Glu Lys
 275 280 285
 Arg Gly Glu His Leu Ser Trp Leu Cys Met Phe Trp Met Ile Gly Gly
 290 295 300
 Val Tyr Ala Ala Ala Met Ala Trp Ala Ile Ile Pro His Tyr Gly Trp
 305 310 315 320
 Ser Phe Gln Met Gly Ser Ala Tyr Gln Phe His Ser Trp Arg Val Phe
 325 330 335
 Val Leu Val Cys Ala Phe Pro Ser Val Phe Ala Ile Gly Ala Leu Thr
 340 345 350
 Thr Gln Pro Glu Ser Pro Arg Phe Phe Leu Glu Asn Gly Lys His Asp
 355 360 365
 Glu Ala Trp Met Val Leu Lys Gln Val His Asp Thr Asn Met Arg Ala
 370 375 380
 Lys Gly His Pro Glu Arg Val Phe Ser Val Thr His Ile Lys Thr Ile
 385 390 395 400
 His Gln Glu Asp Glu Leu Ile Glu Ile Gln Ser Asp Thr Gly Thr Trp
 405 410 415
 Tyr Gln Arg Trp Gly Val Arg Ala Leu Ser Leu Gly Gly Gln Val Trp
 420 425 430
 Gly Asn Phe Leu Ser Cys Phe Gly Pro Glu Tyr Arg Arg Ile Thr Leu
 435 440 445
 Met Met Met Gly Val Trp Phe Thr Met Ser Phe Ser Tyr Tyr Gly Leu
 450 455 460
 Thr Val Trp Phe Pro Asp Met Ile Arg His Leu Gln Ala Val Asp Tyr
 465 470 475 480
 Ala Ser Arg Thr Lys Val Phe Pro Gly Glu Arg Val Gly His Val Thr
 485 490 495
 Phe Asn Phe Thr Leu Glu Asn Gln Ile His Arg Gly Gly Gln Tyr Phe
 500 505 510
 Asn Asp Lys Phe Ile Gly Leu Arg Leu Lys Ser Val Ser Phe Glu Asp
 515 520 525
 Ser Leu Phe Glu Glu Cys Tyr Phe Glu Asp Val Thr Ser Ser Asn Thr
 530 535 540
 Phe Phe Arg Asn Cys Thr Phe Ile Asn Thr Val Phe Tyr Asn Thr Asp
 545 550 555 560
 Leu Phe Glu Tyr Lys Phe Val Asn Ser Arg Leu Ile Asn Ser Thr Phe
 565 570 575
 Leu His Asn Lys Glu Gly Cys Pro Leu Asp Val Thr Gly Thr Gly Glu
 580 585 590
 Gly Ala Tyr Met Val Tyr Phe Val Ser Phe Leu Gly Thr Leu Ala Val
 595 600 605
 Leu Pro Gly Asn Ile Val Ser Ala Leu Leu Met Asp Lys Ile Gly Arg
 610 615 620
 Leu Arg Met Leu Ala Gly Ser Ser Val Met Ser Cys Val Ser Cys Phe
 625 630 635 640
 Phe Leu Ser Phe Gly Asn Ser Glu Ser Ala Met Ile Ala Leu Leu Cys

ES 2 755 505 T3

```

                645                650                655
Leu Phe Gly Gly Val Ser Ile Ala Ser Trp Asn Ala Leu Asp Val Leu
                660                665                670
Thr Val Glu Leu Tyr Pro Ser Asp Lys Arg Thr Thr Ala Phe Gly Phe
                675                680                685
Leu Asn Ala Leu Cys Lys Leu Ala Ala Val Leu Gly Ile Ser Ile Phe
                690                695                700
Thr Ser Phe Val Gly Ile Thr Lys Ala Ala Pro Ile Leu Phe Ala Ser
705                710                715                720
Ala Ala Leu Ala Leu Gly Ser Ser Leu Ala Leu Lys Leu Pro Glu Thr
                725                730                735
Arg Gly Gln Val Leu Gln
                740

```

- 5 <210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- 10 <223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A
 <400> 32
 Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5
- 15 <210> 33
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A
- 25 <400> 33
 Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5
- 30 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A
- 35 <400> 34
 Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5
- 40 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>

ES 2 755 505 T3

<223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A

<400> 35

Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5 10

5

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A

15

<400> 36

Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5 10

20

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A

<400> 37

Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5 10

30

<210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal carboxilado libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A

40

<221> SITE

<222> (13) ... (13)

<223> glutamina carboxilada

<400> 38

Cys Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5 10

45

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A

55

<400> 39

Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
 1 5

<210> 40
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A
 10

<400> 40
 Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
 1 5

15 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A

<400> 41
 Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
 25 1 5

<210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A
 35

<400> 42
 Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
 1 5 10

40 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A
 45

<400> 43
 Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
 50 1 5 10

<210> 44
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55

<220>
 <223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A

ES 2 755 505 T3

<400> 44
Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

5 <210> 45
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal carboxilado libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A

15 <221> SITE
<222> (13) ... (13)
<223> Lisina carboxilada

<400> 45
Cys Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

20 <210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Antígeno de SNAP-25

<400> 46
Cys Gly Gly Gly Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5 10

30 <210> 47
<211> 11
<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Antígeno de SNAP-25

40 <400> 47
Cys Gly Gly Gly Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

45 <210> 48
<211> 88
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BirA-HisTag(r)-SNAP-25-134-197

50 <400> 48

ES 2 755 505 T3

```

Met Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
 1      5      10      15
His His His His His His His His Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala
      20      25      30
Arg Glu Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile
      35      40      45
Gly Asn Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr
      50      55      60
Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys
65      70      75      80
Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
      85

```

5 <210> 49
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> BirA-HisTag(r)-SNAP-25-134-206

```

<400> 49
Met Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
 1      5      10      15
His His His His His His His His Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala
      20      25      30
Arg Glu Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile
      35      40      45
Gly Asn Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr
      50      55      60
Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys
65      70      75      80
Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser
      85      90      95
Gly

```

15 <210> 50
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido de BirA

```

<400> 50
Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His
 1      5      10      15

```

25 <210> 51
 <211> 7570
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC.

<400> 51

ES 2 755 505 T3

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgtt gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcctg gccattgcat acgttgatc 240
catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 360
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 420
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 480
attgacgtca atgggtggag tatttacggg aaactgcca cttggcagta catcaagtgt 540
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 660
tcgctattac catggtgatg cgtttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggttt 720
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagttt ttttggcacc 780
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgtg acaactccgc cccattgacg caaatggcg 840
gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg 900
cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc 960
tccgcgggcc accatggagg gcccggttac cgttaccgga tccagatate tgggcggccg 1020
ctcagcaagc ttcgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag aagaactctt 1080
cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt agatggtgat gttaacggcc acaagtctc 1140
tgtcagtgga gaggtgaag gtgatgcaac atacggaaaa cttaccctga agttcatctg 1200
cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtgt 1260
tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gactttttca agagtgccat 1320
gccgaaggt tatgtacagg aaaggaccat cttcttcaa gatgacggca actacaagac 1380
acgtgctgaa gtcaagtttg aaggtgatac cttgtttaat agaatcgagt taaaaggtat 1440
tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact ataactcaca 1500
caatgtatac atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagaccg 1560
ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa atactccaat 1620
tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaat ctgccctttc 1680
gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gagtttgtaa cagctgctgg 1740
gattacacat ggcattgatg aactgtacaa catcgatgga ggcggagggt gaccttttgt 1800
taataaacia tttaattata aagatcctgt aaatgggtgt gatattgctt atataaaaat 1860
tccaatgca ggacaaatgc aaccagtaaa agcttttaaa attcataata aaatatgggt 1920
tattccagaa agagatacat ttacaaatcc tgaagaagga gatttaaate caccaccaga 1980
agcaaaacia gttccagttt catattatga ttcaacatat ttaagtacag ataatgaaa 2040
agataattat ttaaaggag ttacaaaatt atttgagaga atttattcaa ctgatcttgg 2100
aagaatggtg ttaacatcaa tagtaagggg aataccattt tggggtgga gtacaataga 2160
tacagaatta aaagttattg atactaattg tattaatgtg atacaaccag atggtagtta 2220

ES 2 755 505 T3

tagatcagaa gaacttaatc tagtaataat aggaccctca gctgatatta tacagtttga 2280
atgtaaaagc tttggacatg aagttttgaa tcttacgcga aatggttatg gctctactca 2340
atacattaga tttagcccag attttacatt tggttttgag gagtcacttg aagttgatac 2400
aaatcctctt ttaggtgcag gcaaatttgc tacagatcca gcagtaacat tagcacatga 2460
acttatacat gctggacata gattatatgg aatagcaatt aatccaaata gggtttttaa 2520
agtaaatact aatgcctatt atgaaatgag tgggttagaa gtaagctttg aggaacttag 2580
aacatttggg ggacatgatg caaagtttat agatagttta caggaaaacg aatttcgtct 2640
atattattat aataagttta aagatatagc aagtacactt aataaagcta aatcaatagt 2700
aggtactact gcttcattac agtatatgaa aaatgttttt aaagagaaat atctcctatc 2760
tgaagataca tctggaaaat tttcggtaga taaattaaaa tttgataagt tatacaaaat 2820
gttaacagag atttacacag aggataaatt tgtaagttt tttaaagtac ttaacagaaa 2880
aacatatttg aattttgata aagccgtatt taagataaat atagtaccta aggtaaatta 2940
cacaatata gatggattta atttaagaaa tacaattta gcagcaaact ttaatggta 3000
aaatacagaa attaataata tgaattttac taaactaaa aattttactg gattgtttga 3060
attttataag ttgctatgtg taagagggat aatcacttcg aatgaacgc gttggcccta 3120
ttctatagtg tcacctaaat gctagagctc gctgactcag cctgactgtg cctctagt 3180
gccagccatc tttgttttgc cctcccccg tgcctcctt gaccctggaa ggtgccactc 3240
ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt 3300
ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca 3360
ggcatgctgg ggatgcggtg ggctctatgg cttctgaggc ggaaagaacc agctggggct 3420
ctagggggta tccccacgcg cctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtgggtggtta 3480
cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg cctagcggc cgctcctttc gctttcttc 3540
cttcccttct cgccacgttc gccggcttcc cccgtcaagc tctaaatcgg ggcacccctt 3600
tagggttccg atttagtgt ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtagt 3660
gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca 3720
cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggct 3780
attcttttga tttataaggg attttgggga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 3840
tttaacaaaa atttaacgcg aattaattct gtggaatgtg tgtcagttag ggtgtggaaa 3900
gtccccagcg tccccaggca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa 3960
ccaggtgtgg aaagtcccc ggcctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 4020
attagtcagc aacctagtc ccgcccctaa cctcggccat cccgccccta actccgcca 4080
gttccgcccc ttctccgccc catggctgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg 4140
ccgctctgct ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg ctttttttga ggcctaggct 4200
tttgcaaaaa gctcccggga gcttgtatat ccattttcgg atctgatcaa gagacaggat 4260
gaggatcggt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg 4320
tgagagggct attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccc 4380
gtttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccgggtg 4440
ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcttc 4500
cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcy 4560
aagtgcgggg gcaggatctc ctgtcatctc acctgtctcc tgccgagaaa gtatccatca 4620
tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccc ttcgaccacc 4680
aagcgaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctcgatgga agccggtctt gtcgatcagg 4740
atgatctgga cgaagagcat cagggctcog cccagccga actgttcgcc aggtcgaag 4800
cgcgcatgcc cgacggcag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgcccgaata 4860
tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg 4920
accgctatca ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggccgcaat 4980
gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta tcgcccctcc cgattcgcag cgcatcgct 5040
tctatcgct tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgaat tgaccgacca 5100
agcgacgccc aacctgccat cagcagatgt cgattccacc gccgccttct atgaaaggtt 5160
gggcttcgga atcgttttcc gggacgccc ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat 5220
gctggagttc ttcgcccacc ccaacttgtt tattgcagct tataatgggt acaaataaag 5280
caatagcatc acaaatttca caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtggtt 5340
gtccaaactc atcaatgat cttatcatgt ctgtataccg tcgacctcta gctagagctt 5400
ggcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 5460
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctgggtg gcctaatgag tgagctaac 5520
cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 5580
gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctctccgc 5640
ttcctcgtc actgactcgc tgcgctcggg agttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 5700
ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 5760
agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttctgtg cgtttttcca 5820
taggctccgc cccctgacg agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaat 5880

ES 2 755 505 T3

```

cccgcacagga ctataaagat accagggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 5940
tgttccgacc ctgccgctta cgggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 6000
gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct 6060
gggctgtgtg cacgaacccc cgttcagcc cgaccgctgc gccttatecg gtaactatcg 6120
tcttgagtcc aaccgggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 6180
gattagcaga gcgaggatg tagggcgtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta 6240
cggctacact agaaggacag tatttggat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 6300
aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt 6360
tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 6420
ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatgag 6480
attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat 6540
ctaaagtata tatgagtaaa cttaggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 6600
tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tctgttagat 6660
aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc 6720
acgtccaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 6780
aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggagagctag 6840
agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt 6900
ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 6960
agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 7020
tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc 7080
tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 7140
attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa 7200
taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacggt cttcggggcg 7260
aaaactotca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctctgtgcacc 7320
caactgatct tcagcatctt ttaactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag 7380
gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 7440
cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 7500
tgaatgtatt tagaaaaata acaaaatag ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc 7560
acctgacgtc                                     7570

```

<210> 52
 <211> 682
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de GFP-NTBo/A.

10 <400> 52

ES 2 755 505 T3

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

ES 2 755 505 T3

Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
 165 170 175
 Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
 180 185 190
 Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
 195 200 205
 Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
 210 215 220
 Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile Asp
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Gly Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp
 245 250 255
 Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly
 260 265 270
 Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val
 275 280 285
 Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn
 290 295 300
 Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr
 305 310 315 320
 Tyr Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr
 325 330 335
 Lys Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu
 340 345 350
 Thr Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp
 355 360 365
 Thr Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro
 370 375 380
 Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro
 385 390 395 400
 Ser Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val
 405 410 415
 Leu Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe
 420 425 430
 Ser Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr
 435 440 445
 Asn Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr
 450 455 460
 Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala
 465 470 475 480
 Ile Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu
 485 490 495
 Met Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly
 500 505 510
 His Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu
 515 520 525
 Tyr Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala
 530 535 540
 Lys Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val
 545 550 555 560
 Phe Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser
 565 570 575
 Val Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile
 580 585 590
 Tyr Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys
 595 600 605
 Thr Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro
 610 615 620
 Lys Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn
 625 630 635 640
 Leu Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn

ES 2 755 505 T3

Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu
645 650 655
660
Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys
665 670
675 680

- <210> 53
- <211> 6259
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Constructo de expresión pQBI-25/GFP.

- <400> 53

ES 2 755 505 T3

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcctg gccattgcat acgttgatc 240
catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtccat agcccatata 360
tggagtcccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 420
cccgccatt gagtcaata atgacgatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 480
attgacgtca atgggtggag tatttacggg aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 540
atcatatgcc aagtaogccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600
atgccagta catgacotta tgggaacttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 660
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 720
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 780
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgtg acaactccgc ccattgacg caaatgggcg 840
gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg 900
cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc 960
tcgoggggcc accatggagg gcccggttac cggtaocgga tccagatata tgggogggccg 1020
ctcagcaagc ttcgogaatt cgggagggcg aggtggagct agcaaaggag aagaactctt 1080
cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt agatgggtgat gttaacggcc acaagttctc 1140
tgtcagtgga gagggtgaag gtgatgcaac atacggaaaa cttaccctga agttcatctg 1200
cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtgt 1260
tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gactttttca agagtgccat 1320
gcccgaaggt tatgtacagg aaaggaccat cttcttcaaa gatgacggca actacaagac 1380
acgtgctgaa gtcaagtttg aaggtgatac ccttgtaaat agaatcgagt taaaaggat 1440
tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact ataactcaca 1500
caatgtatac atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagaccgc 1560
ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa atactccaat 1620
tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaaat ctgccctttc 1680
gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gagtttgtaa cagctgctgg 1740
gattacacat ggcattggatg aactgtacaa catcgatgga ggcggagggtg gatgaacgcg 1800
ttggccctat tctatagtgt cacctaaatg ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc 1860
cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctccccctg gccttctctg accctggaag 1920
gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcacgcacat tgtctgagta 1980
gggtgcattc tattctgggg ggtgggggtg ggcaggacag caaggggggag gattgggaag 2040
acaatagcag gcatgctggg gatgcgggtg gctctatggc ttctgaggcg gaaagaacca 2100
gctggggctc taggggggtat ccccacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg 2160
tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgcgc gctcctttcg 2220
ctttcttccc ttctttctc gccacgttog ccggtttcc ccgtcaagct ctaaactggg 2280
gcatcccttt agggttccga tttagtgtt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt 2340
aggggtgatg ttacagtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc ctttgacgt 2400
tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggacaaca ctcaacccta 2460
tctcggctca ttcttttgat ttataaggga ttttggggat ttccggcctat tggttaaaaa 2520
atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attaattctg tggaatgtgt gtcagttagg 2580
gtgtggaaag tcccaggct ccccaggcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 2640
agtcagcaac caggtgtgga aagtcccag gctcccagc aggcagaagt atgcaaaaga 2700

ES 2 755 505 T3

tgcattctcaa ttagtcagca accatagtc ccgccctaac tccgcccatc ccgccctaa 2760
 ctccgcccag tccgcccat tctccgccc atggctgact aatTTTTTTT atttatgcag 2820
 aggccgaggc cgcctctgcc tetgagctat tccagaagta gtgaggaggc tTTTTTggag 2880
 gcctaggctt ttgcaaaaag ctcccgggag cttgtatatt cattttcgga tctgatcaag 2940
 agacaggatg aggatcgttt cgcattgattg aacaagattg attgcacgca ggttctccgg 3000
 ccgcttgggt ggagaggcta tccggctatg actgggcaca acagacaatc ggotgctctg 3060
 atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgccgggt tctTTTTTgtc aagaccgacc 3120
 tgtccggctg cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 3180
 cgggcttcc ttgcccagct gtgctcagc ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 3240
 tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgcattctca ccttgctcct gccagaaaag 3300
 tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgt tgatccggct acctgccat 3360
 tcgaccacca agcgaaacat cgcattcagc gagcacgtac tccgatggaa gccggtcttg 3420
 tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgccca 3480
 ggctcaaggc gcgatgccc gacggcggag atctcgtcgt gaccatggc gatgcctgct 3540
 tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcactgt ggccggctgg 3600
 gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgg tgatattgct gaagagcttg 3660
 gcggcgaatg ggctgacccg tctcctgtgc tttacgggat cgcctcctcc gattccagcag 3720
 gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagc tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat 3780
 gaccgaccaa gcgacgccc acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta 3840
 tgaaaggttg ggcttcggaa tccgtttccg ggacgcccgc tggatgatcc tccagcggg 3900
 ggatctcatg ctggagttct tcccccacc caacttgttt attgcagctt ataattggtta 3960
 caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag 4020
 ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tgtataccgt cgacctctag 4080
 ctagagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttctctgt tgaatttgtt atccgctcac 4140
 aattccacac aacatacagc ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaattgagt 4200
 gagctaactc acattaattg cgttgccgct actgccgct tccagtcgg gaaacctgtc 4260
 gtgccagctg cattaatgaa tccggccaacg ccgggggaga ggccggttgc gtattggggc 4320
 ctcttccgct tctcctgctca ctgactcgtt gcgctcggtc gttccggctgc ggcgagcggg 4380
 atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 4440
 gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc 4500
 gtttttccat aggcctccgc cccctgacga gcatcaciaa aatcgacgct caagtacag 4560
 gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctgt 4620
 gcgctctcct gttccgacc tgcgcttac cggatacctg tccgccttcc tccctccggg 4680
 aagcgtggcg ttttctcaat gctcaccgct taggtatctc agttccggtg aggtcgttcg 4740
 ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg 4800
 taactatcgt cttgagtcca acccgtaag acacgacta tccgactgg cagcagccac 4860
 tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggtg 4920
 gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt 4980
 taccttccga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg 5040
 tggTTTTTTT gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 5100
 tttgatcttt tctacggggg ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt 5160
 ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt 5220
 taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 5280
 tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tccgttcacc atagttgctt gactccccgt 5340
 cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgtg caatgatacc 5400
 gcgagaccca cgtcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaaggcc 5460
 cgagcgcaga agtggtoctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attggtgocg 5520
 ggaagctaga gtaagtagtt cgcagtttaa tagtttgcc aacgttgttg ccattgctac 5580
 aggcacgtg gtgtcaccgt cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 5640
 atcaaggcga gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct cctccggctc 5700
 tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact 5760
 gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatgcttt tetgtgactg gtgagtactc 5820
 aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgoc gcgaccgagt tgctcttgc ccgctcaat 5880
 accgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 5940
 ttccggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 6000
 tccgtcacc cactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 6060
 aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataaggcgc acacggaaat gttgaatact 6120
 catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 6180
 atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 6240
 aaaagtgcc cctgacgtc 6259

<210> 54
 <211> 245
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de GFP.

 10 <400> 54
 Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1 5 10 15
 Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35 40 45
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 50 55 60
 Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg
 65 70 75 80
 His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 85 90 95
 Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
 100 105 110
 Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
 115 120 125
 Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
 130 135 140
 Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 145 150 155 160
 Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
 165 170 175
 Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
 180 185 190
 Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
 195 200 205
 Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
 210 215 220
 Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile Asp
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Gly
 245

 <210> 55
 <211> 4
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Espaciador flexible, espaciador de G
 20
 <400> 55
 Gly Gly Gly Gly
 1

 <210> 56
 25 <211> 5
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Espaciador flexible, espaciador de G

5

<400> 56

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 57

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Espaciador flexible, espaciador de A

15

<400> 57

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Espaciador flexible, espaciador de A

25

<400> 58

Ala Ala Ala Ala Val

1 5

30

<210> 59

<211> 821

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<400> 59

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

ES 2 755 505 T3

145					150					155				160	
Lys	Met	Glu	Lys	Arg	Leu	His	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Lys
				165					170					175	
Phe	Arg	Cys	Pro	Ala	Gly	Gly	Asn	Pro	Met	Pro	Thr	Met	Arg	Trp	Leu
			180					185					190		
Lys	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Gln	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Tyr	Lys
		195					200					205			
Val	Arg	Asn	Gln	His	Trp	Ser	Leu	Ile	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser
	210					215					220				
Asp	Lys	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Glu	Asn	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ile
225					230					235					240
Asn	His	Thr	Tyr	His	Leu	Asp	Val	Val	Glu	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Pro
				245					250					255	
Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Ala	Ser	Thr	Val	Val	Gly	Gly
			260					265						270	
Asp	Val	Glu	Phe	Val	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile
		275					280					285			
Gln	Trp	Ile	Lys	His	Val	Glu	Lys	Asn	Gly	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Asp
	290					295					300				
Gly	Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Val	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Val	Asn	Thr	Thr
305					310					315					320
Asp	Lys	Glu	Ile	Glu	Val	Leu	Tyr	Ile	Arg	Asn	Val	Thr	Phe	Glu	Asp
				325					330					335	
Ala	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	Leu	Ala	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly	Ile	Ser	Phe
			340					345					350		
His	Ser	Ala	Trp	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Arg	Glu	Lys	Glu
		355					360					365			
Ile	Thr	Ala	Ser	Pro	Asp	Tyr	Leu	Glu	Ile	Ala	Ile	Tyr	Cys	Ile	Gly
	370					375					380				
Val	Phe	Leu	Ile	Ala	Cys	Met	Val	Val	Thr	Val	Ile	Leu	Cys	Arg	Met
385					390					395					400
Lys	Asn	Thr	Thr	Lys	Lys	Pro	Asp	Phe	Ser	Ser	Gln	Pro	Ala	Val	His
				405					410					415	
Lys	Leu	Thr	Lys	Arg	Ile	Pro	Leu	Arg	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ala
			420					425					430		
Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	Met	Asn	Ser	Asn	Thr	Pro	Leu	Val	Arg	Ile	Thr
		435					440					445			
Thr	Arg	Leu	Ser	Ser	Thr	Ala	Asp	Thr	Pro	Met	Leu	Ala	Gly	Val	Ser
	450					455					460				
Glu	Tyr	Glu	Leu	Pro	Glu	Asp	Pro	Lys	Trp	Glu	Phe	Pro	Arg	Asp	Lys
465					470					475					480
Leu	Thr	Leu	Gly	Lys	Pro	Leu	Gly	Glu	Gly	Cys	Phe	Gly	Gln	Val	Val
				485					490					495	
Met	Ala	Glu	Ala	Val	Gly	Ile	Asp	Lys	Asp	Lys	Pro	Lys	Glu	Ala	Val
			500					505					510		
Thr	Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Asp	Asp	Ala	Thr	Glu	Lys	Asp	Leu
		515					520					525			
Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Glu	Met	Glu	Met	Met	Lys	Met	Ile	Gly	Lys	His
	530				535						540				
Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Gln	Asp	Gly	Pro	Leu
545					550					555					560
Tyr	Val	Ile	Val	Glu	Tyr	Ala	Ser	Lys	Gly	Asn	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu
				565					570					575	
Arg	Ala	Arg	Arg	Pro	Pro	Gly	Met	Glu	Tyr	Ser	Tyr	Asp	Ile	Asn	Arg
			580					585					590		
Val	Pro	Glu	Gln	Met	Thr	Phe	Lys	Asp	Leu	Val	Ser	Cys	Thr	Tyr	
		595				600					605				
Gln	Leu	Ala	Arg	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Gln	Lys	Cys	Ile	His
	610					615					620				
Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Glu	Asn	Asn	Val	Met
625					630					635					640

ES 2 755 505 T3

Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp Tyr
 645 650 655
 Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro
 660 665 670
 Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser
 675 680 685
 Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr
 690 695 700
 Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His
 705 710 715 720
 Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met
 725 730 735
 Arg Asp Cys Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln
 740 745 750
 Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Ile Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu Glu
 755 760 765
 Tyr Leu Asp Leu Ser Gln Pro Leu Glu Gln Tyr Ser Pro Ser Tyr Pro
 770 775 780
 Asp Thr Arg Ser Ser Cys Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ser Pro
 785 790 795 800
 Asp Pro Met Pro Tyr Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile Asn
 805 810 815
 Gly Ser Val Lys Thr
 820

<210> 60

<211> 822

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 60

ES 2 755 505 T3

Met	Val	Ser	Trp	Gly	Arg	Phe	Ile	Cys	Leu	Val	Val	Val	Thr	Met	Ala
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Leu	Val	Glu	Asp	Thr	Thr
			20					25					30		
Leu	Glu	Pro	Glu	Glu	Pro	Pro	Thr	Lys	Tyr	Gln	Ile	Ser	Gln	Pro	Glu
		35					40					45			
Val	Tyr	Val	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Glu	Val	Arg	Cys	Leu	Leu
	50					55					60				
Lys	Asp	Ala	Ala	Val	Ile	Ser	Trp	Thr	Lys	Asp	Gly	Val	His	Leu	Gly
65					70					75					80
Pro	Asn	Asn	Arg	Thr	Val	Leu	Ile	Gly	Glu	Tyr	Leu	Gln	Ile	Lys	Gly
				85					90					95	
Ala	Thr	Pro	Arg	Asp	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ala	Cys	Thr	Ala	Ser	Arg	Thr
			100					105						110	
Val	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Tyr	Phe	Met	Val	Asn	Val	Thr	Asp	Ala	Ile
		115					120						125		
Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Thr	Asp	Gly	Ala	Glu	Asp	Phe	Val
	130					135					140				
Ser	Glu	Asn	Ser	Asn	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Asn	Thr	Glu
145					150					155					160
Lys	Met	Glu	Lys	Arg	Leu	His	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Lys
				165					170					175	
Phe	Arg	Cys	Pro	Ala	Gly	Gly	Asn	Pro	Met	Pro	Thr	Met	Arg	Trp	Leu
			180					185						190	
Lys	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Gln	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Tyr	Lys
		195					200					205			
Val	Arg	Asn	Gln	His	Trp	Ser	Leu	Ile	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser
	210					215					220				
Asp	Lys	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Glu	Asn	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ile

ES 2 755 505 T3

225					230					235				240
Asn	His	Thr	Tyr	His	Leu	Asp	Val	Val	Glu	Arg	Ser	Pro	His	Arg
				245					250					255
Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Ala	Ser	Thr	Val	Val	Gly
			260					265					270	
Asp	Val	Glu	Phe	Val	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His
		275					280					285		Ile
Gln	Trp	Ile	Lys	His	Val	Glu	Lys	Asn	Gly	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro
	290					295					300			Asp
Gly	Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Val	Leu	Lys	His	Ser	Gly	Ile	Asn	Ser
305					310					315				320
Asn	Ala	Glu	Val	Leu	Ala	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	Glu	Ala	Asp	Ala
				325					330					335
Glu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Tyr	Ile	Gly	Gln	Ala	Asn	Gln
			340					345					350	Ser
Ala	Trp	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Gln	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg	Glu
		355					360					365		Lys
Glu	Ile	Thr	Ala	Ser	Pro	Asp	Tyr	Leu	Glu	Ile	Ala	Ile	Tyr	Cys
	370					375					380			Ile
Gly	Val	Phe	Leu	Ile	Ala	Cys	Met	Val	Val	Thr	Val	Ile	Leu	Cys
385					390					395				400
Met	Lys	Asn	Thr	Thr	Lys	Lys	Pro	Asp	Phe	Ser	Ser	Gln	Pro	Ala
				405					410					415
His	Lys	Leu	Thr	Lys	Arg	Ile	Pro	Leu	Arg	Arg	Gln	Val	Thr	Val
			420					425					430	Ser
Ala	Glu	Ser	Ser	Ser	Met	Asn	Ser	Asn	Thr	Pro	Leu	Val	Arg	Ile
		435				440					445			
Thr	Thr	Arg	Leu	Ser	Ser	Thr	Ala	Asp	Thr	Pro	Met	Leu	Ala	Gly
	450					455					460			Val
Ser	Glu	Tyr	Glu	Leu	Pro	Glu	Asp	Pro	Lys	Trp	Glu	Phe	Pro	Arg
465					470					475				480
Lys	Leu	Thr	Leu	Gly	Lys	Pro	Leu	Gly	Glu	Gly	Cys	Phe	Gly	Gln
				485					490					495
Val	Met	Ala	Glu	Ala	Val	Gly	Ile	Asp	Lys	Asp	Lys	Pro	Lys	Glu
		500						505					510	Ala
Val	Thr	Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Asp	Asp	Ala	Thr	Glu	Lys
		515					520					525		Asp
Leu	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Glu	Met	Glu	Met	Met	Lys	Met	Ile	Gly
	530					535					540			Lys
His	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Gln	Asp	Gly
545					550					555				560
Leu	Tyr	Val	Ile	Val	Glu	Tyr	Ala	Ser	Lys	Gly	Asn	Leu	Arg	Glu
			565						570					575
Leu	Arg	Ala	Arg	Arg	Pro	Pro	Gly	Met	Glu	Tyr	Ser	Tyr	Asp	Ile
			580					585					590	Asn
Arg	Val	Pro	Glu	Glu	Gln	Met	Thr	Phe	Lys	Asp	Leu	Val	Ser	Cys
		595					600					605		Thr
Tyr	Gln	Leu	Ala	Arg	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Gln	Lys	Cys
	610					615						620		Ile
His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Glu	Asn	Asn
625					630					635				640
Met	Lys	Ile	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Ile	Asn	Asn	Ile
			645						650					655
Tyr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr	Asn	Gly	Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met
		660						665					670	Ala
Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp	Arg	Val	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val
		675					680					685		Trp
Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Met	Trp	Glu	Ile	Phe	Thr	Leu	Gly	Gly	Ser
	690					695					700			Pro
Tyr	Pro	Gly	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Leu	Phe	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu
705					710					715				720

ES 2 755 505 T3

His	Arg	Met	Asp	Lys	Pro	Ala	Asn	Cys	Thr	Asn	Glu	Leu	Tyr	Met	Met
				725					730					735	
Met	Arg	Asp	Cys	Trp	His	Ala	Val	Pro	Ser	Gln	Arg	Pro	Thr	Phe	Lys
			740					745					750		
Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	Ile	Leu	Thr	Leu	Thr	Thr	Asn	Glu
		755					760						765		
Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Gln	Pro	Leu	Glu	Gln	Tyr	Ser	Pro	Ser	Tyr
	770					775					780				
Pro	Asp	Thr	Arg	Ser	Ser	Cys	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Ser	Val	Phe	Ser
785					790					795					800
Pro	Asp	Pro	Met	Pro	Tyr	Glu	Pro	Cys	Leu	Pro	Gln	Tyr	Pro	His	Ile
			805						810					815	
Asn	Gly	Ser	Val	Lys	Thr										
			820												

<210> 61

<211> 769

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 61

ES 2 755 505 T3

Met	Val	Ser	Trp	Gly	Arg	Phe	Ile	Cys	Leu	Val	Val	Val	Thr	Met	Ala
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Leu	Val	Glu	Asp	Thr	Thr
			20					25					30		
Leu	Glu	Pro	Glu	Glu	Pro	Pro	Thr	Lys	Tyr	Gln	Ile	Ser	Gln	Pro	Glu
		35					40					45			
Val	Tyr	Val	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Glu	Val	Arg	Cys	Leu	Leu
	50					55					60				
Lys	Asp	Ala	Ala	Val	Ile	Ser	Trp	Thr	Lys	Asp	Gly	Val	His	Leu	Gly
65				70						75					80
Pro	Asn	Asn	Arg	Thr	Val	Leu	Ile	Gly	Glu	Tyr	Leu	Gln	Ile	Lys	Gly
				85					90					95	
Ala	Thr	Pro	Arg	Asp	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ala	Cys	Thr	Ala	Ser	Arg	Thr
			100					105						110	
Val	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Tyr	Phe	Met	Val	Asn	Val	Thr	Asp	Ala	Ile
		115					120					125			
Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Thr	Asp	Gly	Ala	Glu	Asp	Phe	Val
	130					135					140				
Ser	Glu	Asn	Ser	Asn	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Asn	Thr	Glu
145				150						155					160
Lys	Met	Glu	Lys	Arg	Leu	His	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Lys
				165					170					175	
Phe	Arg	Cys	Pro	Ala	Gly	Gly	Asn	Pro	Met	Pro	Thr	Met	Arg	Trp	Leu
			180					185						190	
Lys	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Gln	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Tyr	Lys
		195					200					205			
Val	Arg	Asn	Gln	His	Trp	Ser	Leu	Ile	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser
	210					215					220				
Asp	Lys	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Glu	Asn	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ile
225					230					235					240
Asn	His	Thr	Tyr	His	Leu	Asp	Val	Val	Glu	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Pro
				245					250					255	
Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Ala	Ser	Thr	Val	Val	Gly	Gly
			260					265						270	
Asp	Val	Glu	Phe	Val	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile
		275					280					285			
Gln	Trp	Ile	Lys	His	Val	Glu	Lys	Asn	Gly	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Asp
	290					295					300				
Gly	Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Val	Leu	Lys	His	Ser	Gly	Ile	Asn	Ser	Ser

ES 2 755 505 T3

305					310					315				320	
Asn	Ala	Glu	Val	Leu	Ala	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	Glu	Ala	Asp	Ala	Gly
				325					330					335	
Glu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Tyr	Ile	Gly	Gln	Ala	Asn	Gln	Ser
			340					345					350		
Ala	Trp	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Gln	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg	Glu	Lys
		355					360					365			
Glu	Ile	Thr	Ala	Ser	Pro	Asp	Tyr	Leu	Glu	Ile	Ala	Ile	Tyr	Cys	Ile
	370					375					380				
Gly	Val	Phe	Leu	Ile	Ala	Cys	Met	Val	Val	Thr	Val	Ile	Leu	Cys	Arg
385					390					395					400
Met	Lys	Asn	Thr	Thr	Lys	Lys	Pro	Asp	Phe	Ser	Ser	Gln	Pro	Ala	Val
				405					410					415	
His	Lys	Leu	Thr	Lys	Arg	Ile	Pro	Leu	Arg	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Ser
			420					425					430		
Ala	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	Met	Asn	Ser	Asn	Thr	Pro	Leu	Val	Arg	Ile
		435					440					445			
Thr	Thr	Arg	Leu	Ser	Ser	Thr	Ala	Asp	Thr	Pro	Met	Leu	Ala	Gly	Val
	450					455					460				
Ser	Glu	Tyr	Glu	Leu	Pro	Glu	Asp	Pro	Lys	Trp	Glu	Phe	Pro	Arg	Asp
465					470					475					480
Lys	Leu	Thr	Leu	Gly	Lys	Pro	Leu	Gly	Glu	Gly	Cys	Phe	Gly	Gln	Val
				485				490						495	
Val	Met	Ala	Glu	Ala	Val	Gly	Ile	Asp	Lys	Asp	Lys	Pro	Lys	Glu	Ala
			500					505					510		
Val	Thr	Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Asp	Asp	Ala	Thr	Glu	Lys	Asp
		515				520						525			
Leu	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Glu	Met	Glu	Met	Met	Lys	Met	Ile	Gly	Lys
	530					535					540				
His	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Gln	Asp	Gly	Pro
545					550					555					560
Leu	Tyr	Val	Ile	Val	Glu	Tyr	Ala	Ser	Lys	Gly	Asn	Leu	Arg	Glu	Tyr
				565					570					575	
Leu	Arg	Ala	Arg	Arg	Pro	Pro	Gly	Met	Glu	Tyr	Ser	Tyr	Asp	Ile	Asn
			580					585					590		
Arg	Val	Pro	Glu	Glu	Gln	Met	Thr	Phe	Lys	Asp	Leu	Val	Ser	Cys	Thr
		595					600					605			
Tyr	Gln	Leu	Ala	Arg	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Gln	Lys	Cys	Ile
	610					615					620				
His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Glu	Asn	Asn	Val
625					630					635					640
Met	Lys	Ile	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Ile	Asn	Asn	Ile	Asp
				645					650					655	
Tyr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr	Asn	Gly	Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala
			660					665					670		
Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp	Arg	Val	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp
		675				680						685			
Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Met	Trp	Glu	Ile	Phe	Thr	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro
	690					695					700				
Tyr	Pro	Gly	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Leu	Phe	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly
705					710					715					720
His	Arg	Met	Asp	Lys	Pro	Ala	Asn	Cys	Thr	Asn	Glu	Leu	Tyr	Met	Met
				725					730					735	
Met	Arg	Asp	Cys	Trp	His	Ala	Val	Pro	Ser	Gln	Arg	Pro	Thr	Phe	Lys
			740					745					750		
Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	Ile	Leu	Thr	Leu	Thr	Thr	Asn	Glu
		755					760					765			
Ile															

<210> 62
<211> 709
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 62

ES 2 755 505 T3

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

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

<210> 63
 <211> 707
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 63

ES 2 755 505 T3

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

ES 2 755 505 T3

Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val
 145 150 155 160
 Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn
 165 170 175
 Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn
 195 200 205
 Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys
 210 215 220
 Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile
 225 230 235 240
 Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly
 245 250 255
 Asn Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro
 260 265 270
 Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu
 275 280 285
 Ile Ala Ile Tyr Cys Ile Gly Val Phe Leu Ile Ala Cys Met Val Val
 290 295 300
 Thr Val Ile Leu Cys Arg Met Lys Asn Thr Thr Lys Lys Pro Asp Phe
 305 310 315 320
 Ser Ser Gln Pro Ala Val His Lys Leu Thr Lys Arg Ile Pro Leu Arg
 325 330 335
 Arg Gln Val Thr Val Ser Ala Glu Ser Ser Ser Ser Met Asn Ser Asn
 340 345 350
 Thr Pro Leu Val Arg Ile Thr Thr Arg Leu Ser Ser Thr Ala Asp Thr
 355 360 365
 Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu Leu Pro Glu Asp Pro Lys
 370 375 380
 Trp Glu Phe Pro Arg Asp Lys Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Val Gly Ile Asp Lys
 405 410 415
 Asp Lys Pro Lys Glu Ala Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp
 420 425 430
 Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met
 435 440 445
 Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala
 450 455 460
 Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu Tyr Ala Ser Lys
 465 470 475 480
 Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Met Glu
 485 490 495
 Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn Arg Val Pro Glu Glu Gln Met Thr Phe Lys
 500 505 510
 Asp Leu Val Ser Cys Thr Tyr Gln Leu Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu
 515 520 525
 Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu
 530 535 540
 Val Thr Glu Asn Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg
 545 550 555 560
 Asp Ile Asn Asn Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu
 565 570 575
 Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr
 580 585 590
 His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Phe
 595 600 605
 Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe
 610 615 620
 Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr

ES 2 755 505 T3

625					630					635					640
Asn	Glu	Leu	Tyr	Met	Met	Met	Arg	Asp	Cys	Trp	His	Ala	Val	Pro	Ser
				645					650					655	
Gln	Arg	Pro	Thr	Phe	Lys	Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	Ile	Leu
			660					665					670		
Thr	Leu	Thr	Thr	Asn	Glu	Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Ser	Gly	Ala	Val	Asp
		675					680					685			
Cys	His	Lys	Pro	Pro	Cys	Asn	Pro	Ser	His	Leu	Pro	Cys	Val	Leu	Ala
	690					695					700				
Val	Asp	Gln													
705															

<210> 64

<211> 706

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 64

ES 2 755 505 T3

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

ES 2 755 505 T3

Ser Ser Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu
340 345 350
Leu Pro Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Lys Leu Thr Leu
355 360 365
Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu
370 375 380
Ala Val Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala Val Thr Val Ala
385 390 395 400
Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu
405 410 415
Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile
420 425 430
Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile
435 440 445
Val Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Arg Ala Arg
450 455 460
Arg Pro Pro Gly Met Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn Arg Val Pro Glu
465 470 475 480
Glu Gln Met Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr Tyr Gln Leu Ala
485 490 495
Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu
500 505 510
Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asn Asn Val Met Lys Ile Ala
515 520 525
Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys
530 535 540
Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu
545 550 555 560
Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val
565 570 575
Leu Met Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile
580 585 590
Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp
595 600 605
Lys Pro Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp Cys
610 615 620
Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu
625 630 635 640
Asp Leu Asp Arg Ile Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu Glu Tyr Leu Asp
645 650 655
Leu Ser Gln Pro Leu Glu Gln Tyr Ser Pro Ser Tyr Pro Asp Thr Arg
660 665 670
Ser Ser Cys Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ser Pro Asp Pro Met
675 680 685
Pro Tyr Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile Asn Gly Ser Val
690 695 700
Lys Thr
705

<210> 65
<211> 705
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

ES 2 755 505 T3

<400> 65

Met	Val	Ser	Trp	Gly	Arg	Phe	Ile	Cys	Leu	Val	Val	Val	Thr	Met	Ala
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Leu	Val	Glu	Asp	Thr	Thr
			20					25					30		
Leu	Glu	Pro	Glu	Glu	Pro	Pro	Thr	Lys	Tyr	Gln	Ile	Ser	Gln	Pro	Glu

ES 2 755 505 T3

		35				40				45					
Val	Tyr	Val	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Glu	Val	Arg	Cys	Leu	Leu
	50					55				60					
Lys	Asp	Ala	Ala	Val	Ile	Ser	Trp	Thr	Lys	Asp	Gly	Val	His	Leu	Gly
65				70						75					80
Pro	Asn	Asn	Arg	Thr	Val	Leu	Ile	Gly	Glu	Tyr	Leu	Gln	Ile	Lys	Gly
				85					90					95	
Ala	Thr	Pro	Arg	Asp	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ala	Cys	Thr	Ala	Ser	Arg	Thr
			100					105					110		
Val	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Tyr	Phe	Met	Val	Asn	Val	Thr	Asp	Ala	Ile
	115						120					125			
Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Thr	Asp	Gly	Ala	Glu	Asp	Phe	Val
	130					135					140				
Ser	Glu	Asn	Ser	Asn	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Asn	Thr	Glu
145					150					155					160
Lys	Met	Glu	Lys	Arg	Leu	His	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Lys
				165					170					175	
Phe	Arg	Cys	Pro	Ala	Gly	Gly	Asn	Pro	Met	Pro	Thr	Met	Arg	Trp	Leu
			180					185					190		
Lys	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Gln	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Tyr	Lys
		195					200					205			
Val	Arg	Asn	Gln	His	Trp	Ser	Leu	Ile	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser
	210					215					220				
Asp	Lys	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Glu	Asn	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ile
225					230					235					240
Asn	His	Thr	Tyr	His	Leu	Asp	Val	Val	Glu	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Pro
				245					250					255	
Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Ala	Ser	Thr	Val	Val	Gly	Gly
			260					265					270		
Asp	Val	Glu	Phe	Val	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile
		275					280					285			
Gln	Trp	Ile	Lys	His	Val	Glu	Lys	Asn	Gly	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Asp
	290					295					300				
Gly	Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Val	Leu	Lys	Val	Ser	Ala	Glu	Ser	Ser	Ser
305					310					315					320
Ser	Met	Asn	Ser	Asn	Thr	Pro	Leu	Val	Arg	Ile	Thr	Thr	Arg	Leu	Ser
				325					330					335	
Ser	Thr	Ala	Asp	Thr	Pro	Met	Leu	Ala	Gly	Val	Ser	Glu	Tyr	Glu	Leu
			340					345					350		
Pro	Glu	Asp	Pro	Lys	Trp	Glu	Phe	Pro	Arg	Asp	Lys	Leu	Thr	Leu	Gly
		355					360					365			
Lys	Pro	Leu	Gly	Glu	Gly	Cys	Phe	Gly	Gln	Val	Val	Met	Ala	Glu	Ala
	370					375					380				
Val	Gly	Ile	Asp	Lys	Asp	Lys	Pro	Lys	Glu	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Val
385					390					395					400
Lys	Met	Leu	Lys	Asp	Asp	Ala	Thr	Glu	Lys	Asp	Leu	Ser	Asp	Leu	Val
				405					410					415	
Ser	Glu	Met	Glu	Met	Met	Lys	Met	Ile	Gly	Lys	His	Lys	Asn	Ile	Ile
			420					425					430		
Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Gln	Asp	Gly	Pro	Leu	Tyr	Val	Ile	Val
			435				440					445			
Glu	Tyr	Ala	Ser	Lys	Gly	Asn	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Arg	Ala	Arg	Arg
	450					455					460				
Pro	Pro	Gly	Met	Glu	Tyr	Ser	Tyr	Asp	Ile	Asn	Arg	Val	Pro	Glu	Glu
465					470					475					480
Gln	Met	Thr	Phe	Lys	Asp	Leu	Val	Ser	Cys	Thr	Tyr	Gln	Leu	Ala	Arg
				485					490					495	
Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Gln	Lys	Cys	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Ala
			500					505					510		
Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Glu	Asn	Asn	Val	Met	Lys	Ile	Ala	Asp
		515					520					525			

ES 2 755 505 T3

Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Ile	Asn	Asn	Ile	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Thr
	530					535					540				
Thr	Asn	Gly	Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Phe
545					550					555					560
Asp	Arg	Val	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Leu
				565					570					575	
Met	Trp	Glu	Ile	Phe	Thr	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro	Tyr	Pro	Gly	Ile	Pro
			580					585					590		
Val	Glu	Glu	Leu	Phe	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	His	Arg	Met	Asp	Lys
		595					600					605			
Pro	Ala	Asn	Cys	Thr	Asn	Glu	Leu	Tyr	Met	Met	Met	Arg	Asp	Cys	Trp
	610					615						620			
His	Ala	Val	Pro	Ser	Gln	Arg	Pro	Thr	Phe	Lys	Gln	Leu	Val	Glu	Asp
625					630					635					640
Leu	Asp	Arg	Ile	Leu	Thr	Leu	Thr	Thr	Asn	Glu	Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu
				645					650					655	
Ser	Gln	Pro	Leu	Glu	Gln	Tyr	Ser	Pro	Ser	Tyr	Pro	Asp	Thr	Arg	Ser
			660					665					670		
Ser	Cys	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Ser	Val	Phe	Ser	Pro	Asp	Pro	Met	Pro
		675					680					685			
Tyr	Glu	Pro	Cys	Leu	Pro	Gln	Tyr	Pro	His	Ile	Asn	Gly	Ser	Val	Lys
	690					695						700			
Thr															
705															

<210> 66

<211> 704

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 66

ES 2 755 505 T3

Met	Val	Ser	Trp	Gly	Arg	Phe	Ile	Cys	Leu	Val	Val	Val	Thr	Met	Ala
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Leu	Val	Glu	Asp	Thr	Thr
			20					25					30		
Leu	Glu	Pro	Glu	Gly	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Asn	Thr	Glu	Lys	Met	Glu
		35					40					45			
Lys	Arg	Leu	His	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Lys	Phe	Arg	Cys
	50					55					60				
Pro	Ala	Gly	Gly	Asn	Pro	Met	Pro	Thr	Met	Arg	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly
65				70						75					80
Lys	Glu	Phe	Lys	Gln	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Tyr	Lys	Val	Arg	Asn
				85					90					95	
Gln	His	Trp	Ser	Leu	Ile	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Lys	Gly
			100					105					110		
Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Glu	Asn	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ile	Asn	His	Thr
		115					120						125		
Tyr	His	Leu	Asp	Val	Val	Glu	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln
	130					135					140				
Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Ala	Ser	Thr	Val	Val	Gly	Gly	Asp	Val	Glu
145					150					155					160
Phe	Val	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp	Ile
				165					170					175	
Lys	His	Val	Glu	Lys	Asn	Gly	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Asp	Gly	Leu	Pro
			180					185					190		
Tyr	Leu	Lys	Val	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Val	Asn	Thr	Thr	Asp	Lys	Glu
		195				200						205			
Ile	Glu	Val	Leu	Tyr	Ile	Arg	Asn	Val	Thr	Phe	Glu	Asp	Ala	Gly	Glu
	210					215					220				
Tyr	Thr	Cys	Leu	Ala	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly	Ile	Ser	Phe	His	Ser	Ala

ES 2 755 505 T3

225					230					235					240
Trp	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Arg	Glu	Lys	Glu	Ile	Thr	Ala
				245					250						255
Ser	Pro	Asp	Tyr	Leu	Glu	Ile	Ala	Ile	Tyr	Cys	Ile	Gly	Val	Phe	Leu
			260					265					270		
Ile	Ala	Cys	Met	Val	Val	Thr	Val	Ile	Leu	Cys	Arg	Met	Lys	Asn	Thr
		275					280					285			
Thr	Lys	Lys	Pro	Asp	Phe	Ser	Ser	Gln	Pro	Ala	Val	His	Lys	Leu	Thr
	290					295					300				
Lys	Arg	Ile	Pro	Leu	Arg	Arg	Gln	Val	Ser	Ala	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser
305					310					315					320
Met	Asn	Ser	Asn	Thr	Pro	Leu	Val	Arg	Ile	Thr	Thr	Arg	Leu	Ser	Ser
				325					330					335	
Thr	Ala	Asp	Thr	Pro	Met	Leu	Ala	Gly	Val	Ser	Glu	Tyr	Glu	Leu	Pro
			340					345					350		
Glu	Asp	Pro	Lys	Trp	Glu	Phe	Pro	Arg	Asp	Lys	Leu	Thr	Leu	Gly	Lys
		355					360					365			
Pro	Leu	Gly	Glu	Gly	Cys	Phe	Gly	Gln	Val	Val	Met	Ala	Glu	Ala	Val
	370					375					380				
Gly	Ile	Asp	Lys	Asp	Lys	Pro	Lys	Glu	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Val	Lys
385					390					395					400
Met	Leu	Lys	Asp	Asp	Ala	Thr	Glu	Lys	Asp	Leu	Ser	Asp	Leu	Val	Ser
				405					410					415	
Glu	Met	Glu	Met	Met	Lys	Met	Ile	Gly	Lys	His	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn
			420					425					430		
Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Gln	Asp	Gly	Pro	Leu	Tyr	Val	Ile	Val	Glu
		435					440					445			
Tyr	Ala	Ser	Lys	Gly	Asn	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Arg	Ala	Arg	Arg	Pro
	450					455					460				
Pro	Gly	Met	Glu	Tyr	Ser	Tyr	Asp	Ile	Asn	Arg	Val	Pro	Glu	Glu	Gln
465					470					475					480
Met	Thr	Phe	Lys	Asp	Leu	Val	Ser	Cys	Thr	Tyr	Gln	Leu	Ala	Arg	Gly
				485					490					495	
Met	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Gln	Lys	Cys	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala
			500					505					510		
Arg	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Glu	Asn	Asn	Val	Met	Lys	Ile	Ala	Asp	Phe
		515					520					525			
Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Ile	Asn	Asn	Ile	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr
	530					535					540				
Asn	Gly	Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp
545					550					555					560
Arg	Val	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Met
				565					570					575	
Trp	Glu	Ile	Phe	Thr	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro	Tyr	Pro	Gly	Ile	Pro	Val
			580					585					590		
Glu	Glu	Leu	Phe	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	His	Arg	Met	Asp	Lys	Pro
		595					600					605			
Ala	Asn	Cys	Thr	Asn	Glu	Leu	Tyr	Met	Met	Met	Arg	Asp	Cys	Trp	His
	610					615					620				
Ala	Val	Pro	Ser	Gln	Arg	Pro	Thr	Phe	Lys	Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Leu
625					630					635					640
Asp	Arg	Ile	Leu	Thr	Leu	Thr	Thr	Asn	Glu	Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser
				645					650					655	
Gln	Pro	Leu	Glu	Gln	Tyr	Ser	Pro	Ser	Tyr	Pro	Asp	Thr	Arg	Ser	Ser
			660					665					670		
Cys	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Ser	Val	Phe	Ser	Pro	Asp	Pro	Met	Pro	Tyr
		675					680					685			
Glu	Pro	Cys	Leu	Pro	Gln	Tyr	Pro	His	Ile	Asn	Gly	Ser	Val	Lys	Thr
	690					695					700				

<210> 67
<211> 680
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 67

ES 2 755 505 T3

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

ES 2 755 505 T3

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

<210> 68
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 68

ES 2 755 505 T3

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

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

<210> 69
 <211> 317

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 69

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

5

<210> 70
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 70

10

ES 2 755 505 T3

Met	Val	Ser	Trp	Gly	Arg	Phe	Ile	Cys	Leu	Val	Val	Val	Thr	Met	Ala
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Leu	Val	Glu	Asp	Thr	Thr
			20					25					30		
Leu	Glu	Pro	Glu	Glu	Pro	Pro	Thr	Lys	Tyr	Gln	Ile	Ser	Gln	Pro	Glu
		35					40					45			
Val	Tyr	Val	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Glu	Val	Arg	Cys	Leu	Leu
	50					55					60				
Lys	Asp	Ala	Ala	Val	Ile	Ser	Trp	Thr	Lys	Asp	Gly	Val	His	Leu	Gly
65					70					75					80
Pro	Asn	Asn	Arg	Thr	Val	Leu	Ile	Gly	Glu	Tyr	Leu	Gln	Ile	Lys	Gly
				85					90					95	
Ala	Thr	Pro	Arg	Asp	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ala	Cys	Thr	Ala	Ser	Arg	Thr
			100					105						110	
Val	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Tyr	Phe	Met	Val	Asn	Val	Thr	Asp	Ala	Ile
	115						120					125			
Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Thr	Asp	Gly	Ala	Glu	Asp	Phe	Val
	130					135					140				
Ser	Glu	Asn	Ser	Asn	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Asn	Thr	Glu
145					150					155					160
Lys	Met	Glu	Lys	Arg	Leu	His	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Lys
				165					170					175	
Phe	Arg	Cys	Pro	Ala	Gly	Gly	Asn	Pro	Met	Pro	Thr	Met	Arg	Trp	Leu
			180					185						190	
Lys	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Gln	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Tyr	Lys
	195						200					205			
Val	Arg	Asn	Gln	His	Trp	Ser	Leu	Ile	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser
	210					215					220				
Asp	Lys	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Glu	Asn	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ile
225					230					235					240
Asn	His	Thr	Tyr	His	Leu	Asp	Val	Val	Gly	Glu	Ser	Ala	Ser	Pro	Arg
				245					250					255	
Val	Ala	Ala	Ala	Tyr	Gln	Pro	Ile	Leu	Ala						
			260					265							

<210> 71
 <211> 336
 5 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 71
 cagggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttgggtgaaac ctgggggcttc agtgaagata 60
 tcttgcaagg cttctggcta catcttcact gaccatgctc ttcactgggt gaggcagaag 120
 cctgaacagg gcoctggaatg gattgggtat atttttcccg gaaatggtaa tattgagtac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag tactgcctac 240
 atgcagctca acagcctgac atctggagat tctgcaatgt atttctgtaa aaagatggac 300
 tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tctctca 336

10 <210> 72
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 72

ES 2 755 505 T3

```

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

```

5 <210> 73
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

```

<400> 73
caggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60
tcttgcaagg cttctgggta caccttcact gaccattcta ttcactgggt gaagcagaag 120
cctggacagg gcctagaatg gattggatat ctttttcccc gaaatggtaa ttttgaatat 180
aatgagaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
atgcacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaagatggac 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tctctca 336

```

10 <210> 74
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

```

15 <400> 74
Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1           5           10           15
Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ser
           20           25           30
Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
           35           40           45
Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
           50           55           60
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met

           65           70           75           80
His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Lys
           85           90           95
Lys Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
           100           105           110

```

20 <210> 75
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 75

ES 2 755 505 T3

```

caggttcagc tgcagcagtc cgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
tcctgcaggg cttctggcta caccttcact gaccattcta ttcactgggt gaagcagcag 120
cctggccagg gcctggaatg gatcggatat attttcccg gaaatggaaa tattgaatac 180
aatgacaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccgg cactgcctac 240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaggatgggg 300
tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tectca 336

```

5 <210> 76
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

```

<400> 76
Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1          5          10          15
Val Lys Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ser
 20          25          30
Ile His Trp Val Lys Gln Gln Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35          40          45
Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Asp Lys Phe Lys
 50          55          60
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Gly Thr Ala Tyr Met
 65          70          75          80
Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Lys
 85          90          95
Arg Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
100          105          110

```

10 <210> 77
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

```

15 <400> 77
caggtaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact aactatgta tacactgggt gaagcaaaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ctctaagtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacatctc 300
gctaatacct actactactt tgactactgg ggccaagga ccacggtcac cgtctcctca 360

```

20 <210> 78
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 78

ES 2 755 505 T3

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Val
 20 25 30
 Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 50 55 60
 Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 79
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 79
 cagggtcaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttgggtgaaac ctgggggcttc agtgaagatc 60
 tcttgcaagg cttctggcta caccttcaact gaccattcta ttcactgggt gaagcagaag 120
 cctggacagg gcctagaatg gattggatat ctttttcccg gaaatggtaa ttttgagtac 180
 aatgaaaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgtctac 240
 atgtacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaggatgggg 300
 tactggggcc aagggaccac ggtcaccgctc tectca 336

10

<210> 80
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 80
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ser
 20 25 30
 Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 50 55 60
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met
 65 70 75 80
 Tyr Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Lys
 85 90 95
 Arg Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

20

<210> 81
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 81

ES 2 755 505 T3

```

gtgaagctgc aggagtctgg acctgaactg gtaaagcctg gggcttcagt gaagatgtcc 60
tgcaaggctt ctggatacac attcactaac tatgttatac actgggtgaa gcaaaagcct 120
gggcagggcc ttgagtggat tggatatatt aatccttaca atgatggctc taagtacaat 180
gagaagttca aaggcaaggc ctactgactc tcagacaaat cctccagcac agcctacatg 240
gagctcagca gcctgacctc tgaggactct gcggctctatt actgtgcaag acatctcgct 300
aatacctact actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca 357

```

5 <210> 82
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

```

<400> 82
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1           5           10           15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20           25           30
Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35           40           45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50           55           60
Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65           70           75           80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85           90           95
Ala Arg His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100           105           110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115           120

```

10 <210> 83
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

```

<400> 83
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatctc acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagggc cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttctc 300
cctacgttcc gtgctggggc caagctggag ctgaaacggg ct 342

```

20 <210> 84
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 84

ES 2 755 505 T3

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

5 <210> 85
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 85
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
 atcacatgtc gaacaactga aaatatttac agttattttg tatggtctca gcagagacag 120
 ggaaaatctc ctcagctccg ggtctataat gcaaaatcct tagcagaagg tgtgccatca 180
 agtttcaatg tcagtgtatc aggcacacag ttttctctga agatcaatag cctgcagcct 240
 gaagattttg ggacttatca ctgtcaacac cattatggta ctccgtacac gttcggaggg 300
 10 gggaccaggc tggaaataag acgg 324

15 <210> 86
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 86
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Thr Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 Phe Val Trp Ser Gln Gln Arg Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Arg Val
 35 40 45
 Tyr Asn Ala Lys Ser Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Ser Phe Asn Val
 50 55 60
 Ser Val Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Thr Tyr His Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Arg Arg
 100 105

20 <210> 87
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

ES 2 755 505 T3

<400> 87

```

gacattgtgc tgacacagtc tctgtcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60
atctcgtaca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggaac 120
caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct 180
ggggtccttg ccaggttcag tggcagtggg tctggggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattagggg gcttacacgt 300
tcggaggggg gcaccaagct ggaaatcaaa cggaga 336
    
```

<210> 88

5

<211> 112

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 88

10

```

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

<210> 89

15

<211> 327

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 89

```

gacatcaaga tgaccacagtc tccatcctcc atgtatgcat cgctggggaga gagagtcact 60
atcacttgca aggcgagtca ggacattaa agctatttaa gctggtacca gcagaaacca 120
tggaaatctc ctaagaccct gatctattat gcaacaagct tggcagatgg ggtcccatca 180
agattcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctaa ccatcagcag cctggagtct 240
gacgatacag caacttatta ctgtctacag catggtgaga gcccgtagac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaataaaa acgggct 327
    
```

20

<210> 90

<211> 108

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

25

<400> 90

ES 2 755 505 T3

```

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

```

5 <210> 91
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 91
 gatgttgtgc taactcagtc tctgtccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtcagt 60
 ctttcttgca gggccagcca aaatattggc aactacctac actggtatca acagaaatca 120
 catgagtctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatcccctcc 180
 aggttcagtg gcagtgatc agtcacagat ttcactctca atatcaacag tgtggagact 240
 gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtgacacct ggcctctcac gttcgggtgt 300

10 gggaccaagc tggagctgaa acgggct 327

15 <210> 92
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 92
 Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Asn Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Glu Thr
65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Thr Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

20 <210> 93
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 93

Thr Phe Thr Asp His Ser Ile His
 1 5

<210> 94
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 94
 Thr Phe Thr Asn Tyr Val Ile His
 1 5

10 <210> 95
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 95
 Ile Phe Thr Asp His Ala Leu His
 1 5

20 <210> 96
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 96
 Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Asp Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

30 <210> 97
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

35 <400> 97
 Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

40 <210> 98
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

45 <400> 98
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

50 <210> 99
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 99
 Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 100
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 100
 Lys Arg Met Gly Tyr
 1 5

 10 <210> 101
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 15 <400> 101

 Lys Lys Met Asp Tyr
 1 5

 20 <210> 102
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 102
 Ala Arg His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 25 1 5 10

 <210> 103
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> *Mus musculus*

 <400> 103
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

 35 <210> 104
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 40 <400> 104
 Arg Thr Thr Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Phe Val
 1 5 10

 <210> 105
 <211> 15
 <212> PRT
 45 <213> *Mus musculus*

 <400> 105
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10 15

 50 <210> 106
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 55 <400> 106

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Tyr Leu Ser
 1 5 10

5 <210> 107
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 107
 Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Asn Tyr Leu His
 1 5 10

10 <210> 108
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 108
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

20 <210> 109
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 109
 Asn Ala Lys Ser Leu Ala Glu
 1 5

30 <210> 110
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

35 <400> 110
 Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

40 <210> 111
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

45 <400> 111
 Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp
 1 5

50 <210> 112
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 112
 Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 1 5

<210> 113
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 113
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
 1 5

5 <210> 114
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 114
 Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr
 1 5

15 <210> 115
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 115
 Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg Ser
 1 5

20 <210> 116
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 116
 Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Phe Thr
 1 5

30 <210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 117
 Gln Gln Ser Asp Thr Trp Pro Leu Thr
 1 5

35 <210> 118
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 118
 Asp His Ala Leu His
 1 5

45 <210> 119
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

50 <400> 119
 Asp His Ser Ile His
 1 5

55 <210> 120
 <211> 5
 <212> PRT

<213> *Mus musculus*
 <400> 120
 Asn Tyr Val Ile His
 1 5
 5
 <210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 10
 <400> 121
 Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu
 1 5
 <210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 15
 <400> 122
 Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu
 1 5
 20
 <210> 123
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25
 <400> 123
 Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys
 1 5
 30
 <210> 124
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 35
 <400> 124
 His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 125
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 40
 <400> 125
 Ser Asn Gly Asn Thr
 1 5
 45
 <210> 126
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 50
 <400> 126
 Glu Asn Ile Tyr Ser
 1 5
 55
 <210> 127
 <211> 5
 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 127

Thr Ser Gly Tyr Ser
1 5

5

<210> 128

<211> 5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

10

<400> 128

Gln Asp Ile Lys Ser
1 5

<210> 129

<211> 5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

15

<400> 129

Gln Asn Ile Gly Asn
1 5

20

<210> 130

<211> 4654

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 130

```

ggcggcggct ggaggagagc gcggtggaga gccgagcggg cgggcggcgg gtgcggagcg 60
ggcgagggag cgcgcgcggc cgccacaaag ctcgggcgcc gcggggctgc atgcggcgta 120
cctggcccgg cgcggcgact gctctccggg ctggcggggg ccggccgcga gccccggggg 180
ccccgaggcc gcagcttgcc tgccgcctct gacccttcgc aactcgcgag caaagtttgg 240
tggaggcaac gccaaagcctg agtcctttct tcctctcgtt ccccaaatcc gagggcagcc 300
cgcggggcgtc atgcccgcgc tcctccgcag cctgggggtac gcgtgaagcc cgggaggctt 360
ggcgccggcg aagacccaag gaccactctt ctgcgtttgg agttgctccc cgcaaccccg 420
ggctcgtcgc tttctccatc ccgaccacag cggggcgcgg ggacaacaca ggtcgcggag 480
gagcgttgcc attcaagtga ctgcagcagc agcggcagcg cctcgggtcc tgagcccacc 540
gcaggctgaa ggcattgcgc gtagtccatg cccgtagagg aagtgtgcag atgggattaa 600
cgtccacatg gagatatgga agaggaccgg ggattggtac cgtaaccatg gtcagctggg 660
gtcgtttcat ctgcctggtc gtggtcacca tggcaacctt gtccctggcc cggccctcct 720
tcagtttagt tgaggatacc acattagagc cagaagagcc accaaccaaa taccaaatct 780
ctcaaccaga agtgtacgtg gctgcgccag gggagtcgct agaggtgcgc tgctgttga 840
aagatgccgc cgtgatcagt tggactaagg atgggggtgca cttggggccc aacaatagga 900
cagtgttat tggggagtac ttgcagataa agggcgccac gcctagagac tccggcctct 960
atgcttgtag tgccagtagg actgtagaca gtgaaacttg gtacttcatg gtgaatgtca 1020
cagatgccat ctcatccgga gatgatgagg atgacaccga tgggtgcggaa gattttgtca 1080
gtgagaacag taacaacaag agagcaccat actggacca cacaagaaa atggaaaagc 1140

```

ES 2 755 505 T3

ggctccatgc	tgtgcctgog	gccaacactg	tcaagtttgc	ctgcccagcc	ggggggaacc	1200
caatgccaac	catgcgggtg	ctgaaaaacg	ggaaggagtt	taagcaggag	catcgcattg	1260
gaggctacaa	ggtacgaaac	cagcactgga	gcctcattat	ggaaagtgtg	gtcccatctg	1320
acaaggghaa	ttatacctgt	gtagtggaga	atgaatacgg	gtccatcaat	cacacgtacc	1380
acctggatgt	tgtggagcga	tcgcctcacc	ggcccatcct	ccaagccgga	ctgccggcaa	1440
atgcctccac	agtggtcgga	ggagacgtag	agtttgtctg	caaggtttac	agtgatgccc	1500
agccccacat	ccagtggtac	aagcacgtgg	aaaagaacgg	cagtaaatac	gggcccagcg	1560
ggctgcctta	cctcaagggt	ctcaaggccg	ccggtgttaa	caccacggac	aaagagattg	1620
aggttctcta	tattcgggat	gtaacttttg	aggacgctgg	ggaatatacg	tgcttgggcg	1680
gtaattctat	tggtatatcc	tttcaactctg	catggttgac	agttctgcca	gcgctgggaa	1740
gagaaaagga	gattacagct	tccccagact	acctggagat	agccatttac	tgcatagggg	1800
tcttcttaat	cgctgtatg	gtggtaacag	tcctcctgtg	ccgaatgaag	aacacgacca	1860
agaagccaga	cttcagcagc	cagccggctg	tgcaacaagct	gaccaaactg	atccccctgc	1920
ggagacaggt	aacagtttgc	gctgagtcca	gctcctccat	gaactccaac	accccgtggt	1980
tgaggataac	aacacgcctc	tcttcaacgg	cagacacccc	catgctggca	ggggtctccg	2040
agtatgaact	tccagaggac	ccaaaatggg	agtttccaag	agataagctg	acactgggca	2100
agcccctggg	agaaggttgc	tttgggcaag	tggtcatggc	ggaagcagtg	ggaattgaca	2160
aagacaagcc	caaggaggcg	gtcaccgtgg	ccgtgaagat	gttgaaagat	gatgccacag	2220
agaaagacct	ttctgatctg	gtgtcagaga	tgagatgat	gaagatgatt	gggaaacaca	2280
agaatatcat	aaatcttctt	ggagcctgca	cacaggatgg	gcctctctat	gtcatagtgt	2340
agtatgcctc	taaaggcaac	ctccgagaat	acctccgagc	ccggaggcca	cccgggatgg	2400
agtactccta	tgacattaac	cgtgttctctg	aggagcagat	gaccttcaag	gacttggtgt	2460
catgcaccta	ccagctggcc	agaggcatgg	agtacttggc	ttccccaaaa	tgtattcatc	2520
gagatttagc	agccagaaat	gttttggtaa	cagaaaacaa	tgtgatgaaa	atagcagact	2580
ttggactcgc	cagagatata	aacaatatag	actattacaa	aaagaccacc	aatgggaggc	2640
ttccagtcaa	gtggatggct	ccagaagccc	tgtttgatag	agtatacact	catcagagtg	2700
atgtctggtc	cttcgggggtg	ttaatgtggg	agatcttcac	tttagggggc	tcgccctacc	2760
cagggattcc	cgtggaggaa	ctttttaagc	tgctgaagga	aggacacaga	atggataagc	2820
ccgccaactg	caccaacgaa	ctgtacatga	tgatgaggga	ctggtggcat	gcagctccct	2880
ccagagacc	aacgttcaag	cagttggtag	aagacttggg	tcgaattctc	actctcacia	2940
ccaatgagga	atacttggac	ctcagccaac	ctctogaaca	gtattcacct	agttaccctg	3000
acacaagaag	ttcttgttct	tcaggagatg	attctgtttt	ttctccagac	cccatgcctt	3060
acgaaccatg	ccttctctcag	tatccacaca	taaacggcag	tgttaaaaca	tgaatgactg	3120
tgtctgcctg	tccccaaaca	ggacagcact	gggaacctag	ctacactgag	cagggagacc	3180
atgcctccca	gagcttgttg	tctccacttg	tatatatgga	tcagaggagt	aaataattgg	3240
aaaagtaatc	agcatatgtg	taaagattta	tacagttgaa	aacttgtaat	cttccccagg	3300
aggagaagaa	ggtttctgga	gcagtggtact	gccacaagcc	accatgtaac	ccctctcacc	3360
tgccgtgcgt	actggctgtg	gaccagtagg	actcaagggtg	gacgtgcggt	ctgccttctt	3420
tgtaattttt	gtaataattg	gagaagattt	atgtcagcac	acacttacag	agcacaaatg	3480
cagtatatag	gtgctggatg	tatgtaataa	tattcaaat	atgtataaat	atatattata	3540
tatttacaag	gagttatttt	ttgtattgat	tttaaatgga	tgtcccaatg	cacctagaaa	3600
attggtctct	ctttttttaa	tagctatttg	ctaaatgctg	ttcttacaca	taatttctta	3660
atthttcaccg	agcagagggtg	gaaaaatact	tttgccttca	gggaaaatgg	tataacgtta	3720
atthattaat	aaattggtaa	tatacaaaac	aattaatcat	ttatagttht	ttttgtaatt	3780
taagtggcat	ttctatgcag	gcagcacagc	agactagtta	atctattgct	tggtactaac	3840
tagttatcag	atcctttgaa	aagagaatat	ttacaatata	tgactaattt	ggggaaaatg	3900
aagttttgat	ttatthtgtg	ttaaatgctg	ctgtcagacg	attgthctta	gacctcctaa	3960
atgccccata	ttaaaagaac	tcattcatag	gaagggtgtt	cattthtggg	tgcaaccctg	4020
tcattacgtc	aacgcaacgt	ctaactggac	ttcccaagat	aatgggtacc	agcgtcctct	4080
taaaagatgc	cttaatccat	tccttgagga	cagaccttag	ttgaaatgat	agcagaatgt	4140
gcttctctct	ggcagctggc	cttctgcttc	tgagttgcac	attaatcaga	ttagcctgta	4200
ttctctctcag	tgaattttga	taatggcttc	cagactcttt	ggcgttggag	acgctgtgta	4260
ggatcttcaa	gtcccacat	agaaaattga	aacacagagt	tgthctgctg	atagthttgg	4320
gatccagcct	atctthttta	gggattgctt	tcacttaatt	ctggcaggac	ctcaccaaaa	4380
ttgtgttttg	ctthtggaaac	accactcac	tttgcaatag	gttctctctg	tactaaagta	4440
ttacactgat	cttatgtgtt	acaaaattgg	agaaagtatt	ccgtgcaaga	tgaatgcaga	4500
tatactgaca	ataaaaatgt	ttctacagat	attaatgtta	taataaaacc	tgthtaatttt	4560
cgcaacttat	ttthtttaata	aaaaaaaaaa	aaaa	acaagacaaa	ataaatgtca	4620
						4654

<210> 131
<211> 4657
<212> ADN
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 131

ggcggcggct	ggaggagagc	gcggtggaga	gccgagcggg	cgggcggcgg	gtgcggagcg	60
ggcaggggag	cgcgcgcggc	cgccacaaag	ctcgggcgcc	gcggggctgc	atgcggcgta	120
cctggccccg	cgcggcgact	gctctccggg	ctggcggggg	ccggccgcga	gccccggggg	180
ccccgaggcc	gcagcttgcc	tgcgcgctct	gagccttcgc	aactcgcgag	caaagtttgg	240
tggaggcaac	gccaagcctg	agtcctttct	tctctcgtt	ccccaaatcc	gagggcagcc	300
cgcgggcgtc	atgcccgcgc	tctccgcgag	cctgggggtac	gcgtgaagcc	cgggaggctt	360
ggcgccggcg	aagacccaag	gaccactctt	ctgcgttttg	agttgctccc	cgcaaccccc	420
ggctcgtcgc	tttctccatc	ccgaccacag	cggggcgcg	ggacaacaca	ggtcgcggag	480
gagcgttgcc	attcaagtga	ctgcagcagc	agcggcagcg	cctcggttcc	tgagcccacc	540
gcaggctgaa	ggcattgcgc	gtagtccatg	cccgtagagg	aagtgtgcag	atgggattaa	600
cgtccacatg	gagatatgga	agaggaccgg	ggattgggtac	cgtaaccatg	gtcagctggg	660
gtcgtttcat	ctgcctggtc	gtggtcacca	tggcaacctt	gtccctggcc	cggccctcct	720
tcagtttagt	tgaggatacc	acattagagc	cagaagagcc	accaaccaa	taccaaactc	780
ctcaaccaga	agtgtacgtg	gctgcgccag	gggagtcgct	agaggtgcgc	tgctgtttga	840
aagatgccgc	cgtgatcagt	tggactaagg	atgggggtgca	cttggggccc	aacaatagga	900
cagtgccttat	tggggagtac	ttgcagataa	agggcgccac	gcctagagac	tccggcctct	960
atgcttgtac	tgccagtagg	actgtagaca	gtgaaacttg	gtacttcatg	gtgaatgtca	1020
cagatgccat	ctcatccgga	gatgatgagg	atgacaccga	tggtgcggaa	gattttgtca	1080
gtgagaacag	taacaacaag	agagcaccat	actggaccaa	cacagaaaag	atggaaaagc	1140
ggctccatgc	tgtgcctgcg	gccaacactg	tcaagtttog	ctgccagacc	ggggggaacc	1200
caatgccaac	catgcggtgg	ctgaaaaacg	ggaaggagtt	taagcaggag	catcgcattg	1260
gaggctacaa	ggtacgaaac	cagcactgga	gcctcattat	ggaaagtgtg	gtcccattctg	1320
acaagggaaa	ttatacctgt	gtagtggaga	atgaatacgg	gtccatcaat	cacacgtacc	1380
acctggatgt	tgtggagcga	tcgcctcacc	ggcccatcct	ccaagccgga	ctgccggcaa	1440
atgcctccac	agtggtcgga	ggagacgtag	agtttgtctg	caaggtttac	agtgatgccc	1500
agccccacat	ccagtggatc	aagcacgtgg	aaaagaacgg	cagtaaatac	gggcccagcg	1560
ggctgcctta	cctcaaggtt	ctcaagcact	cggggataaa	tagttccaat	gcagaagtgc	1620
tggctctggt	caatgtgacc	gaggcggatg	ctggggaata	tatatgtaag	gtctccaatt	1680
atatagggca	ggccaaccag	tctgcctggc	tcactgtcct	gccaaaacag	caagcgcctg	1740
gaagagaaaa	ggagattaca	gcttccccag	actacctgga	gatagccatt	tactgcatag	1800
gggtcttctt	aatgcctgtg	atgggtgtaa	cagtcactct	gtgccgaatg	agaacacoga	1860
ccaagaagcc	agacttcagc	agccagccgg	ctgtgcacaa	gctgaccaa	cgtatcccc	1920
tgcgagagaca	ggtaacagtt	tcggctgagt	ccagctctct	catgaactcc	aacaccccgc	1980
tggtgaggat	aacaacacgc	ctctcttcaa	cggcagacac	ccccatgctg	gcaggggtct	2040
ccgagtatga	acttccagag	gacccaaaat	gggagtttcc	aagagataag	ctgacactgg	2100
gcaagcccct	gggagaagg	tgccttgggc	aagtggatcat	ggcggaagca	gtgggaattg	2160
acaagacaaa	gccaaggag	gcggtcaccg	tggccgtgaa	gatgttgaaa	gatgatgcca	2220
cagagaaaga	cctttctgat	ctgggtgcag	agatggagat	gatgaagatg	attgggaaac	2280
acaagaatat	cataaatctt	cttggagcct	gcacacagga	tgggcctctc	tatgtcatag	2340
ttgagtatgc	ctctaaaggc	aacctccgag	aatacctcgc	agcccggagg	ccacccggga	2400
tggagtactc	ctatgacatt	aaccgtgttc	ctgaggagca	gatgaccttc	aaggacttgg	2460
tgtcatgcac	ctaccagctg	gccagaggca	tggagtactt	ggcttcccaa	aaatgtattc	2520
atcgagattt	agcagccaga	aatgttttgg	taacagaaaa	caatgtgatg	aaaatagcag	2580
actttggact	cgccagagat	atcaacaata	tagactatta	caaaaagacc	accaatgggc	2640
ggcttccagt	caagtggatg	gctccagaag	ccctgtttga	tagagtatac	actcatcaga	2700
gtgatgtctg	gtccttcggg	gtgttaaatg	gggagatctt	cactttaggg	ggctcgcctt	2760
accagggat	tcccgtggag	gaacttttta	agctgctgaa	ggaaggacac	agaatggata	2820
agccagcoaa	ctgcaccaac	gaactgtaca	tgatgatgag	ggactgttgg	catgcagtgc	2880
cctcccagag	accaacgttc	aagcagttgg	tagaagaact	ggatcgaatt	ctcactctca	2940
caaccaatga	ggaataactg	gacctcagcc	aacctctoga	acagtattca	cctagttacc	3000
ctgacacaag	aagttcttgg	tcttcaggag	atgattctgt	ttttctoca	gaccccatgc	3060
cttacgaacc	atgccttctt	cagtatccac	acataaacgg	cagtgttaaa	acatgaatga	3120
ctgtgtctgc	ctgtccccaa	acaggacagc	actgggaacc	tagctacact	gagcagggag	3180
accatgcctc	ccagagcttg	ttgtctccac	ttgtatata	ggatcagagg	agtaataaat	3240
tggaaaagta	atcagcatat	gtgtaaagat	ttatacagtt	gaaaacttgg	aatcttcccc	3300
aggaggagaa	gaaggtttct	ggagcagtg	actgccacaa	gccaccatgt	aaccctctc	3360

ES 2 755 505 T3

```

acctgccgtg cgtactggct gtggaccagt aggactcaag gtggacgtgc gttctgcctt 3420
ccttgtaaat tttgtaataa ttggagaaga tttatgtcag cacacactta cagagcacia 3480
atgcagtata taggtgctgg atgtatgtaa atatattcaa attatgtata aatataatatt 3540
atatatttac aaggagttat tttttgtatt gattttaaat ggatgtocca atgcacctag 3600
aaaattggtc tctctttttt taatagctat ttgctaaatg ctgttcttac acataatttc 3660
ttaattttca ccgagcagag gtggaaaaat acttttgctt tcagggaaaa tggataaacg 3720
ttaatttatt aataaattgg taatatacaa aacaattaat catttatagt tttttttgta 3780
atttaagtgg catttctatg caggcagcac agcagactag ttaatctatt gcttggactt 3840
aactagttat cagatccttt gaaaagagaa tatttacaat atatgactaa tttggggaaa 3900
atgaagtttt gatttatttg tgtttaaatg ctgctgtcag acgattgttc ttagacctcc 3960
taaatgcccc atattaaaag aactcattca taggaaggtg tttcattttg gtgtgcaacc 4020
ctgtcattac gtcaacgcaa cgtctaactg gacttcccaa gataaatggg accagcgtcc 4080
tcttaaaaga tgccttaate cattccttga ggacagacct tagttgaaat gatagcagaa 4140
tgtgcttctc tctggcagct ggccttctgc ttctgagttg cacattaatc agattagcct 4200
gtattctctt cagtgaattt tgataatggc ttccagactc tttggcgttg gagacgcctg 4260
ttaggatctt caagtcccat catagaaaat tgaaacacag agttgttctg ctgatagttt 4320
tggggatagc tccatctttt taagggattg ctttcatcta attctggcag gacctcacca 4380
aaagatccag cctcatacct acatcagaca aaatatcgcc gttgttcctt ctgtactaaa 4440
gtattgtggt ttgctttgga aacaccact cactttgcaa tagccgtgca agatgaatgc 4500
agattacact gatcttatgt gttacaaaat tggagaaagt atttaataaa acctgttaat 4560
ttttatactg acaataaaaa tgtttctaca gatattaatg ttaacaagac aaaataaatg 4620
tcacgcaact tattttttta ataaaaaaaa aaaaaaaa 4657

```

<210> 132
 <211> 2781
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 132

tgactgcagc	agcagcggca	gcgccctcggg	tcctgagccc	accgcaggct	gaaggcattg	60
cgcgtagtcc	atgcccgtag	aggaagtgtg	cagatgggat	taacgtccac	atggagatat	120
ggaagaggac	cggggattgg	taccgtaacc	atggtcagct	ggggtcgttt	catctgcctg	180
gtcgtggtca	ccatggcaac	cttgtccctg	gcccgccct	ccttcagttt	agttgaggat	240
accacattag	agccagaaga	gccaccaacc	aaataccaaa	tctctcaacc	agaagtgtac	300
gtggctgcmc	caggggagtc	gctagagggtg	cgctgcctgt	tgaaagatgc	cgccgtgatc	360
agttggacta	aggatggggg	gcacttgggg	cccaacaata	ggacagtgtc	tattggggag	420
tacttgcaga	taaagggcgc	cacgcctaga	gactccggcc	tctatgcttg	tactgccagt	480
aggactgtag	acagtgaaac	ttggctacttc	atgggtgaatg	tcacagatgc	catctcatcc	540
ggagatgatg	aggatgcacac	cgatgggtgcg	gaagattttg	tcagtgagaa	cagtaacaac	600
aagagagcac	catactggac	caacacagaa	aagatggaaa	agcggctcca	tgctgtgcct	660
gcgcccaaca	ctgtcaagtt	tcgctgcccc	gccgggggga	acccaatgcc	aaccatgcgg	720
tggtgaaaa	acgggaagga	gtttaagcag	gagcatcgca	ttggaggcta	caaggtacga	780
aaccagcact	ggagcctcat	tatggaaagt	gtggctccat	ctgacaaggg	aaattatacc	840
tgtgtagtgg	agaatgaata	cgggtccatc	aatcacacgt	accacctgga	tgttgtggag	900
cgatcgcctc	accggcccat	cctccaagcc	ggactgccgg	caaatgcctc	cacagtggtc	960
ggaggagacg	tagagtttgt	ctgcaagggt	tacagtgatg	cccagcccc	catccagtgg	1020
atcaagcacg	tggaaaagaa	cggcagtaaa	tacgggcccc	acgggctgcc	ctacctcaag	1080
gttctcaagc	actcggggat	aaatagttcc	aatgcagaag	tgctggctct	gttcaatgtg	1140
accgagggcg	atgctgggga	atatatatgt	aaggctctcca	attatatagg	gcaggccaac	1200
cagtctgcct	ggctcactgt	cctgccccaa	cagcaagcgc	ctggaagaga	aaaggagatt	1260
acagcttccc	cagactacct	ggagatagcc	atttactgca	taggggtctt	cttaatcgcc	1320
tgtatggtgg	taacagtcac	cctgtgcccga	atgaagaaca	cgaccaagaa	gccagacttc	1380
agcagccagc	cggctgtgca	caagctgacc	aaacgtatcc	cctgcccggag	acaggtaaca	1440
gtttcggctg	agtccagctc	ctccatgaac	tccaacaccc	cgctgggtgag	gataacaaca	1500
cgctctctct	caacggcaga	cacccccatg	ctggcagggg	tctccgagta	tgaacttcca	1560
gaggacccaa	aatgggagtt	tccaagagat	aagctgcacac	tgggcaagcc	cctgggagaa	1620
ggttgctttg	ggcaagtggg	catggcggaa	gcagtgggaa	tgacaaaaga	caagcccaag	1680
gaggcgggtca	ccgtggccgt	gaagatggtg	aaagatgatg	ccacagagaa	agacctttct	1740
gatctggtgt	cagagatgga	gatgatgaag	atgattggga	aacacaagaa	tatcataaat	1800
cttcttggag	cctgcacaca	ggatgggcct	ctctatgtca	tagttgagta	tgctctaaa	1860
ggcaacctcc	gagaatacct	ccgagcccgg	aggccaccgg	ggatggagta	ctcctatgac	1920
attaaccgtg	ttcctgagga	gcagatgacc	ttcaaggact	tggtgtcatg	cacctaccag	1980
ctggccagag	gcatggagta	cttggcttcc	caaaaatgta	ttcatcgaga	tttagcagcc	2040
agaaatgttt	tggtaacaga	aaacaatgtg	atgaaaatag	cagactttgg	actcgccaga	2100
gatatcaaca	atatagacta	ttacaaaaag	accaccaatg	ggcggcttcc	agtcaagtgg	2160
atggctccag	aagccctggt	tgatagagta	tacactcatc	agagtgatgt	ctggctcttc	2220
ggggtgttaa	tgtgggagat	cttcaactta	gggggctcgc	cctaccaggg	gattcccgtg	2280
gaggaacttt	ttaagctgct	gaaggaagga	cacagaatgg	ataagccagc	caactgcacc	2340
aacgaactgt	acatgatgat	gagggactgt	tggcatgcag	tgccctcca	gagaccaacg	2400
ttcaagcagt	tggtagaaga	cttggatcga	attctcactc	tcacaaccaa	tgagatctga	2460
aagtttatgg	cttcattgag	aaactgggaa	aagttgggtca	ggcgcagtgg	ctcatgcctg	2520
taatcccagc	actttgggag	gccgagggcag	gcggtatcatg	aggtcaggag	ttccagacca	2580
gcctggccaa	catggtgaaa	ccctgtctct	actaaagata	caaaaaatta	gccgggcgtg	2640
ttgggtgtgca	cctgtaatcc	cagctactcc	gggaggctga	ggcaggagag	tcacttgaac	2700
cggggaggcg	gaggttgacg	tgagccgaga	tcatgccatt	gcattccagc	cttggcgaca	2760
gagcgagact	ccgtctcaaa	a				2781

<210> 133
 <211> 3821
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 133

tgactgcagc	agcagcggca	gcgccctcgg	tccctgagccc	accgcaggct	gaaggcattg	60
cgcgtagtcc	atgcccgtag	aggaagtgtg	cagatgggat	taacgtccac	atggagatat	120
ggaagaggac	cggggattgg	taccgtaacc	atggtcagct	ggggtcgttt	catctgcctg	180
gtcgtggca	ccatggcaac	cttgtccctg	gcccggccct	ccttcagttt	agttgaggat	240
accacattag	agccagaaga	gccaccaacc	aaataccaaa	tctctcaacc	agaagtgtac	300
gtggctgcgc	caggggagtc	gctagagggtg	cgctgcctgt	tgaaagatgc	cgccgtgatc	360
agttggacta	aggatggggg	gcacttgggg	cccaacaata	ggacagtgtc	tattggggag	420
tacttgcaga	taaagggcgc	cacgcctaga	gactccggcc	tctatgcttg	tactgccagt	480
aggactgtag	acagtgaaac	ttggctactc	atgggtgaatg	tcacagatgc	catctcatcc	540
ggagatgatg	aggatgacac	cgatgggtgcg	gaagattttg	tcagtgagaa	cagtaacaac	600
aagagagcac	catactggac	caacacagaa	aagatggaaa	agcggctcca	tgctgtgcct	660
gcgcccaaca	ctgtcaagtt	tcgctgccca	gcccggggga	acccaatgcc	aacctatgcg	720
tggctgaaaa	acgggaagga	gtttaagcag	gagcatcgca	ttggaggcta	caaggtagca	780
aaccagcact	ggagcctcat	tatggaaagt	gtggctccat	ctgacaaggg	aaattatacc	840
tgtgtagtgg	agaatgaata	cggttccatc	aatcacacgt	accacctgga	tgttgtggcg	900
cctggaagag	aaaaggagat	tacagcttcc	ccagactacc	tggagatagc	catttactgc	960
ataggggtct	tcttaatcgc	ctgtatgggtg	gtaacagtca	tccctgtgccg	aatgaagaac	1020
acgaccaaga	agccagactt	cagcagccag	ccggctgtgc	acaagctgac	caaacgtatc	1080
cccctgcgga	gacaggtaac	agtttcggct	gagtccagct	cctccatgaa	ctccaacacc	1140
ccgctggtga	ggataacaac	acgcctctct	tcaacggcag	acacccccat	gctggcaggg	1200
gtctccgagt	atgaacttcc	agaggaccca	aaatgggagt	ttccaagaga	taagctgaca	1260
ctgggcaagc	ccctgggaga	aggttgcttt	gggcaagtgg	tcatggcgga	agcagtggga	1320
attgacaaag	acaagcccaa	ggaggcggtc	accgtggccg	tgaagatggt	gaaagatgat	1380
gccacagaga	aagaccttcc	tgatctgggtg	tcagagatgg	agatgatgaa	gatgattggg	1440
aaacacaaga	atatcataaa	tcttcttggg	gcctgcacac	aggatggggc	tctctatgtc	1500
atagttgagt	atgcctctaa	aggcaacctc	cgagaatacc	tccgagcccg	gaggccacc	1560
gggatggagt	actcctatga	cattaaccgt	gttctctgagg	agcagatgac	cttcaaggac	1620
ttgggtgcat	gcacctacca	gctggccaga	ggcatggagt	acttggcttc	ccaaaaatgt	1680
attcatcgag	athtagcagc	cagaaatggt	ttggtaacag	aaaacaatgt	gatgaaaata	1740
gcagactttg	gactcgccag	agatatcaac	aatatagact	attacaaaaa	gaccaccaat	1800
gggcggttc	cagtcaagtg	gatggctcca	gaagccctgt	ttgatagagt	atacactcat	1860
cagagtgatg	tctggctcct	cgggggtgta	atgtgggaga	tcttcacttt	agggggctcg	1920
ccctaccag	ggattcccgt	ggaggaactt	tttaagctgc	tgaaggaagg	acacagaatg	1980
gataagccag	ccaactgcac	caacgaactg	tacatgatga	tgagggactg	ttggcatgca	2040
gtgccctccc	agagaccaac	gttcaagcag	ttggtagaag	acttggatcg	aattctcact	2100
ctcacaacca	atgaggaata	cttggacctc	agccaacctc	tcgaacagta	ttcacctagt	2160
taccctgaca	caagaagttc	ttgttcttca	ggagatgatt	ctgttttttc	tccagacccc	2220
atgccttacg	aacctatgct	tccctcagtat	ccacacataa	acggcagtgt	taaacatgca	2280
atgactgtgt	ctgcctgtcc	ccaaacagga	cagcactggg	aacctagcta	cactgagcag	2340

ES 2 755 505 T3

```

ggagaccatg cctcccagag cttgttgtct ccacttgtat atatggatca gaggagtaaa 2400
taattggaaa agtaatcagc atatgtgtaa agatttatac agttgaaaac ttgtaatctt 2460
ccccaggagg agaagaaggt ttctggagca gtggactgcc acaagccacc atgtaacccc 2520
tctcacctgc cgtgcgtact ggctgtggac cagtaggact caaggtggac gtgcgttctg 2580
ccttccttgt taatthttgta ataattggag aagatttatg tcagcacaca cttacagagc 2640
acaaatgcag tatataggtg ctggatgtat gtaaataat tcaaattatg tataaatata 2700
tattatataat ttacaaggag ttatthtttg tattgatttt aatggatgt cccaatgcac 2760
ctagaaaatt ggtctctctt thtttaatag ctatthtgcta aatgctgttc ttacacataa 2820
thttcttaatt thcaccgagc agaggtggaa aaatacttht gctthtcaggg aaaatggat 2880
aacgttaatt tattaataaa ttggtaatat acaaaaacaat taatcattta tagthtttht 2940
tgtaatthta gtggcattthc tatgcaggca gcacagcaga ctagttaatc tattgctthg 3000
acttaactag thatcagatc cthtgaaaag agaatathta caataatga ctaatthggg 3060
gaaaatgaag thttgattta thtgthgtta aatgctgctg tcagacgatt gthctthtag 3120
ctcctaaatg ccccatatta aaagaactca thcataggaa ggtgthtcat thtggtgtgc 3180
aacctgtca thacgtcaac gcaacgtcta actggacttc ccaagataaa tggtagcagc 3240
gtcctcttaa aagatgcctt aatccattcc thgaggacag acctagthg aaatgatagc 3300
agaatgtgct tctctctggc agctggcctt ctgctctga gthgcacatt aatcagatta 3360
gcctgtatthc ththcagthg atthtgataa thgctthccag actctthggc gthggagacg 3420
cctgthtagga ththcaagthc ccatcataga aaatthgaaac acagagthgt thtgctgata 3480
gththgggga thcgtccatc ththtaaggg atthgctthca thtaattctg gcaggacctc 3540
acaaaagat ccagcctcat acctacatca gacaaaatat cgccgthgtt cthctctgtac 3600
taaagtattg thththgctt thgaaacacc cactcactth gcaatagccg thcaagatga 3660
atgcagatta cactgatctt atgtgttaca aaatthggaga aagtatthta thaaacctgt 3720
taatththtact actgacaata aaaatgthtc tacagatatt aatgthtaaca agacaaaata 3780
aatgtcacgc aactththtt thtaataaaa aaaaaaaaaa a 3821

```

<210> 134
 <211> 3708
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 134

ES 2 755 505 T3

aatttggtga	ggaatttccc	cctagccttg	accccttgac	agctcccgct	cctactcagt	60
gctggggaga	agtagggagg	ccttaagcga	agagatgggt	ctgcactttg	gaggagccgg	120
acactggtga	ctttcctgat	gtgaaatcta	cccaggaaca	aaacaccagt	gactgcagca	180
gcagcggcag	cgctcgggtt	cctgagccca	ccgcaggctg	aaggcattgc	gcgtagtcca	240
tgcccgtaga	ggaagtgtgc	agatgggatt	aacgtccaca	tggagatatg	gaagaggacc	300
ggggattggt	accgtaacca	tggtcagctg	gggtcgtttc	atctgcctgg	tcgtgggtcac	360
catggcaacc	ttgtccctgg	cccggccctc	cttcagttta	gttgaggata	ccacattaga	420
gccagaagat	gccatctcat	ccggagatga	tgaggatgac	accgatgggt	cggaagattt	480
tgtcagtgag	aacagtaaca	acaagagagc	accatactgg	accaacacag	aaaagatgga	540
aaagcggctc	catgctgtgc	ctgcgcccaa	cactgtcaag	tttcgctgcc	cagccggggg	600
gaacccaatg	ccaacatgc	ggtggctgaa	aaacgggaag	gagtttaagc	aggagcatcg	660
cattggaggc	tacaaggtac	gaaaccagca	ctggagcctc	attatggaaa	gtgtgggtccc	720
atctgacaag	ggaaattata	cctgtgtagt	ggagaatgaa	tacgggtcca	tcaatcacac	780
gtaccacctg	gatgtttgtg	agcgatcgcc	tcaccggccc	atcctccaag	ccggactgcc	840
ggcaaatgcc	tccacagtgg	tcggaggaga	cgtagagttt	gtctgcaagg	tttacagtga	900
tgcccagccc	cacatccagt	ggatcaagca	cgtaggaaaag	aacggcagta	aatacgggccc	960
cgacgggctg	ccctacctca	aggttctcaa	ggccgcccgt	gttaacacca	cggacaaaaga	1020
gattgagggt	ctctatattc	ggaatgtaac	ttttgaggac	gctggggaat	atacgtgctt	1080
ggcgggtaat	tctattggga	tatcctttca	ctctgcatgg	ttgacagttc	tgccagcgcc	1140
tggaagagaa	aaggagatta	cagcttcccc	agactacctg	gagatagcca	tttactgcat	1200
aggggtcttc	ttaatcgect	gtatgggtgt	aacagtcatc	ctgtgccgaa	tgaagaacac	1260
gaccaagaag	ccagacttca	gcagccagcc	ggctgtgcac	aagctgacca	aacgtatccc	1320
cctgcggaga	caggtaacag	tttcggctga	gtccagctcc	tccatgaact	ccaacacccc	1380
gctggtgagg	ataacaacac	gcctctcttc	aacggcagac	acccccatgc	tgccaggggt	1440
ctccgagtat	gaacttccag	aggacccaaa	atgggagttt	ccaagagata	agctgacact	1500
gggcaagccc	ctgggagaag	gttgctttgg	gcaagtggtc	atggcgggaag	cagtggggaat	1560
tgacaaagac	aagcccaagg	aggcggtcac	cgtggccgtg	aagatggtga	aagatgatgc	1620
cacagagaaa	gacctttctg	atctggtgtc	agagatggag	atgatgaaga	tgattgggaa	1680
acacaagaat	atcataaatc	ttcttgagac	ctgcacacag	gatgggcctc	tctatgtcat	1740

ES 2 755 505 T3

```

agttgagtat gcctctaaag gcaacctccg agaatacctc cgagcccgga ggcacccgg 1800
gatggagtac tcctatgaca ttaaccgtgt tcctgaggag cagatgacct tcaaggactt 1860
ggtgtcatgc acctaccagc tggccagagg catggagtac ttggcttccc aaaaatgtat 1920
tcatcgagat ttagcagcca gaaatgtttt ggtaacagaa aacaatgtga tgaaaatagc 1980
agactttgga ctgcaccagag atatcaacia tatagactat tacaaaaaga ccaccaatgg 2040
gcggcttcca gtcaagtgga tggctccaga agccctgttt gatagagtat acactcatca 2100
gagtgatgtc tggctcctcg ggggtgtaat gtgggagatc ttcactttag ggggctcgcc 2160
ctaccagggg attcccgtgg aggaactttt taagctgctg aaggaaggac acagaatgga 2220
taagccagcc aactgcacca acgaactgta catgatgatg agggactggt ggcattgagt 2280
gcctcccag agaccaacgt tcaagcagtt ggtagaagac ttggatcgaa ttctcactct 2340
cacaaccaat gaggaggaga agaaggtttc tggagcagtg gactgccaca agccaccatg 2400
taaccctct cacctgccgt gcgtactggc tgtggaccag taggactcaa ggtggacgtg 2460
cgttctgcct tccttggtta ttttgtaata attggagaag atttatgtca gcacacactt 2520
acagagcaca aatgcagtat ataggtgctg gatgtatgta aatatattca aattatgtat 2580
aaatatatat tatatattta caaggagtta tttttgtat tgattttaaa tggatgtccc 2640
aatgcaccta gaaaattggt ctctcttttt ttaatagcta ttgctaaat gctgttctta 2700
cacataattt ctttaatttc accgagcaga ggtggaaaaa tacttttgct ttcagggaaa 2760
atggtataac gtttaattat taataaattg gtaatataca aaacaattaa tcatttatag 2820
ttttttttgt aatttaagtg gcatttctat gcaggcagca cagcagacta gttaatctat 2880
tgcttggact taactagtta tcagatcctt tgaaaagaga atatttacia tatatgacta 2940
atltggggaa aatgaagttt tgatttattt gtgtttaaat gctgctgtca gacgattggt 3000
cttagacctc ctaaattgcc catattaaaa gaactcattc ataggaaggt gtttcatttt 3060
ggtgtgcaac cctgtcatta cgtcaacgca acgtctaact ggacttccca agataaatgg 3120
taccagcgtc ctcttaaaag atgccttaat ccattccttg aggacagacc ttagttgaaa 3180
tgatagcaga atgtgcttct ctctggcagc tggccttctg cttctgagtt gcacattaat 3240
cagattagcc tgtattctct tcagtgaatt ttgataatgg cttccagact ctttggcggt 3300
ggagacgcct gttaggatct tcaagtccca tcatagaaaa ttgaaacaca gaggttgtct 3360
gctgatagtt ttggggatac gtccatcttt ttaagggatt gctttcatct aattctggca 3420
ggacctcacc aaaagatcca gcctcatacc tacatcagac aaaatatcg cgttgttct 3480
tctgtactaa agtattgtgt tttgctttgg aaacaccac tcactttgca atagccgtgc 3540
aagatgaatg cagattacac tgatcttatg tgttacaaaa ttggagaaag tatttaataa 3600
aacctgttaa tttttatact gacaataaaa atgtttctac agatattaat gttacaaga 3660
caaaataaat gtcacgcaac ttattttttt aataaaaaaa aaaaaaaa 3708

```

<210> 135
<211> 4103
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 135

ES 2 755 505 T3

```

gagcacacat tgcctcactg aagtggctgc acgtatctga gtccctgtagc tactgtttta 60
tctctgtttc ttaaaagtat gcttttaaaa agattagcct cacacatttc tgtggaccgg 120
tctggtggta tcacctggga ctctgaggtg aggatggaag gatttagcag ataatgaaaa 180
agaactctgt ttgcgcacat ttgagaggct gaaaaatggt tttatcccac ttgggctgga 240
gtgatttggc attggggaag attccctgac tcgccaatct ctttcottta gtgactgcag 300
cagcagcggc agegcctcgg ttccctgagcc caccgcaggc tgaaggcatt gcgcgtagtc 360
catgcccgta gaggaagtgt gcagatggga ttaacgtcca catggagata tggaagagga 420
ccggggattg gtaccgtaac catggtcagc tggggtcggt tcatctgcct gtcgctggtc 480
accatggcaa ccttgccctt ggcccggcc tccttcagtt tagttgagga taccacatta 540
gagccagaag gagcaccata ctggaccaac acagaaaaga tggaaaagcg gctccatgct 600
gtgcctgcgg ccaacactgt caagtttcgc tgcccagccg gggggaacc aatgccaacc 660
atgcggtggc tgaaaaacgg gaaggagttt aagcaggagc atcgcattgg aggctacaag 720
gtacgaaacc agcactggag cctcattatg gaaagtgtgg tcccatctga caagggaaat 780
tatacctgtg tagtgagaaa tgaatacggg tccatcaatc acacgtacca cctggatggt 840
gtggagcgat cgcctcaccg gcccatcctc caagccggac tgccggcaaa tgcctccaca 900
gtggtcggag gagacgtaga gtttgtctgc aaggtttaca gtgatgcca gccccacatc 960
cagtggatca agcacgtgga aaagaacggc agtaaatacg ggcccgaagg gctgccctac 1020
ctcaaggttc tcaaggccgc cgggtgtaac accacggaca aagagattga gtttctctat 1080
attcggaatg taacttttga ggacgctggg gaatatacgt gcttggcggg taattctatt 1140
gggatatcct ttcactctgc atggttgaca gttctgccag cgctggaag agaaaaggag 1200
attacagctt cccagacta cctggagata gccatttact gcataggggt cttcttaatc 1260

```

gcctgtatgg tggtaacagt catcctgtgc cgaatgaaga acacgaccaa gaagccagac 1320
 ttcagcagcc agccggtgtg gcacaagctg accaaacgta tccccctgcy gagacaggta 1380
 acagtttcgg ctgagtcacag ctccctccatg aactccaaca ccccgctggt gaggataaca 1440
 acacgcctct cttcaacggc agacaccccc atgctggcag gggctccga gtatgaactt 1500
 ccagaggacc caaaatggga gttccaaga gataagctga cactgggcaa gccctggga 1560
 gaaggttgct ttgggcaagt ggtcatggcg gaagcagtgg gaattgacaa agacaagccc 1620
 aaggaggcgg tcaccgtggc cgtgaagatg ttgaaagatg atgccacaga gaaagacctt 1680
 tctgatctgg tgtcagagat ggagatgatg aagatgattg ggaaacacaa gaatatcata 1740
 aatcttcttg gagcctgcac acaggatggg cctctctatg tcatagttga gtatgcctct 1800
 aaaggcaacc tccgagaata cctccgagcc cggaggccac ccgggatgga gtactcctat 1860
 gacattaacc gtgttcctga ggagcagatg accttcaagg acttggtgtc atgcacctac 1920
 cagctggcca gaggcattgga gtacttggct tccccaaaat gtattcatcg agatttagca 1980
 gccagaaatg ttttggtaac agaaaacaat gtgatgaaaa tagcagactt tggactcgcc 2040
 agagatatca acaatataga ctattacaaa aagaccacca atgggcyggt tccagtcaag 2100
 tggatggctc cagaagccct gtttgataga gtatacactc atcagagtga tgtctggtcc 2160
 ttcgggggtg taatgtggga gatcttctact ttagggggct cggcctaccc agggattccc 2220
 gtggaggaac tttttaagct gctgaaggaa ggacacagaa tggataagcc agccaactgc 2280
 accaacgaac tgtacatgat gatgagggac tgttggcatg cagtgccctc ccagagacca 2340
 acgttcaagc agttggtaga agacttggat cgaattctca ctctcacaac caatgaggaa 2400
 tacttggacc tcagccaacc tctcgaacag tattcaccta gttaccctga cacaagaagt 2460
 tcttgttctt caggagatga ttctgttttt tctccagacc ccatgcctta cgaaccatgc 2520
 ctctctcagt atccacacat aaacggcagt gttaaaacat gaatgactgt gtctgcctgt 2580
 ccccaaacag gacagcactg ggaacctagc tacactgagc agggagacca tgcctcccag 2640
 agcttgttgt ctccacttgt atatatggat cagaggagta aataattgga aaagtaatca 2700
 gcatatgtgt aaagatttat acagttgaaa acttghtaat tccccagga ggagaagaag 2760
 gtttctggag cagtggactg ccacaagcca ccatgtaacc cctctcacct gccgtgcyta 2820
 ctggctgtgg accagtagga ctcaaggtgg acgtgcgttc tgcottcctt gttaattttg 2880
 taataattgg agaagattta tgtcagcaca cacttacaga gcacaaatgc agtatatagg 2940
 tgctggatgt atgtaaatat attcaaatta tgtataaata tatattatat atttacaagg 3000
 agttattttt tgtattgatt ttaaattggat gtcccaatgc acctagaaaa ttggctctctc 3060
 tttttttaat agctatttgc taaatgctgt tcttacacat aatttcttaa ttttcaccga 3120
 gcagaggtgg aaaaataact ttgctttcag ggaaaatggt ataacgttaa tttattaata 3180
 aattggtaat atacaaaaca attaatacatt tatagttttt tttgtaattt aagtggcatt 3240
 tctatgcagg cagcacagca gactagttaa tctattgctt ggacttaact agttatcaga 3300
 tcctttgaaa agagaatat tacaatatat gactaatttg gggaaaatga agttttgatt 3360
 tatttgtgtt taaatgctgc tgtcagacga ttgttcttag acctoctaaa tgccccatat 3420
 taaaagaact cattcatagg aaggtgtttc attttgggtg gcaaccctgt cattacgtca 3480
 acgcaacgtc taactggact tccaagata aatggtagca gcgtcctctt aaaagatgcc 3540
 ttaatccatt ccttgaggac agaccttagt tgaatgata gcagaatgtg cttctctctg 3600
 gcagctggcc ttctgcttct gagttgcaca ttaatcagat tagcctgtat tctcttcagt 3660
 gaattttgat aatggcttcc agactctttg gcgttggaga cgctgttag gatcttcaag 3720
 tcccatcata gaaaattgaa acacagagtt gttctgctga tagttttggg gatacgtcca 3780
 tctttttaag ggattgcttt catctaattc tggcaggacc tcaccaaag atccagcctc 3840
 atacctacat cagacaaaat atcgccgttg ttcttctgt actaaagtat tgtgttttgc 3900
 tttggaaca cccactcact ttgcaatagc cgtgcaagat gaatgcagat tacactgatc 3960
 ttatgtgta caaaattgga gaaagtattt aataaaacct gttaattttt atactgacaa 4020
 taaaatggt tctacagata ttaatgttaa caagacaaaa taaatgtcac gcaacttatt 4080
 tttttaataa aaaaaaaaaaaa aaa 4103

<210> 136
 <211> 4306
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 136

ES 2 755 505 T3

```
ggcggcggct ggaggagagc gcggtggaga gccgagcggg cgggcggcgg gtgcggagcg 60
ggcgagggag cgcgcgcggc cgccacaaag ctcgggcgcc gcggggctgc atgcggcgta 120
cctggcccgg cgcggcgact gctctcggg ctggcggggg ccggccgca gccccggggg 180
ccccgaggcc gcagcttgc tgcgcgctct gagccttcgc aactcgcgag caaagtttg 240
tggaggcaac gccaagcctg agtccttct tcctctcggt ccccaaatcc gagggcagcc 300
cgcgggcgtc atgcccgcgc tcctccgcag cctggggtac gcgtgaagcc cgggaggctt 360
```

ggcgccggcg aagacccaag gaccactctt ctgcgtttgg agttgctccc cgcaaccccc 420
 ggctcgtcgc tttctccatc ccgacccacg cggggcgcgg ggacaacaca ggtcgcggag 480
 gagcgttgcc attcaagtga ctgcagcagc agcggcagcg cctcggttcc tgagcccacc 540
 gcaggctgaa ggcattgcmc gtagtccatg cccgtagagg aagtgtgcag atgggattaa 600
 cgtccacatg gagatatgga agaggaccgg ggattggtac cgtaaccatg gtcagctggg 660
 gtcgtttcat ctgcctggtc gtggtcacca tggcaacctt gtccctggcc cggccctcct 720
 tcagtttagt tgaggatacc acattagagc cagaagagcc accaaccaaa taccaaatct 780
 ctcaaccaga agtgtacgtg gctgcgccag gggagtcgct agaggtgcmc tgctgttga 840
 aagatgccgc cgtgatcagt tggactaagg atggggtgca cttggggccc aacaatagga 900
 cagtgcctat tggggagtac ttgcagataa agggcgccac gcctagagac tccggcctct 960
 atgcttgtag tgccagtagg actgtagaca gtgaaacttg gtacttcatg gtgaatgtca 1020
 cagatgccat ctcatccgga gatgatgagg atgacaccga tgggtgcgga gattttgtca 1080
 gtgagaacag taacaacaag agagcaccat actggacca cacagaaaag atggaaaagc 1140
 ggctccatgc tgtgcctgcg gccaacactg tcaagtctcg ctgcccagcc ggggggaacc 1200
 caatgccaac catgvcggtg ctgaaaaacg ggaaggagtt taagcaggag catcgcattg 1260
 gaggctacaa ggtacgaaac cagcactgga gcctcattat ggaaagtgtg gtcccattctg 1320
 acaagggaaa ttatacctgt gtagtggaga atgaatacgg gtccatcaat cacacgtacc 1380
 acctggatgt tgtggagcga tcgcctcacc ggccatcct ccaagccgga ctgcccgcaa 1440
 atgcctccac agtggtcgga ggagacgtag agtttgtctg caaggtttac agtgatgcc 1500
 agccccacat ccagtggatc aagcacgtgg aaaagaacgg cagtaatac gggcccagc 1560
 ggctgcccta cctcaaggtt ctcaaggttt cggctgagtc cagctcctcc atgaactcca 1620
 acaccccgtt ggtgaggata acaacacgcc tctcttcaac ggcagacacc ccatgctgg 1680
 caggggtctc cgagtatgaa cttccagagg acccaaaatg ggagtttcca agagataagc 1740
 tgacactggg caagcccctg ggagaagggt gctttgggca agtggtcatg gcggaagcag 1800
 tgggaattga caagacaag cccaaggagg cggtcaccgt ggccgtgaag atgttgaaag 1860
 atgatgccac agagaaaagc ctttctgatc tgggtgcaga gatggagatg atgaagatga 1920
 ttgggaaaca caagaatctc ataaatcttc ttggagcctg cacacaggat gggcctctct 1980
 atgtcatgat tgagtatgcc tctaaaggca acctccgaga atacctccga gcccgaggc 2040
 caccgggat ggagtaactc tatgacatta acctgttcc tgaggagcag atgacctca 2100
 aggacttggg gtcatgcacc taccagctgg ccagaggcat ggagtacttg gcttcccaa 2160
 aatgtattca tcgagattta gcagccagaa atgttttggg aacagaaaac aatgtgatga 2220
 aatagcaga ctttgactc gccagagata tcaacaatat agactattac aaaaagacca 2280
 ccaatgggcg gcttccagtc aagtggatgg ctccagaagc cctgtttgat agagtataca 2340
 ctcatcagag tgatgtctgg tcttcggggg tgttaatgtg ggagatcttc actttagggg 2400
 gctcgccta cccagggatt cccgtggagg aactttttaa gctgctgaag gaaggacaca 2460
 gaatggataa gccagccaac tgcaccaacg aactgtacat gatgatgagg gactgttggc 2520
 atgcagtgcc ctcccagaga ccaacgttca agcagttggg agaagacttg gatcgaattc 2580
 tcaactctac aaccaatgag gaatacttgg acctcagcca acctctcga cagtattcac 2640
 ctagttacc tgacacaaga agttcttggg cttcaggaga tgattctgtt tttctccag 2700
 accccatgcc ttacgaacca tgccttctc agtatccaca cataaacggc agtgtaaaa 2760
 catgaatgac tgtgtctgcc cagagcttgt tctctcact tgtatatatg agctacagga 2820
 agcagggaga ccatgcctcc cagacatag tgtaaagatt tatacagttg aaaacttcta 2880
 gtaaataatt ggaaaagtaa tcagcatatg tgcagagatt ctgccacaag ccaccatgta 2940
 atcttcccca ggaggagaag aaggtttctg gagcagtgga ctgccacaag ccaccatgta 3000
 acccctctca cctgcctgct gtactggctg tggaccagta ggactcaagg tggacgtgcg 3060
 ttctgccttc cttgttaatt ttgtaataat tggagaagat ttatgtcagc acacacttac 3120
 agagcacaaa tgcagtatat aggtgctgga tgtatgtaaa tatattcaaa ttatgtataa 3180
 atatatatta tatatttaca aggagttatt ttttgtattg attttaaag gatgtcccaa 3240
 tgcacctaga aatttggct ctctttttt aatagctatt tgctaaatgc tgttcttaca 3300
 cataatttct taattttcac cgagcagagg tggaaaaata cttttgcttt cagggaaaat 3360
 ggtataacgt taatttatta ataaattggg aatatacaaa acaattaatc atttatagtt 3420
 tttttgtaa ttaagtggc atttctatgc aggcagcaca gcagactagt taatctattg 3480
 cttggactta actagttatc agatccttg aaaagagaat atttacaata tatgactaat 3540
 ttggggaaaa tgaagttttg atttatttgg gtttaaagtc tgctgtcaga cgattgttct 3600
 tagacctctt aaatgcccc tattaaga actcattcat aggaagggtg ttcattttgg 3660
 tgcgaaccc tgtcattacg tcaacgcaac gtctaactgg acttcccaag ataaatggta 3720
 ccagcctct cttaaaagat gccttaatcc attocttgag gacagacctt agttgaaatg 3780
 atagcagaat gtgcttctct ctggcagctg gccttctgct tctgagttgc acattaatca 3840
 gattagcctg tattctcttc agtgaatttt gataatggct tccagactct ttggcgttgg 3900
 agacgcctgt taggatcttc aagtccatc atagaaaatt gaaacacaga gttgttctgc 3960
 tgatagtttt ggggatacgt ccatctttt aagggattgc tttcatctaa ttctggcagg 4020

ES 2 755 505 T3

```
acctcaccaa aagatccagc ctcataccta catcagacaa aatatcgccg ttgttccttc 4080
tgtactaaag tattgtgttt tgctttggaa acaccactc actttgcaat agccgtgcaa 4140
gatgaatgca gattacactg atcttatgtg ttacaaaatt ggagaaagta tttataaaaa 4200
cctgttaatt tttatactga caataaaaat gtttctacag atattaatgt taacaagaca 4260
aaataaatgt cacgcaactt atttttttaa taaaaaaaaa aaaaaa 4306
```

<210> 137

<211> 4303

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 137

ggcggcggct ggaggagagc gcggtggaga gccgagcggg cgggcggcgg gtgcggagcg 60
 ggcgagggag cgcgcgcggc gccacaaag ctcgggcgcc gcggggctgc atgcggcgta 120
 cctggcccgg cgcggcgact gctctccggg ctggcggggg cgggccgga gcccccgggg 180
 ccccgaggcc gcagcttgcc tgcgcgtctt gagccttcgc aactcgcgag caaagtttgg 240
 tggaggcaac gccaaagcctg agtcctttct tctctcgtt ccccaaatcc gagggcagcc 300
 cgcggggcgtc atgcccgcgc tctccgcag cctggggtac gcgtgaagcc cgggaggctt 360
 ggcgcggcg aagacccaag gaccactctt ctgcgtttgg agttgctccc cgcaaccocg 420
 ggctcgtcgc tttctccatc ccgaccacg cggggcgcgg ggacaacaca ggtcgcggag 480
 gagcgttgcc attcaagtga ctgcagcagc agcggcagcg cctcggttcc tgagcccacc 540
 gcaggctgaa ggcaattgcg gtagtccatg cccgtagagg aagtgtgcag atgggattaa 600
 cgtccacatg gagatatgga agaggaccgg ggattgttac cgtaaccatg gtcagctggg 660
 gtcgtttcat ctgcctggtc gtggtcacca tggcaacctt gtccctggcc cggccctcct 720
 tcagtttagt tgaggatacc acattagagc cagaaggagc accatactgg accaacacag 780
 aaaagatgga aaagcggctc catgctgtgc ctgcggccaa cactgtcaag tttcgtcgc 840
 cagccggggg gaacccaatg ccaaccatgc ggtggctgaa aaacgggaag gagtttaagc 900
 aggagcatcg cattggaggc tacaaggtag gaaaccagca ctggagcctc attatggaaa 960
 gtgtggctcc atctgacaag ggaaattata cctgtgtagt ggagaatgaa tacgggtcca 1020
 tcaatcacac gtaccacctg gatgtttggg agcgcgcgc tcaccggccc atcctccaag 1080
 ccgactgccc ggcaaatgccc tccacagtgg tcggaggaga cgtagagttt gtctgcaagg 1140
 tttacagtga tgcccagccc cacatccagt ggatcaagca cgtggaaaag aacggcagta 1200
 aatacgggcc cgacgggctg ccctacctca aggttctcaa ggccgocggt gttaacacca 1260
 cggacaaaaga gattgaggtt ctctatattc ggaatgtaac ttttgaggac gctggggaat 1320
 atacgtgctt ggcgggtaat tctattggga tacccttca ctctgcctgg ttgacagttc 1380
 tgccagcgc tggaaagagaa aaggagatta cagcttcccc agactacctg gagatagcca 1440
 tttactgcat aggggtcttc ttaatcgctt gtatgggtgtt aacagtcate ctgtgccgaa 1500
 tgaagaacac gaccaagaag ccagacttca gcagccagcc ggctgtgcac aagctgacca 1560
 aacgtatccc cctgcggaga caggtttcgg ctgagtcocag ctctccatg aactccaaca 1620
 ccccgtggtt gaggataaca acacgcctct cttcaacggc agacaccccc atgctggcag 1680
 gggctctccga gtatgaactt ccagaggacc caaaatggga gtttccaaga gataagctga 1740
 cactgggcaa gccctggga gaaggttget ttgggcaagt ggtcatggcg gaagcagtg 1800
 gaattgacaa agacaagccc aaggaggcgg tcaccgtggc cgtgaagatg ttgaaagatg 1860
 atgccacaga gaaagacctt tctgatctgg tctcagagat ggagatgatg aagatgattg 1920
 ggaaacacaa gaatatcata aatcttcttg gagcctgcac acaggatggg cctctctatg 1980
 tcatagttga gtatgcctct aaaggcaacc tccgagaata cctccgagcc cggaggccac 2040
 ccgggatgga gtactcctat gacattaacc gtgttctga ggagcagatg acctcaagg 2100
 acttgggtgc atgcacctac cagctggcca gagcagtgga gtacttggct tcccaaaaat 2160
 gtattcatcg agatthagca gccagaaatg ttttggtaac agaaaacaat gtgatgaaaa 2220
 tagcagactt tggactcgc agagatatca acaatataga ctattacaaa aagaccacca 2280
 atgggcggct tccagtcaag tggatggctc cagaagccct gtttgataga gtatacactc 2340
 atcagagtga tgtctggtcc ttcgggggtg taatgtggga gatcttcaact ttagggggct 2400
 cgcctaccc agggattccc gtggaggaaac tttttaagct gctgaaggaa ggacacagaa 2460
 tgataagcc agccaactgc accaacgaac tgtacatgat gatgagggac tgttggcatg 2520
 cagtgcctc ccagagacca acgttcaagc agttggtaga agacttggat cgaattctca 2580
 ctctcacaac caatgaggaa tacttggacc tcagccaacc tctogaacag tattcaccta 2640
 gttaccctga cacaagaagt tcttgttctt caggagatga ttctgttttt tctccagacc 2700
 ccatgcctta cgaaccatgc ctctctcagt atccacacat aaacggcagt gttaaaacat 2760
 gaatgactgt gtctgcctgt ccccaaacag gacagcactg ggaacctagc tacactgagc 2820
 agggagacca tgctcccag agcttgttgt ctccacttgt atatatggat cagaggagta 2880
 aataattgga aaagtaatca gcatatgtgt aaagatttat acagttgaaa acttghtaat 2940

ES 2 755 505 T3

```

ttccccagga ggagaagaag gtttctggag cagtggactg ccacaagcca ccatgtaacc 3000
cctctcaact gccgtgcgta ctggctgtgg accagtagga ctcaagggtg acgtgcggtc 3060
tgccttcott gttaatcttg taataattgg agaagattta tgtcagcaca cacttacaga 3120
gcacaaatgc agtatatagg tgctggatgt atgtaaataat attcaaatta tgtataaata 3180
tatattatat atttacaagg agttatcttt tgtattgatt ttaaattgat gtcccaatgc 3240
acctagaaaa ttggtctctc tttttttaat agctatttgc taaatgctgt tcttacacat 3300
aatttcctta ttttcaccga gcagaggtgg aaaaataact ttgctttcag ggaaaatggt 3360
ataacgttaa tttattaata aattggtaat atacaaaaca attaatcatt tatagttttt 3420
tttghtaatt aagtggcatt tctatgcagg cagcacagca gactagttaa tctattgctt 3480
ggacttaact agttatcaga tcctttgaaa agagaatatt tacaatatat gactaatttg 3540
gggaaaatga agttttgatt tattttgtgt taaatgctgc tgtcagacga ttgttcttag 3600
acctcctaaa tgccccatat taaaagaact cattcatagg aagggtgttc attttggtgt 3660
gcaaccctgt cattacgtca acgcaacgtc taactggact tcccaagata aatggtacca 3720
gcgtcctctt aaaagatgcc ttaatccatt ccttgaggac agacctagt tgaaatgata 3780
gcagaatgtg cttctctctg gcagctggcc ttctgcttct gagttgcaca ttaatcagat 3840
tagcctgtat tctcttcagt gaatcttgat aatggcttcc agactctttg gcgttgaga 3900
cgctgttag gatcttcaag tcccatcata gaaaattgaa acacagagtt gttctgctga 3960
tagttttggg gatacgtcca tctttttaag ggattgcttt catctaattc tggcaggacc 4020
tcaccaaag atccagcctc atacctacat cagacaaaat atcgccgttg ttccttctgt 4080
actaaagtat tgtgttttgc tttggaaaca cccactcact ttgcaatagc cgtgcaagat 4140
gaatgcagat tacactgatc ttatgtgtta caaattgga gaaagtattt aataaacct 4200
gttaatcttt atactgacaa taaaatggt tctacagata ttaatgttaa caagacaaa 4260
taaattgtcac gcaacttatt tttttaataa aaaaaaaaaa aaa 4303

```

- <210> 138
- <211> 3011
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 138

5

ggcggcggct	ggaggagagc	gcggtggaga	gccgagcggg	cgggcggcgg	gtgcggagcg	60
ggcgagggag	cgcgcgcggc	cgccacaaag	ctcgggcgcc	gcggggctgc	atgcggcgta	120
cctggcccgg	cgcgcgact	gctctccggg	ctggcggggg	cggcccgca	gccccggggg	180
ccccgaggcc	gcagcttgcc	tgcgctctct	gagccttcgc	aactcgcgag	caaagtttg	240
tggaggcaac	gccaaacctg	agtcctttct	tcctctcggt	ccccaaatcc	gagggcagcc	300
cgcgggcgtc	atgcccgcgc	tcctccgcag	cctgggttac	gcgtgaagcc	cgggaggctt	360
ggcgccggcg	aagacccaag	gaccactctt	ctgcgtttgg	agttgctccc	cgcaaccccg	420
ggctcgtcgc	tttctccatc	ccgaccacag	cggggcgcg	ggacaacaca	ggtcgoggag	480
gagcgttgcc	attcaagtga	ctgcagcagc	agcggcagcg	cctcggttcc	tgagcccacc	540
gcaggctgaa	ggcattgcgc	gtagtccatg	cccgtagagg	aagtgtgcag	atgggattaa	600
cgtccacatg	gagatatgga	agaggaccgg	ggattggtac	cgtaaccatg	gtcagctggg	660
gtcgtttcat	ctgcctggtc	gtggtcacca	tggcaacctt	gtcccctggc	cgccctcct	720
tcagtttagt	tgaggatacc	acattagagc	cagaagatgc	catctcatcc	ggagatgatg	780
aggatgacac	cgatggtgcg	gaagattttg	tcagtgagaa	cagtaacaac	aagagagcac	840
catactggac	caacacagaa	aagatggaaa	agcggctcca	tgctgtgcct	gcgccaaca	900
ctgtcaagtt	tcgctgcccc	gccgggggga	accaatgcc	aaccatgcg	tggctgaaa	960
acgggaagga	gtttaagcag	gagcatcgca	ttggaggcta	caaggtagca	aaccagcact	1020
ggagcctcat	tatggaaggt	gtggctccat	ctgacaaggg	aaattatacc	tgtgtagtgg	1080
agaatgaata	cgggtccatc	aatcacacgt	accacctgga	tgttgtggag	cgatcgctc	1140
accggcccat	cctccaagcc	ggactgccgg	caaatgcctc	cacagtggtc	ggaggagacg	1200
tagagtttgt	ctgcaaggtt	tacagtgatg	cccagcccc	catccagtgg	atcaagcacg	1260
tggaaaagaa	cggcagtaaa	tacgggcccg	acgggctgcc	ctacctcaag	gttctcaagc	1320
actcggggat	aaatagttcc	aatgcagaag	tgctggctct	gttcaatgtg	accgaggcgg	1380
atgctgggga	atatatatgt	aaggtctcca	attatatagg	gcaggccaac	cagtctgcct	1440
ggctcactgt	cctgccccaa	cagcaagcgc	ctggaagaga	aaaggagatt	acagcttccc	1500
cagactacct	ggagatagcc	atttactgca	taggggtctt	cttaatcgcc	tgtatgggtg	1560
taacagtcat	cctgtgccga	atgaagaaca	cgaccaagaa	gccagacttc	agcagccagc	1620
cggctgtgca	caagctgacc	aaacgtatcc	ccctgcggag	acaggtaaca	gtttcggctg	1680
agtccagctc	ctccatgaac	tccaacaccc	cgctgggtgag	gataacaaca	cgctctctt	1740
caacggcaga	cacccccatg	ctggcagggg	tctccagata	tgaacttcca	gaggacccaa	1800
aatgggagtt	tccaagagat	aagctgacac	tgggcaagcc	cctgggagaa	ggttgctttg	1860
ggcaagtgg	catggcggaa	gcagtgggaa	ttgacaaaga	caagcccaag	gagggcgtca	1920
ccgtggccgt	gaagatggtg	aaagatgatg	ccacagagaa	agacctttct	gatctgggtg	1980
cagagatgga	gatgatgaag	atgattggga	aacacaagaa	tatcataaat	cttcttgagg	2040
cctgcacaca	ggatgggcct	ctctatgtca	tagttgagta	tgctctaaa	ggcaacctcc	2100
gagaatacct	ccgagcccgg	aggccacccg	ggatggagta	ctcctatgac	attaaccgtg	2160
ttcctgagga	gcagatgacc	ttcaaggact	tgggtcatg	cacctaccag	ctggccagag	2220
gcatggagta	cttggcttcc	caaaaatgta	ttcatcgaga	tttagcagcc	agaaatggtt	2280
tggtaacaga	aaacaatgtg	atgaaaatag	cagactttgg	actcgccaga	gatatacaaca	2340
atatagacta	ttacaaaaag	accaccaatg	ggcggcttcc	agtcaagtgg	atggctccag	2400
aagccctggt	tgatagagta	tacactcatc	agagtgatgt	ctggtccttc	ggggtggtta	2460
tgtgggagat	cttcaactta	gggggctcgc	cctaccagag	gattcccgtg	gaggaacttt	2520
ttaagctgct	gaaggaagga	cacagaatgg	ataagccagc	caactgcacc	aacgaactgt	2580
acatgatgat	gagggactgt	tggcatgcag	tgccctccca	gagaccaacg	ttcaagcagt	2640
tggtagaaga	cttggatcga	attctcactc	tcacaaccaa	tgagatctga	aagtttatgg	2700
cttcattgag	aaactgggaa	aagttggtca	ggcgcagtgg	ctcatgcctg	taatcccagc	2760
actttgggag	gccgaggcag	gcggatcatg	aggtcaggag	ttccagacca	gcctggccaa	2820
catggtgaaa	ccctgtctct	actaaagata	caaaaatta	gccgggcgtg	ttgggtgca	2880
cctgtaatcc	cagctactcc	gggaggctga	ggcaggagag	tcaactgaac	cggggaggcg	2940
gaggttgca	tgagccgaga	tcatgccatt	gcattccagc	cttggcgaca	gagcgagact	3000
ccgtctcaaa	a					3011

- <210> 139
- <211> 4286
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*

<400> 139

```

gtcgcgggca gctggcgccg cgcggtcctg ctctgccggt cgcacggacg caccggcggg 60
ccgccggccg gagggacggg gcgggagctg ggccccgga cagcagaccg gagcgggagc 120
cgcgcgtagc gagccgggct ccggcgctcg ccagtctccc gagcggcgcc cgctccccgc 180
cggtgcccgc gccgggcccgt ggggggcagc atgcccgccg gcgctgcctg aggacgccgc 240
ggccccccgc cccgccatgg gcgcccctgc ctgcgccctc gcgctctgcg tggcctggc 300
catcgtggcc gggcctcctt cggagtcctt ggggacggag cagcgcgctg tggggcgagc 360
ggcagaagtc ccgggcccag agccccggca gcaggagcag ttggtcttcg gcagcgggga 420
tgctgtggag ctgagctgtc ccccccccgg ggggtggccc atggggccca ctgtctgggt 480
caaggatggc acagggctgg tgccctcggg gcgtgtcctg gtggggcccc agcggctgca 540
ggtgctgaat gcctcccacg aggactccgg ggctacagc tgccggcagc ggctcacgca 600
gcgcgtactg tgccacttca gtgtgogggg gacagacgct ccatcctcgg gagatgacga 660
agacggggag gacgaggctg aggacacagg tgtggacaca ggggcccctt actggacacg 720
gcccagacgg atggacaaga agctgctggc cgtgccggcc gccaacaccg tccgcttcg 780
ctgccagacc gctggcaacc ccactccctc catctcctgg ctgaagaacg gcagggagtt 840
ccgcggcgag caccgcattg gaggcacaa gctgocggat cagcagtgga gcctggatcat 900
ggaaagcgtg gtgccctcgg accgcggcaa ctacacctgc gtcgtggaga acaagtttgg 960
cagcatccgg cagacgtaca cgctggacgt gctggagcgc tccccgcacc ggcccatact 1020
gcaggcgggg ctgccggcca accagacggc ggtgctgggc agcagcgtgg agttccactg 1080
caaggtgtac agtgacgcac agccccacat ccagtggctc aagcacgtgg aggtgaatgg 1140
cagcaaggtg ggcccggacg gcacacccta cgttaccgtg ctcaagacgg cgggcgctaa 1200
caccaccgac aaggagctag aggttctctc cttgcacaac gtcacctttg aggacgccgg 1260
ggagtacaac tgctggcggg gcaattctat tgggttttct catcactctg cgtggctggg 1320
ggtgctgcca gccgaggagg agctgggtgga ggtgacgag gcgggcagtg tgtatgcagg 1380
catcctcagc tacgggggtg gcttcttctt gttcatcctg gtggtggcgg ctgtgacgct 1440
ctgccgctg cgcagcccc ccaagaaagg cctgggctcc cccaccgtgc acaagatctc 1500
ccgcttcccg ctcaagcgac aggtgtccct ggagtccaac gcgtccatga gctccaacac 1560
accactgggt cgcacgcaa ggctgtcctc aggggagggc cccacgctgg ccaatgtctc 1620
cgagctcgag ctgcctgccg accccaaatg ggagctgtct cgggcccggc tgaccctggg 1680
caagcccctt ggggagggct gcttcggcca ggtggtcatg gcggaggcca tcggcattga 1740
caaggaccgg gccccaagc ctgtcacctg agccgtgaag atgctgaaag acgatgccac 1800
tgacaaggac ctgtcggacc tgggtgtctga gatggagatg atgaagatga tcgggaaaca 1860
caaaaacatc atcaacctgc tgggcgcctg cacgcagggc gggcccctgt acgtgctggg 1920
ggagtacgag gccaaaggta acctgcggga gtttctgcgg gcgcggcggc cccgggcct 1980
ggactactcc ttcgacacct gcaagccgcc cgaggagcag ctcaccttca aggacctggg 2040

```

ES 2 755 505 T3

gtcctgtgcc taccaggtgg cccggggcat ggagtacttg gcctcccaga agtgcatacca 2100
cagggacctg gctgcccgca atgtgctggt gaccgaggac aacgtgatga agatcgcaga 2160
cttcgggctg gcccgggacg tgcacaacct cgactactac aagaagacga ccaacggccg 2220
gctgcccgtg aagtggatgg cgctgaggc cttgtttgac cgagtctaca ctcaccagag 2280
tgacgtctgg tcctttgggg tcctgctctg ggagatcttc acgctggggg gctccccgta 2340
ccccggcatc cctgtggagg agctcttcaa gctgctgaag gagggccacc gcatggacaa 2400
gcccgccaac tgcacacacg acctgtacat gatcatgcgg gagtgctggc atgccgcgcc 2460
ctcccagagg cccaccttca agcagctggt ggaggacctg gaccgtgtcc ttaccgtgac 2520
gtccaccgac gagtacctgg acctgtcggc gcctttcgag cagtactccc cgggtggcca 2580
ggacaccccc agctccagct cctcagggga cgactccgtg ttgcccacg acctgctgcc 2640
cccggcccca cccagcagtg ggggctcgcg gacgtgaagg gccactggtc cccaacaatg 2700
tgaggggtcc ctagcagccc acctgctgc tggtgcacag ccaactcccc gcatgagact 2760
cagtgcagat ggagagacag ctacacagag ctttggctctg tgtgtgtgtg tgtgcgtgtg 2820
tgtgtgtgtg tgtgcacatc cgcgtgtgcc tgtgtgcgtg cgcactcttc ctcagggtgc 2880
agaggtaccc tgggtgtccc cgctgctgtg caacggcttc ctgactgggtg ctgcagcacc 2940
gaggggcctt tgttctgggg ggacccagtg cagaatgtaa gtgggcccac ccggtgggac 3000
cccogtgggg cagggagctg ggcccacat ggctccggcc tetgcctttg caccacggga 3060
catcacaggg tgggcctcgg cccctcccac acccaaagct gagcctgcag ggaagcccca 3120
catgtccagc accttgtgcc tggggtgta gtggcaccgc ctccccacct ccaggctttc 3180
cacttccca cctgcccct cagagactga aattacgggt acctgaagat gggagccttt 3240
accttttatg caaaaggttt attccggaaa ctagtgtaca tttctataaa tagatgctgt 3300
gtatatggta tatatacata tatatatata acatatatgg aagaggaaaa ggctggtaca 3360
acggaggcct ggcaccctgg gggcacagga ggcaggcatg gccctgggcg gggcgtgggg 3420
gggogtggag ggaggcccca gggggtotca cccatgcaag cagaggacca gggccttttc 3480
tggcaccgca gttttgtttt aaaactggac ctgtatatatt gtaaagctat ttatgggccc 3540
ctggcactct tgttcccaca cccaacact tccagcattt agctggccac atggcggaga 3600
gttttaattt ttaacttatt gacaaccgag aaggtttatc ccgccgatag agggacggcc 3660
aagaatgtac gtccagcctg ccccgagct ggaggatccc ctccaagcct aaaaggttgt 3720
taatagtgg aggtgattcc agtgaagata ttttatttcc tttgtccttt ttcaggagaa 3780
ttagatttct ataggatttt tctttaggag atttattttt tggacttcaa agcaagctgg 3840
tattttcata caaattcttc taattgctgt gtgtcccagg cagggagacg gtttccaggg 3900
aggggccggc cctgtgtgca ggttccgatg ttattagatg ttacaagttt atatatatct 3960
atatatataa tttattgagt ttttacaaga tgtatttgtt gtagacttaa cacttcttac 4020
gcaatgcttc tagagtttta tagcctggac tgctacctt caaagcttgg agggaagccg 4080
tgaattcagt tggttcgttc tgtactgta ctgggcccctg agtotgggca gctgtccctt 4140
gcttgccctg agggccatgg ctcaggtgg tctctctctg gggcccagtg catggtggcc 4200
agaggtgtca cccaaccgg caggtgcgat tttgttaacc cagcgcagaa ctttccgaaa 4260
aataaagaca cctggttgct aacctg 4286

<210> 140
<211> 3950
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 140

ES 2 755 505 T3

```

gtcgcgggca gctggcgccg cgcggctctg ctctgccggt cgcacggacg caccggcggg 60
ccgccggccg gagggacggg gcgggagctg ggcccgcgga cagcgagccg gagcgggagc 120
cgcgcgtagc gagccgggct ccggcgctcg ccagtctccc gagcggcgcc cgçctcccgc 180
cggtgcccgc gccgggccgt ggggggcagc atgcccgcgc gcgctgcctg aggacgccgc 240
ggcccccgcc cccgccatgg gcgcccctgc ctgcgcctc gcgctctgcg tggcctggc 300
catcgtggcc ggcgcctcct cggagtcctt ggggacggag cagcgcgctc tggggcgagc 360
ggcagaagtc ccgggcccag agcccggcca gcaggagcag ttggtcttcg gcagcgggga 420
tgctgtggag ctgagctgtc ccccgcccg ggggtgtccc atggggccca ctgtctgggt 480
caaggatggc acagggctgg tgccctcgga gcgtgtcctg gtggggcccc agcggctgca 540
ggtgctgaat gcctcccacg aggactccgg ggçctacagc tgccggcagc ggctcacgca 600
gcgcgtactg tgccacttca gtgtgcgggt gacagacgct ccatcctcgg gagatgacga 660
agacggggag gacgaggctg aggacacagg tgtggacaca ggggcccctt actggacacg 720
gcccgagcgg atggacaaga agctgctggc cgtgccggcc gccaacaccg tccgcttccg 780
ctgcccagcc gctggcaacc ccactcctc catctcctgg ctgaagaacg gcagggagtt 840
ccgcggcgag caccgcattg gaggcacaa gctgcggcat cagcagtgga gcctggatcat 900
ggaaagcgtg gtgccctcgg accgcggcaa ctacacctgc gtcgtggaga acaagtttgg 960

```

cagcatccgg cagacgtaca cgctggacgt gctggagcgc tccccgcacc ggcccatcct 1020
 gcaggcgggg ctgccggcca accagacggc ggtgctgggc agcgacgtgg agttccactg 1080
 caaggtgtac agtgacgcac agccccacat ccagtggtct aagcacgtgg aggtgaatgg 1140
 cagcaagggtg ggccccgacg gcacacccta cgttaccgtg ctcaagggtg ccctggagtc 1200
 caacgcgtcc atgagctcca acacaccact ggtgcgcate gcaaggctgt cctcagggga 1260
 gggccccacg ctggccaatg tctccgagct cgagctgcct gccgacccca aatgggagct 1320
 gtctcggggc cggctgaccc tgggcaagcc ccttggggag ggctgcttcg gccaggtggg 1380
 catggcggag gccatcggca ttgacaagga ccgggcccgc aagcctgtca ccgtagccgt 1440
 gaagatgctg aaagacgatg ccaactgacaa ggacctgtcg gacctggtgt ctgagatgga 1500
 gatgatgaag atgatcggga aacacaaaaa catcatcaac ctgctggggc cctgcacgca 1560
 gggcggggcc ctgtacgtgc tgggtggagta cgcggccaag ggtaacctgc gggagtttct 1620
 gcgggcgcgg cggcccccg gcttgacta ctcttcgac acctgcaagc cgccccgagga 1680
 gcagctcacc ttcaaggacc tgggtgtcctg tgcctaccag gtggccccgg gcatggagta 1740
 cttggcctcc cagaagtgca tccacagggg cctggctgcc cgcaatgtgc tggtgaccga 1800
 ggacaacgtg atgaagatcg cagacttcgg gctggccccg gacgtgcaca acctcgacta 1860
 ctacaagaag acgaccaacg gccggctgcc cgtgaagtgg atggcgctg aggccttgtt 1920
 tgaccgagtc tacactcacc agagtgacgt ctggtccttt ggggtcctgc tctgggagat 1980
 cttcacgctg gggggctccc cgtacccccg catccctgtg gaggagctct tcaagctgct 2040
 gaaggagggc caccgcatgg acaagcccgc caactgcaca cacgacctgt acatgatcat 2100
 gcgggagtg c tggcatgccc cgcctccca gaggcccacc ttcaagcagc tgggtggagga 2160
 cctggaccgt gtccttaccg tgacgtccac cgacgagtac ctggacctgt cggcgccttt 2220
 cgagcagtac tccccgggtg gccaggacac ccccagctcc agctcctcag gggacgactc 2280
 cgtgtttgcc cacgacctgc tgcccccggc cccaccagc agtgggggct cgcggaactg 2340
 aagggccact ggtccccaac aatgtgaggg gtccttagca gccaccctg ctgctggtgc 2400
 acagccactc cccggcatga gactcagtc agatggagag acagctacac agagctttgg 2460
 tctgtgtgtg tgtgtgtgcg tgtgtgtgtg tgtgtgtgca catccgcgtg tgcctgtgtg 2520
 cgtgcgcate ttgcctccag gtgcagaggt accctgggtg tccccgctgc tgtgcaacgg 2580
 tctcctgact ggtgctgcag caccgagggg cctttgttct ggggggaccc agtgcagaat 2640
 gtaagtgggc ccacccgggtg ggacccccgt ggggcagggg gctgggcccg acatggctcc 2700
 ggctctgccc tttgcaccac gggacatcac aggggtgggc tcggcccctc ccacacccaa 2760
 agctgagcct gcaggaagc cccacatgct cagcacctg tgcctggggg gttagtggca 2820
 ccgctcccc acctccaggc tttcccactt cccaccctgc cctcagaga ctgaaattac 2880
 gggtaacctga agatgggagc ctttaccttt tatgcaaaag gtttattccg gaaactagtg 2940
 tacatttcta taaatagatg ctgtgtatat ggtatatata catatatata tataacatat 3000
 atggaagagg aaaaggctgg tacaacggag gcctgcgacc ctgggggcac aggaggcagg 3060
 catggccctg ggcggggcgt gggggggcgt ggagggagge cccagggggg ctcacccatg 3120
 caagcagagg accagggcct tttctggcac cgcagttttg ttttaaaact ggacctgtat 3180
 atttgtaaag ctatttatgg gccctggca ctctgttcc cacaccccaa cacttccage 3240
 atttagctgg ccacatggcg gagagttta attttact tattgacaac cgagaagggt 3300
 tatcccgcg atagaggac ggccaagaat gtaogtccag cctgccccgg agctggagga 3360
 tcccctcaa gcctaaaagg ttgttaatag ttggaggta tccagtgaa gatattttat 3420
 ttctttgtc ctttttcagg agaattagat ttctatagga tttttctta ggagatttat 3480
 tttttggact tcaaagcaag ctggtatttt catacaaatt cttctaattg ctgtgtgtcc 3540
 caggcagggg gacggtttcc agggaggggc cggccctgtg tgcaggttcc gatgttatta 3600
 gatgttacia gtttatatat atctatatat ataatttatt gagttttac aagatgtatt 3660
 tgtttagac ttaacacttc ttacgcaatg cttctagagt tttatagcct ggactgctac 3720
 ctttcaaagc ttggagggaa gccgtgaatt cagttggttc gttctgtact gttactgggc 3780
 cctgagctcg ggcagctgct ccttgcttgc ctgcagggcc atggctcagg gtggtctctt 3840
 cttggggccc agtgcatggt ggccagaggt gtcacccaaa ccggcaggtg cgattttgtt 3900
 aaccagcga cgaactttcc gaaaaataaa gacacctggt tgctaacctg 3950

<210> 141
 <211> 2085
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 141

ES 2 755 505 T3

```

atggggcgccc ctgcctgcgc cctgcgcctc tgcgtggcgg tggccatcgt ggccggcgcc 60
tcctcggagt ccttggggac ggagcagcgc gtcgtggggc gagcggcaga agtcccgggc 120
ccagagcccg gccagcagga gcagttggtc ttcggcagcg gggatgctgt ggagctgagc 180
tgtccccgcg ccgggggtgg tcccatgggg cccactgtct gggcaagga tggcacaggg 240

ctggtgccct cggagcgtgt cctggtgggg ccccagcggc tgcaggtgct gaatgcctcc 300
cacgaggact ccggggccta cagctgcggg cagcggctca cgcagcgcgt actgtgccac 360
ttcagtgctg cgggtgacaga cgctccatcc tcgggagatg acgaagacgg ggaggacgag 420
gctgaggaca caggtgtgga cacaggggcc ccttactgga cacggcccga gcggatggac 480
aagaagctgc tggccgtgcc ggccgccaac accgtccgct tccgctgccc agccgctggc 540
aaccaccctc cctccatctc ctggtgaaag aacggcaggg agttccgagg cgagcaccgc 600
attggaggca tcaagctgcg gcctcagcag tggagcctgg tcatggaaag cgtggtgccc 660
tcggaccgcg gcaactacac ctgcgtcgtg gagaacaagt ttggcagcat ccggcagacg 720
tacacgctgg acgtgctgga gcgctccccg caccggccca tctgcagggc ggggctgccc 780
gccaacccaga cggcgggtgt gggcagcgcg gtggagttcc actgcaaggt gtacagtgac 840
gcacagcccc acatccagtg gctcaagcac gtggaggtga acggcagcaa ggtgggcccc 900
gacggcacac cctacgttac cgtgctcaag gtgtccctgg agtccaacgc gtccatgagc 960
tccaacacac cactggtgcg catcgcaagg ctgtcctcag gggagggccc cacgctggcc 1020
aatgtctccg agctcgagct gcctgccgac cccaaatggg agctgtctcg ggcccggctg 1080
accctgggca agccccttgg ggagggctgc ttcggccagg tggatcatgg ggaggccatc 1140
ggcattgaca aggaccgggc cgccaagcct gtcaccgtag ccgtgaagat gctgaaagac 1200
gatgccactg acaaggacct gtcggacctg gtgtctgaga tggagatgat gaagatgatc 1260
gggaaacaca aaaacatcat caacctgctg ggcgcctgca cgcagggcgg gcccctgtac 1320
gtgctggtgg agtacgcggc caagggtaac ctgcgggagt ttctgcgggc gcggcggccc 1380
ccgggcctgg actactcctt cgacacctgc aagccgcccg aggagcagct caccttcaag 1440
gacctggtgt cctgtgccta ccaggtggcc cggggcatgg agtacttggc ctcccagaag 1500
tgcattccaca gggacctggc tgcccgaat gtgctggtga ccgaggaaa cgtgatgaag 1560
atcgcagact tcgggctggc ccgggacgtg cacaacctcg actactaaa gaagacaacc 1620
aacggccggc tgcccgtgaa gtggatggcg cctgaggcct tgtttgaccg agtetacact 1680
caccagagtg acgtctggtc ctttggggtc ctgctctggg agatcttcc gctggggggc 1740
tcccgtacc ccggcatccc tgtggaggag ctcttcaagc tgctgaagga gggccaccgc 1800
atggacaagc ccgccaactg cacacacgac ctgtacatga tcatgcggga gtgctggcat 1860
gccgcgccct ccagagggc caccttcaag cagctggtgg aggacctgga ccgtgtcctt 1920
accgtgacgt ccaccgacga gtacctggac ctgtcggcgc ctttcgagca gtaactcccc 1980
ggtggccagg acacccccag ctccagctcc tcaggggacg actccgtgtt tgcccacgac 2040
ctgctgcccc cggccccacc cagcagtggg ggctcgcgga cgtga 2085

```

- <210> 142
- <211> 4431
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*

- <400> 142

ES 2 755 505 T3

```

aggcggggct ggagtgggtg aaggggggtg gcaggtctgc attgccgctt cctggtgcc 60
gggagcagtc gccgctgccg cctccgcccg cggccgggac ccccgtcctc gcccgggact 120
ccttaccggg ggaacctaga ccaggtctcc agaggcttgt ggaagagaag caggcgacct 180
ttcctgagtt atcctggctt agcctcccaa tctggctccc cttccccttc ccattcccct 240
gctccccctg tcccttcccc atccacccaa ctgaactggg tataggtcaa agtcctctc 300
tttccctttc ctctctaggc actcattggc taggacctgt ttgctctttt ttttgtgcc 360
agagatactg gaacacgctt catctaagta actgtgggga ggggtctttt tgactctaca 420
agtccttgag caaaaagctg aaaaagaagc aggaggtgga gaagaccag tgaagtgcc 480
caagccccat catggaagag ggcttccgag accgggcagc tttcatccgt ggggccaaag 540
acattgctaa ggaagtcaaa aagcatgcgg ccaagaaggt ggtgaagggc ctggacagag 600
tccaggacga atattcccga agatcgtact cccgctttga ggaggaggat gatgatgatg 660
acttccctgc tcccagtgat ggttattacc gaggagaagg gaccaggat gaggaggaag 720
gtggtgcatc cagtgatgct actgagggcc atgacgagga tgatgagatc tatgaagggg 780
aatatcaggg cattccccgg gcagagtctg ggggcaaagg cgagcggatg gcagatgggg 840
cgcccctggc tggagtaagg gggggcttga gtgatgggga gggtccccct gggggccggg 900
gggaggcaca acgacggaaa gaacgagaag aactggcca acagtatgaa gccatcctac 960
gggagtgtgg ccacggccgc ttccagtgga cactgtattt tgtgcttggc ctggcgctga 1020
tggtgacgg tgtggaggtc tttgtggtg gcttcgtgct gccagcgtc gagaaagaca 1080
tgtgcctgtc cgactccaac aaaggcatgc taggcctcat cgtctacctg ggcatgatgg 1140
tgggagcctt cctctgggga ggtctggctg accggctggg tcggaggcag tgtctgotca 1200
tctcgtctc agtcaacagc gtcttcgctt tcttctcctc ttttgtccag ggttacggca 1260
ctttcctctt ctgccgccta ctttctgggg ttgggattgg agggccatc ccattgtct 1320
tctcctattt ctccgagttt ctggcccagg agaaacgagg ggagcatttg agctggctct 1380

```

gcatgttttg gatgattggt ggcgtgtacg cagctgctat ggcctgggcc atcatcccc 1440
 actatgggtg gagttttcag atgggttctg cctaccagtt ccacagctgg agggctctcg 1500
 tcctcgtctg cgcctttcct tctgtgtttg ccattggggc tctgaccacg cagcctgaga 1560
 gccccgttt ctccctagag aatggaaagc atgatgaggc ctggatggtg ctgaagcagg 1620
 tccatgatac caacatgcga gccaaaggac atcctgagcg agtgttctca gtaaccacaca 1680
 ttaagacgat tcatcaggag gatgaattga ttgagatcca gtcggacaca gggacctggt 1740
 accagcgtg ggggtccgg gccttgagcc taggggggca ggttggggg aattttctct 1800
 cctgttttgg tccgaatat cggcgcacca ctctgatgat gatgggtgtg tggttcacca 1860
 tgtcattcag ctactatggc ctgaccgtct ggtttcctga catgatccgc catctccagg 1920
 cagtggacta cgcacccgc accaaagtgt tccccggga gcgcgtagag catgtaactt 1980
 ttaacttcac gttggagaat cagatccacc gaggcgggca gtaactcaat gacaagttca 2040
 ttgggctgcg gctcaagtca gtgtcctttg aggattccct gtttgaagag tgttattttg 2100
 aggatgtcac atccagcaac acgtttttcc gcaactgcac attcatcaac actgtgttct 2160
 ataactctga cctgttcgag tacaagtttg tgaacagccg tctgataaac agtacattcc 2220
 tgacaacaaa ggagggtgct ccgctagacg tgacagggac gggcgaagg gctacatgg 2280
 tatactttgt gagcttcctg gggacactgg cagtgtctcc tgggaatata gtgtctgccc 2340
 tgctcatgga caagatcggc aggctcagaa tgcttgctgg ctccagcgtg atgtcctgtg 2400
 tctcctgctt ctctcctgtt ttgggaaca gtgagtcggc catgatcgtc ctgctctgcc 2460
 ttttggcgg ggtcagcatt gcatcctgga atgcgctgga cgtgttgact gttgaactct 2520
 acccctcaga caagaggacc acagcttttg gcttctgaa tgccctgtgt aagctggcag 2580
 ctgtgctggg gatcagcacc ttcacatcct tctgtgggat caccaaggct gacccatcc 2640
 tctttgcctc agctgcctt gcccttgga gctctctggc cctgaagctg cctgagacc 2700
 gggggcaggt gctgcagtga aggggtctct agggctttgg gattggcagg cacactgtga 2760
 gaccaaacac tccttcttc cctccctgc cctgccatcc tgacctccag agccctcact 2820
 cccactccc cgtgtttggt gtcttagctg tgtgtcgtg tgctgtgca tgtgtgtaaa 2880
 ccccggtggc agggactaca gggaaggctc cttcatccca gttttgagat gaagctgtac 2940
 tcccatttc ccactgcct tgactttgca caagagaagg ctgagccca tccttctccc 3000
 cctgttagag aggggcccct gcttccctgt tccaggggtt ccagaatagg ctctcctgct 3060
 tcccateat tcctctgcc taggcccctg tgaaccaca ggtatgcaat tatgctaggg 3120
 gctggggctc tgggtgtagac catggacca aagaacttct tagagtctga agagtgggcc 3180
 tcgggtgcc tctcacatct cctgttggat gctgggggag aagcaataaa cctcagcct 3240
 ctggcctcca ctttctctc aatttgggt gcaaatatga agcctgaatt ttatgaaatt 3300
 agctttctga ttcttattta ttaatagatt aagtctctgag gcagctccgc aggactgtgt 3360
 gtgaatgtgt atgtatactt acatatgtgt gtgcatgtgc catggggcgg ggggtatcac 3420
 tatactgtcc tcaaatataa gccaaaggta atttcagcgg atgcacacac aaccctgct 3480
 cccacagttc ctccccta atctgtttctg tgttgagcct gggatggagg agccctaggc 3540
 cagcctggga taagagtccc acagtctagg gagatctgag ggcacccgac aaggcccac 3600
 tccttccctc ctcaagaagc agaggcctcc tctggagtga gaggctccac ccactacagc 3660
 acaggcggga atagcacagc tgccctccca tgctccctac ctgtcccctc acagggaggg 3720
 gagcagggga gggaaagaaa ccaggcatct ggtcaaacca gcagatcaaa aagcaciaag 3780
 agctggggca gaggcaggaa gcaggggccc tcctggcagc tcctctgagt ggggagagg 3840
 tgggcagtga gtgagggacc cctaattgcag ggactagaag cctcagtttc cccattttac 3900
 ccttccacac aatagcctct gttaggttag ctgccccatc ccaccctact ctgtgtggct 3960
 gctttctttg gtgccctccc ctccccccac tgtagctgtg acgtgttgta gtttttagat 4020
 gtttgtaaaa tgtttaaaaa aatgttaaaa ggaaaaaagt gaaaataaca aaaaagaaa 4080
 tcaaaattca ccttcgtcat gctgcgtcca gtgccccaac cctgtggtca ctctccccat 4140
 tttgtaaacac tgtaccagggt ggtgactgtt taactctttg gtgtctgtgc tcaaaagact 4200
 gccttctcca gtgccagtg tatgagtgtg tgccctgtgc cctgttccct cactccccac 4260
 atgctggacg tagccctctt cctcgcaccc ctgggaggga cccatccatc tcccttgctc 4320
 tcctggggaa ccctaaacc aactctgttg atgtgaaaaa tgcagtgaaa aatattgacg 4380
 aaaaataaaa cggaacaaa tcctcaaat acaaaaaaaa aaaaaaaaa a 4431

<210> 143
 <211> 5311
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

ES 2 755 505 T3

<400> 143

```
agcataacct tcggtggcag gacaaatcag gccagcacgc agtctgcca gtctgctcg 60
ctccctgtca agaaaaacag ctggatccat ttctaataca cacttcccaa cgcaacactt 120
ctgagtctct gaaggagacc agagcttgaa actttccaga cttccaacag acatcgagtg 180
```

ES 2 755 505 T3

caaaaggata tttaggttgt ctttgcacaa atctggttga tttgagagat aaaggggggg 240
 ggaaccagtg tgactttcac ctaagaagtc acatgaacat atttcacatt tgaactacat 300
 aatgaatgat ggttattgaa atagcccaaa cctctaccac agagcgaggg ataatagctca 360
 aggggcaacc aggcagtcgc agaaccaagg aatggatgac tacaagtatc aggacaatta 420
 tgggggctat gctccagtg atggctatta ccgcggaat gagtccaacc cagaagaaga 480
 tgcacagagt gatgtcaccg aaggccatga tgaggaagac gagatctatg agggcgagta 540
 ccagggtatc cctcaccag atgatgtcaa ggccaagcag gccaagatgg cgccctccag 600
 aatggacagc cttcggggcc agacagacct gatggctgag aggctggaag atgaggagca 660
 gttggcccac cagtacgaga ccatcatgga tgagtgtggc catggccgct tccagtggat 720
 cctctttttc gtcttgggtt tggccctgat ggccgatggg gtggaagtgt tctggtgag 780
 ttttgccctg ccagtgagc agaaggacat gtgtctgtcc agttccaaa aaggaatgct 840
 agggatgata gtctacttgg gaatgatggc gggcgcttc atctggggag gctggctga 900
 taagctggga aggaagcgag tcctcagcat gtctctggcc gtcaatgcct ccttcgctc 960
 cctctcttcc ttctgagcag gatatggagc cttcctcttc tgccgactca tctcagcat 1020
 cggatattggg ggtgctctac cgattgtttt tgcctatttt tctgaattct tgtctcggga 1080
 gaagcgagga gaacacctca gttggctggg catcttctgg atgactggg gctgtacgc 1140
 atctgccatg gcctggagca tcatcccaca ctatggctgg ggcttcagca tggggacca 1200
 ttaccacttc catagctgga gagtgtttgt catcgtctgt gctctgccct gcaccgtgtc 1260
 catggtggcc ctgaagttca tgccagagag cccaaggttt ctgctagaga tgggcaaca 1320
 tgatgaagcc tggatgattc tcaagcaagt ccatgacacc aacatgagag ctaaggggac 1380
 cccagagaaa gtgttcacgg tttccaacat caaaactccc aagcaaatgg atgaattcat 1440
 tgagatccaa agttcaacag gaacctggta ccagcgtgg ctggtcagat tcaagaccat 1500
 tttcaagcag gtctgggata atgcoctgta ctgtgtgatg gggccctaca gaatgaatac 1560
 actgattctg gcctgggtt ggtttgccat ggcattcagt tactatggac tgacagttt 1620
 gtttctgat atgatccgt attttcaaga tgaagaatac aagtctaaaa tgaaggtgtt 1680
 tttgggtgag catgtgtacg ggcaccaat caacttcacg atggaaaatc agatccacca 1740
 acatgggaaa cttgtgaatg ataagttcac aagaatgac ttaaacatg tactcttga 1800
 ggacacattc ttgacagat gctattttga agacgtaaca tcaacagata cctacttcaa 1860
 aaattgtacc attgaatcaa ccatctttta caacacagac ctctacgagc acaagttcat 1920
 caactgtcgg tttatcaact ccaccttct ggagcagaag gagggctgcc acatggactt 1980
 ggagcaagat aatgaactcc tgatttacct cgtcagcttc ctgggcagcc tgtctgtctt 2040
 acccgggaac atcatttctg ccctgctcat ggatagaatt ggaaggctca agatgattg 2100
 tggctccatg ctaatctctg cagtctgctg cttcttctctg ttttttggca acagtgagtc 2160
 tgcaatgatc ggctggcagt gcctgttctg tgggacaagc attgcagcct ggaatgctct 2220
 ggatgtgatc acagtggagc tgtatcccac caaccagaga gcaacagcct tgggcattct 2280
 caatggatta tgcaaatttg ggcacctct gggaacacc atctttgctt cttttgttg 2340
 gataacccaa gtggtcccca tcttctggc tgctgcttct ctggttgggg gtggcctgat 2400
 tgcccttoga ctgccagaga ctcgagaaca ggtcctgatg tgaacaacct atgggaaaag 2460
 gaaaggtoga gagaatttg tccagacac tgaaatgcat ccacacttcc tgccatcac 2520
 ggtccggagg acaccttga tagcagggga ggagaagtg actttgtgac ccctatgta 2580
 ggacccactt cagctgtcaa tatgtttgta actcaggtga ctgatttggg ggtgcctga 2640
 gccaccctta gaatcacaga gctgcgtgtt taacttcaag tcttcccagt ccaaggcagg 2700
 gagaggattc tccagtgagt gcacacacta tgcgaggagc aagcatttct ctaagtcaag 2760
 tgcaaggact taacttgcgt ttgaaaagga attagagggc cagaaacacc caggttctc 2820
 cagaaagctc cttggagccc aacaacttaa caaatcaact tggctggaag ttagagtcat 2880
 tatatgaaga ttgggcttga agtatatatt tttgcattta aaagtatcac ctatcatatt 2940
 ttccactcga aaattgacat agtagcattg aggatactct gatctagaaa gccaagtatt 3000
 tgagcaacat ctatagagat ctacttttct cctatgtctc ctaggcttcc catgataatt 3060
 aggtaataca ttttaagaagg atatttattt ctgttttgtc ctattcaaag aaacggaatg 3120
 ggatagtatc tctgtaaact aagtttgtat ataactttat ttgggtttaa tttccacaac 3180
 tggatctcgc aaatattgac agcattttag ccataatttg ggagaacttg ggtttgagg 3240
 tcccaggaaa tgaggtctga tcaaatgaaa tgcraagaca atttcttaca gccatttaac 3300
 tttctgttgg gaggatgaat taacaaactc acattgtgca gtctgcttaa tccaggact 3360
 tttctttgtg caggtgtagt gagtagttac ttctctccct tacacagatg acttgtgaaa 3420
 ctcaagctca ccatcttcag tgctggcatt ttactttgcc actacccaaa aacaatgtga 3480
 gatgtgttca gtggcctctg gtactctttg caggcaagaa tccaaatgt aaatactttt tgtttgttct 3600
 ggggaaggatg ggggaagtgt gccacagttc ttccaaatgt aaatactttt tgtttgttct 3600
 agtggtaaaa tgcaaatgca atccatattt gttaggtagg tcaggtctca tgagaaatct 3660
 atgctatgtg tccagagctt ttgaaacaga gtccattgga gtgggagtta gggagtgtag 3720
 tggatgccaa atatgttttt cttcagtgct taagagaact gtttctgaa gtccagcttt 3780
 gaacataaac aggggtgtgg gttgggggag gagcttagga caaacctctc tgatgaaggt 3840

ES 2 755 505 T3

```

cagcaataga ctgaagtctt gactgcatgg aagaggaaaa acatcagaac tgtctgacaa 3900
tggaggggac agtgagctac gcacaactgc cagcggaggt gaacttgcac ctgcccaggc 3960
cggatgaaca tcagcctgca agaactagtt gtttgagttg atttgcagtg ctctcaatgg 4020
gcaagtgccca cattttccct ggcagagatc tccaaaaaatt taaaacagaa taataatggc 4080
tatatcgagt gttttctcag tattggagaa atgcttaggt cctatgatag cttegggaca 4140
tctttctgta attttctca attaacgggt tggtaggggt aatctttatg acacctttcc 4200
accgtcgatt tgagatcagt tttaatgggt aaaatgttta ctctccttct gtcaaccctc 4260
acctttttat ttacaccctt cccttttttt ctgtacaggg agagaagaca tattgactct 4320
gactggacac cctgattcct ccaaataat ataccactgt gtattaatct ttctctcagt 4380
gttttatagg agtactaaca tttattgctc tgtcaataat gaaaggctcg atgtaataata 4440
gctgtaattt actttccata tgaatacagt ggctaggttc ataaaagaga attgtgtgag 4500
tctgggatta ccacatctaa aacattatct tttaatggga taatacaatt cattgagcag 4560
ctaccactta aaaaacttgc aggacagtta gagcctgcat ttctagttaa gatggatctt 4620
gtaaatttaa aattggatta acattggagt gctgggggtg ctgcaataat ttgggggcta 4680
actccatttg gtttccaaga tctcacttct gcattatctt tatggctctt taaaccagcc 4740
acctagccaa tcaagggcaa ttcccatctc atccatcact caggctctttg taaaggggtc 4800
agccaagctc tgcagacttt tgcaggattg tctagcctga gtaccgggct acttcttaaa 4860
tgccgtcact cctgctgaga taaatgcgtc tttaaaaata gtctctgtgg caggtcactg 4920
ggggacaatg tacagcattc tggccatcca cttctttttc acttcatgtt ctacccaag 4980
agactcccga tgtcggctgt ggaggggttaa agggatgagg ctttcttttg tttagcaaat 5040
ctgttcacag ttcttgatga tgtattttat gatgcccagc ttggaaatag ttgctttcca 5100
tagtotcaac tgtattgtgt catctcctga tgctgatttt tgatcttttg ttttattaaa 5160
aataattagt gaaagaggtg tgcctatctg tgaagtttgt agtacatcat cctgaggtca 5220
tgtaacaagt aaacccaac ccagcgttcc ctctacgtt gtgttagttc attaaaaacta 5280
aataataaaa ataactgtaa gaaaacctta a 5311

```

<210> 144
 <211> 2362
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 144

ES 2 755 505 T3

```

cactcagggc aaggggtgcc gacggctgga gcgttctggt ttgaacccaa agtggatgat 60
gctgtcagag ctgaactact gaaaggaggc tgtgaaaatt tcccatcttc tcattggcca 120
tcagttgaga taagatggaa gactcttaca aggataggac ttactgatg aagggtgcca 180
aggacattgc cagagagggtg aagaaacaaa cagtaaagaa ggtgaatcaa gctgtggacc 240
gagcccagga tgaatacacc cagaggtcct acagtcgggt ccaagatgaa gaagatgatg 300
atgactacta cccggctgga gaaacctata atggtgaggc caacgatgac gaaggctcaa 360
gtgaagccac tgaggggcat gatgaagatg atgagatcta tgagggggag tatcagggca 420
tcccagtat gaaccaagcg aaggacagca tcgtgtcagt ggggcagccc aagggcgatg 480
agtacaagga ccgacgggag ctggaatcag aaaggagagc tgacgaggaa gagttagccc 540
agcagtatga gctgataatc caagaatgcg gtcatggtcg ttttcagtgg gccctttct 600
tcgtctggg catggctctt atggcagacg gtgtagaggt gtttgcgtt ggcttcgtgt 660
taccagtg c tgagacagac ctctgcatcc caaattcagg atctggatgg ctaggcagca 720
tagtgtacct cgggatgatg gtgggggctg tcttctgggg aggactggca gacaaagtgg 780
gaaggaacaa gtctcttctg atttgcatgt ctgtcaacgg attctttgcc ttcctttctt 840
catttgtcca aggttatggc ttctttctct tctgtcgtt actttctgga ttcgggattg 900
gaggagccat acccactgtg ttctcgtact ttgctgaagt cctggcccgg gaaaagcggg 960
gcgaacactt gagctggctc tgcattgtt ggatgatcgg tggcatctac gcctctgcca 1020
tggcctgggc catcatccc cactacgggt ggagcttcag catgggatcg gcctaccagt 1080
ttcacagttg gcgtgtgtt gtcatcgtct gtgcaactcc ctgtgtctcc tccgtgggtg 1140
ccctcacatt catgcctgaa agcccacgat tcttgttgga ggttgaaaa catgatgaag 1200
cttggatgat tctgaagtta attcattgaca ccaacatgag agcccgggg cagcctgaga 1260
aggtcttcac ggtaaacaaa ataaaaactc ctaaacaaat agatgagctg attgaaattg 1320
agagtgcac aggaacatgg tataggaggt gttttgttcg gatccgcacc gagctgtacg 1380
gaatttggtt gacttttatg agatgtttca actaccagc cagggataat acaataaagc 1440
ttacaattgt ttggttcacc ctgtcctttg ggtactatgg attatccgtt tggttccctg 1500
atgtcattaa acctctgcag tccgatgaat atgcattgct aaccagaaat gtggagagag 1560
ataaatatgc aaatttcaat attaacttta caatggaaaa tcagattcat actggaatgg 1620
aatacgacaa tggcagatcc ataggggtca agttcaaate tgtaactttc aaagactctg 1680
tttttaagtc ctgcacctt gaggatgtaa cttcagtga cacctacttc aagaactgca 1740
catttattga cactgttttt gacaacacag attttgagcc atataaatc attgacagtg 1800
aatttaaaaa ctgctcgttt ttccacaaca agacgggatg tcagattacc tttgatgatg 1860
actatagtgc ctactggatt tattttgtca actttctggg gacattggca gtattgccag 1920
ggaacattgt gtctgctctg ctgatggaca gaattgggcg cttacaatg ctagggtggc 1980
ctatgggtgct ttcggggatc agctgtttct tctttgggt cggcaccagt gaatccatga 2040
tgataggcat gctgtgtctg tacaatggat tgaccatctc agcctggaac tctcttgacg 2100
tggtaactgt ggaactgtac cccacagacc ggagggcaac aggctttggc ttcttaaatg 2160
cgctatgcaa ggcagcagcc gtctctggaa acttaaatatt tggctctctg gtcagcatca 2220
ccaaatcaat ccccatcctg ctggcttcta ctgtgctcgt gtgtggagga ctcgttgggc 2280
tgtgcctgcc tgacacacga acccaggttc tgatgtaatg ggaaaaaaag ccatccttcc 2340
tgcgtttctt cctcctgccc tg 2362

```

- <210> 145
- <211> 2053
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*

- <400> 145

ES 2 755 505 T3

```

catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggc 60
gctgtctttc cttccctccc tgctcggcgg ctccaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120
ggagaacaca accctcccga gaagcccagg tccagagcca aaccogtcac tgacccccca 180
gccagggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atgcgcaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtcgctg gaaagcacc 300
gtcgtatgct gcaactggtt gaagagagta aagatgctgg taccaggact ttggttatgt 360
tggatgaaca aggagaacaa ctcgatcgtg tcgaagaagg catgaacctat atcaaccaag 420
acatgaagga ggctgagaaa aatttaaaag atttagggaa atgctgtggc cttttcatat 480
gtccttgtaa caagcttaaa tcaagtgatg cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540
acggagtggg ggccagccag cctgctcgtg tagtggacga acgggagcag atggccatca 600
gtggcggcct catccgcagg gtaacaaatg atgcccgaga aaatgaaatg gatgaaaacc 660
tagagcaggt gagcggcatc atcgggaacc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaacaaaa 780
ccagaattga tgaggccaac caacgtgcaa caaagatgct gggaaagtgg taagtgtgcc 840
caccogtgtt ctctccaaa tgctgtcggg caagatagct ctttcagctg tttctcatgg 900
tattatctag taggtctgca cacataacac acatcagtc accccattg tgaatgttgt 960
cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct tttgttctct cttggctctct 1020
ttctttccaa aggttgtaca tagtggctcat ttgggtggctc taactccttg atgtcttgag 1080
tttcattttt cattttctct cctcgggtggc atttgctgaa taacaacaat ttaggaatgc 1140
tcaatgtgct gttgattctt tcaatccaca gtattgttct tgtaaaactg tgacattcca 1200
cagagttact gccacggtcc tttgagtgtc aggctctgaa tctctcaaaa tgtgccgtct 1260
ttggttcctc atggctgtta tctgtcttta tgatttcag attagacaat gtggaattac 1320
ataacaggca ttgactaaa agtgatgtga tttatgcatt tatgcatgag aactaaatag 1380
atttttagat tctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcactact atgagacaac 1440
acacacacac acaaaacaac agcaacaaca acagaacaac aacaaagcat gctcagtatt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact ttttctctgt 1560
caatataatag agacttctaa atcataatca tctttttta aaaaaaagaa ttttaaaaaa 1620
gatggatttg acacactcac catttaatca tttccagcaa aatataatgt tggctgaaat 1680
tatgtcaaat ggatgtaata tagggtttgt ttgctgcttt tgatggctac gttttggaga 1740
gagcaatctt gctgtgaaac agtgtggatg taaattttat aaggctgact cttactaacc 1800
accatttccc ctgtggtttg ttatcagtac aattctttgt tgcttaactc agagctatgc 1860
acaccaaat gctgagatgt ttagtagctg ataaagaac cttttaaaaa aataatataa 1920
atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatagc atgtaataat aaattcctcc 1980
tgtctcctct gtcagtttgt gaagtgattg acattttgta gctagtttaa aattattaaa 2040
aattatagac tcc 2053

```

<210> 146
 <211> 2053
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 146

```

catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggc 60
gctgtctttc ctccctccc tgctcggcgg ctccaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120
ggagaacaca accctcccga gaagcccagg tccagagcca aacctcgtcac tgacccccca 180
gccagggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atgcgcaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtcgctg gaaagcacc 300
gtcgtatgct gcaactggtt gaagagagta aagatgctgg tatcaggact ttggttatgt 360
tggatgaaca aggagaacaa ctggaacgca ttgaggaagg gatggaccaa atcaataagg 420
acatgaaaga agcagaaaaa aatttgacgg acctaggaaa attctcgggg ctttgtgtgt 480
gtccctgtaa caagcttaaa tcaagtgatg cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540
acggagtggg ggccagccag cctgctcgtg tagtgagcga acgggagcag atggccatca 600
gtggcggcct catccgcagg gtaacaaatg atgcccgaga aaatgaaatg gatgaaaacc 660
tagagcaggt gageggcatc atcgggaacc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaacaaaa 780
ccagaattga tgaggccaac caacgtgcaa caaagatgct gggaaagtgg taagtgtgcc 840
cacccgtggt ctctccaaa tgctgtcggg caagatagct ccttcagct tttctcatgg 900
tattatctag taggtctgca cacataaac acatcagtc accccattg tgaatgttgt 960
cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct tttgttctct cttggtctct 1020
ttctttccaa aggttgtaaca tagtggtcat ttggtggctc taactccttg atgtcttgag 1080
ttcattttt cattttctct cctcgggtggc atttgctgaa taacaacaat ttaggaatgc 1140
tcaatgtgct gttgattctt tcaatccaca gtattgttct tgtaaaactg tgacattcca 1200
cagagttact gccacggtcc tttgagtgtc aggctctgaa tctctcaaaa tgtgccgtct 1260
ttggttcctc atggctgtta tctgtcttta tgatttcag attagacaat gtggaattac 1320
ataacaggca ttgactaaa agtgatgtga tttatgcatt tatgcatgag aactaaatag 1380
atttttagat tctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcatactg atgagacaac 1440
acacacacac acaaaacaac agcaacaaca acagaacaac aacaaagcat gctcagtatt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact ttttctctgt 1560
caatatatag agacttctaa atcataatca tcctttttta aaaaaaagaa ttttaaaaaa 1620
gatggatttg acacactcac catttaatca tttccagcaa aatatatgtt tggctgaaat 1680
tatgtcaaat ggatgtaata tagggtttgt ttgctgcttt tgatggctac gttttggaga 1740
gagcaatctt gctgtgaaac agtgtggatg taaattttat aaggctgact cttactaacc 1800
accatttccc ctgtggtttg ttatcagtac aattctttgt tgcttaatct agagctatgc 1860
acaccaaatt gctgagatgt ttagtagctg ataaagaaac cttttaaaaa aataatataa 1920
atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatagc atgtaatatt aaattcctcc 1980
tgtctctct gtcagtttgt gaagtgattg acattttgta gctagtttaa aattattaaa 2040
aattatagac tcc 2053

```

<210> 147
 <211> 5
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A

<400> 147
 Asp Glu Ala Asn Gln
 1 . 5

15 <210> 148
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A

<400> 148

Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5

Solicitud de patente internacional

5 18383-PCT (BOT)

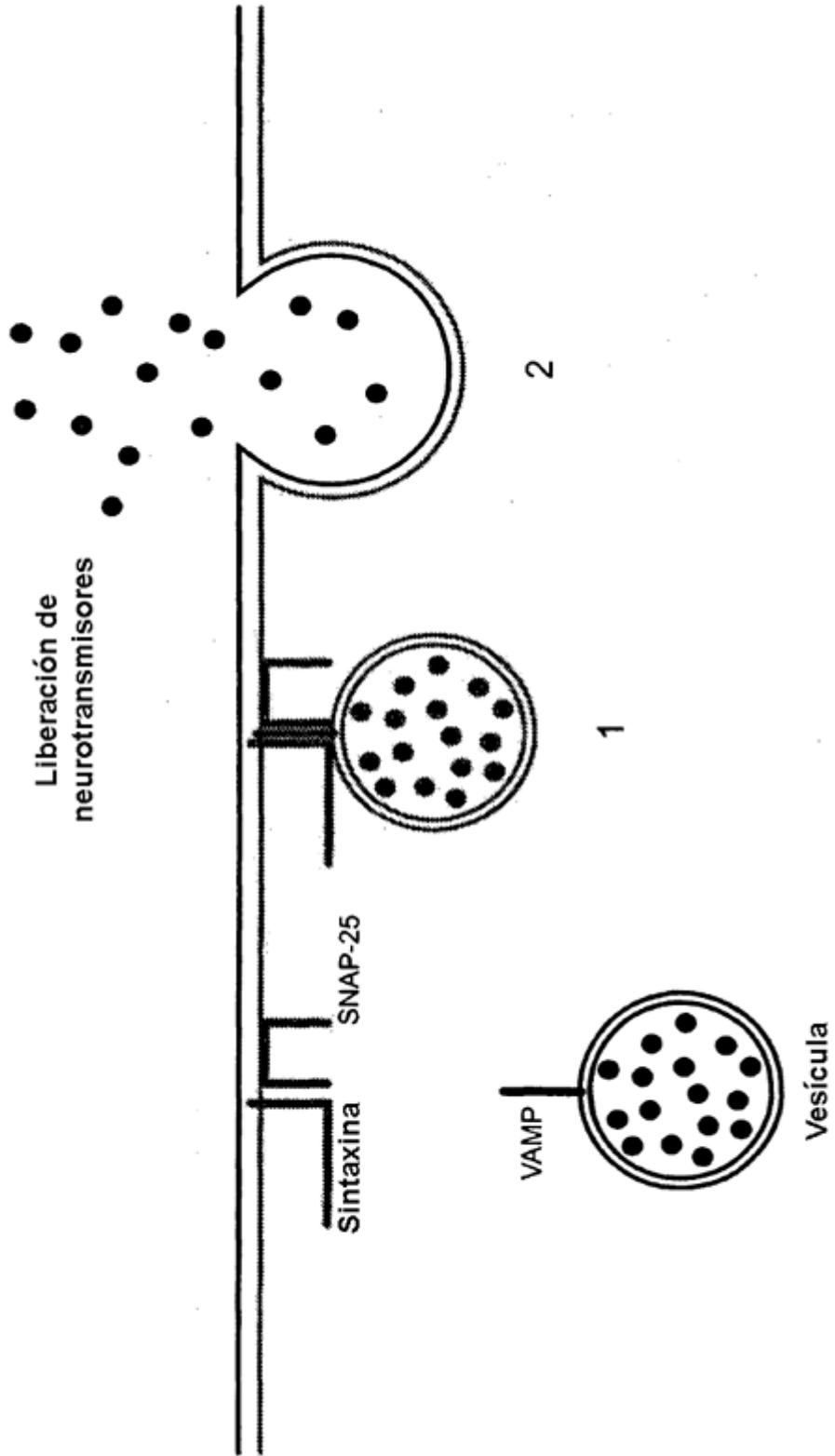
Fernandez-Salas, E., *et al.*, Ensayos de actividad de serotipo A de toxina botulínica de base inmunológica

REIVINDICACIONES

1. Método de detección de actividad de NTBo/A en un mamífero, que comprende las etapas de:
 - a. tratar una célula de una línea celular establecida que expresa SNAP-25 con una muestra de prueba que comprende una NTBo/A, en el que la célula de una línea celular establecida es susceptible de intoxicación por NTBo/A, en el que la célula de una línea celular establecida es susceptible de intoxicación por NTBo/A en aproximadamente 500 pM o menos de una NTBo/A, y en el que dicha célula se selecciona del grupo que consiste en una línea celular SiMa, y una línea celular Neuro-2a;
 - b. aislar de las células tratadas un producto de corte de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A;
 - c. poner en contacto el producto de corte de SNAP-25 con un anticuerpo monoclonal anti-SNAP-25 unido a un soporte de fase sólida, en el que el anticuerpo anti-SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25, en el que el anticuerpo anti-SNAP-25 tiene una constante de velocidad de asociación para un epítipo que no comprende una glutamina en el extremo carboxilo-terminal del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A de un producto de corte de SNAP-25 de menos de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; y el anticuerpo anti-SNAP-25 tiene una constante de disociación de equilibrio para el epítipo de menos de 0,450 nM;
 - d. detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo anti-SNAP-25 y el producto de corte de SNAP-25 que comprende un extremo carboxilo-terminal en el residuo P₁ del enlace escindible del sitio de corte de NTBo/A del producto de corte de SNAP-25;

en el que la detección del complejo antígeno-anticuerpo en la etapa d es indicativa de actividad de NTBo/A.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra de prueba es una muestra de sangre, plasma, suero o linfa del mamífero.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la muestra de prueba es una muestra de sangre o suero del mamífero.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de corte de SNAP-25 tiene una glutamina en el extremo carboxilo-terminal de SEQ ID NO:38.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo anti-SNAP-25 se une a un epítipo que comprende una glutamina en el extremo carboxilo terminal de SEQ ID NO:38.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra de control negativo no comprende NTBo/A.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección de la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo es a través del uso de un inmunoensayo de tipo sándwich.
8. Método según la reivindicación 7, en el que el inmunoensayo de tipo sándwich usa una etapa de método de detección de electroquimioluminiscencia o quimioluminiscencia.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que
 - (i) el anticuerpo anti-SNAP-25 comprende una región variable de cadena pesada que comprende regiones de determinación de complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de al menos una de SEQ ID NO: 95, 99 y 101 y una región variable de cadena ligera que comprende las CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos de al menos una de SEQ ID NO: 103, 108 y 113 o
 - (ii) el anticuerpo anti-SNAP-25 comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos de al menos una de SEQ ID NO: 93, 96 y 100 y una región variable de cadena ligera que comprende las CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos de al menos una de SEQ ID NO: 105, 110 y 115.

FIG. 1A.



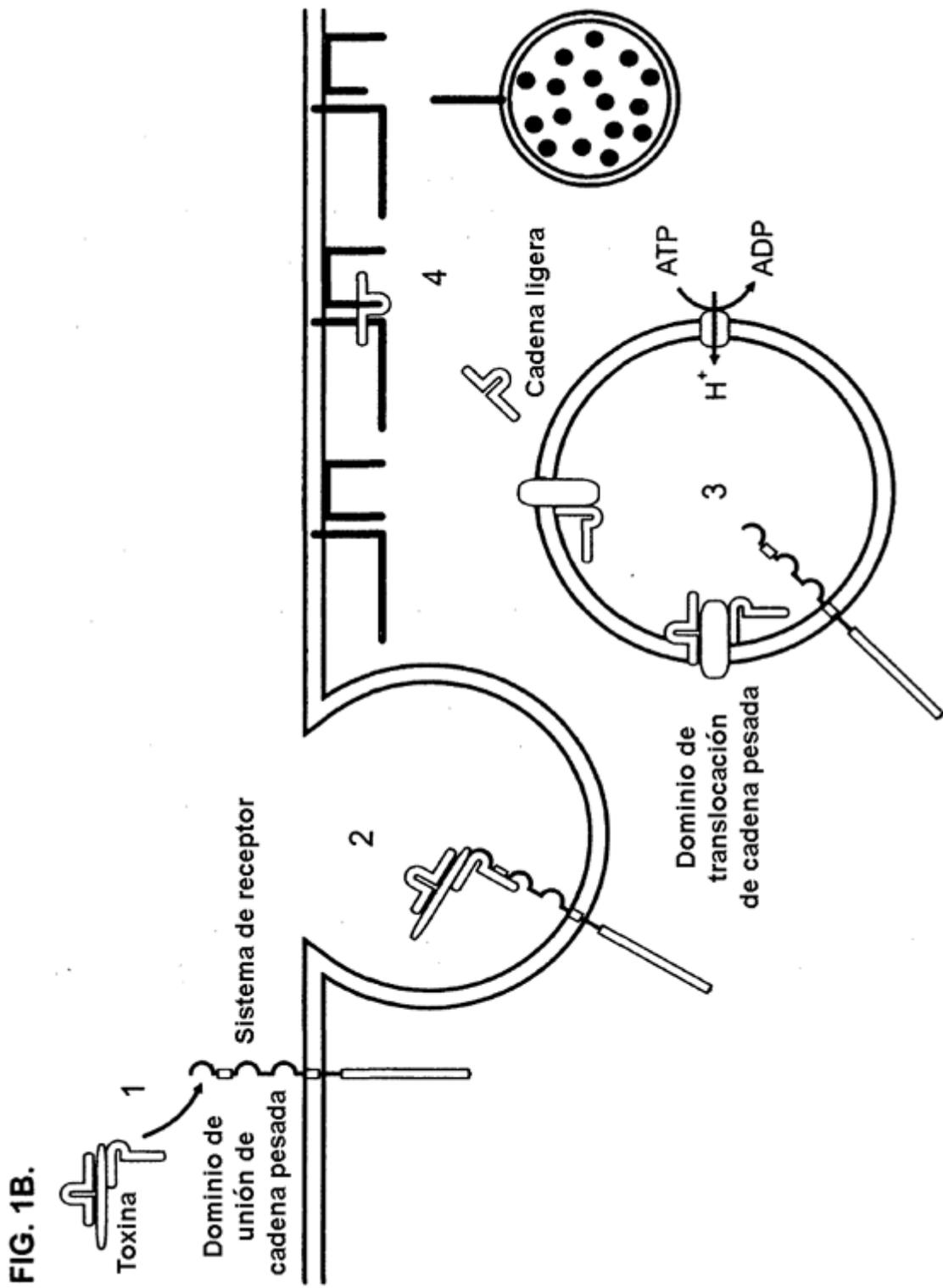
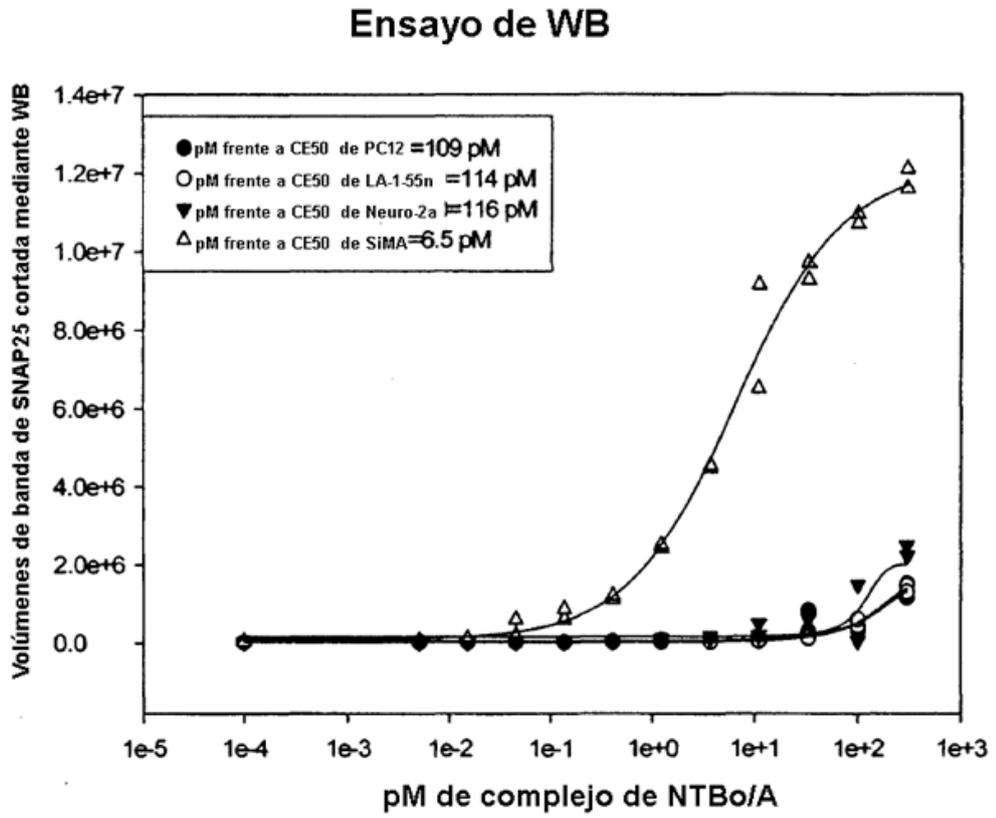


FIG. 2.

A



B

Relación señal-ruido	PC12	LA-1-55n	Neuro-2a	SiMa
300pM/0pM	107	121	184	412
1.2pM/0pM	3	2	6	85

FIG. 3.

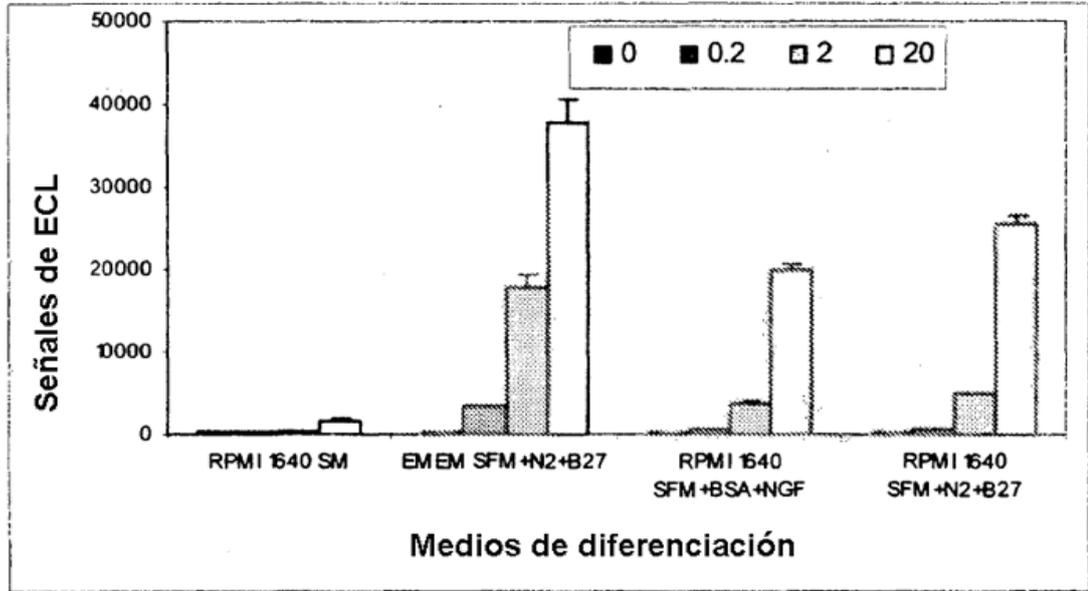


FIG. 4.

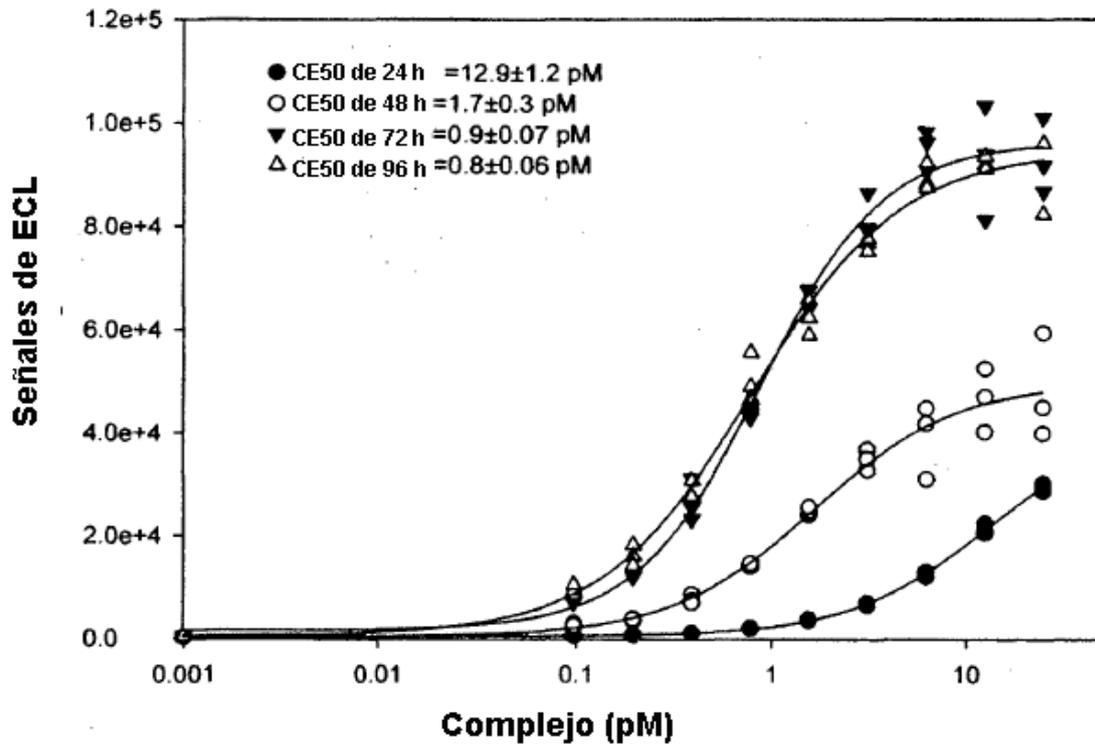


FIG. 5.

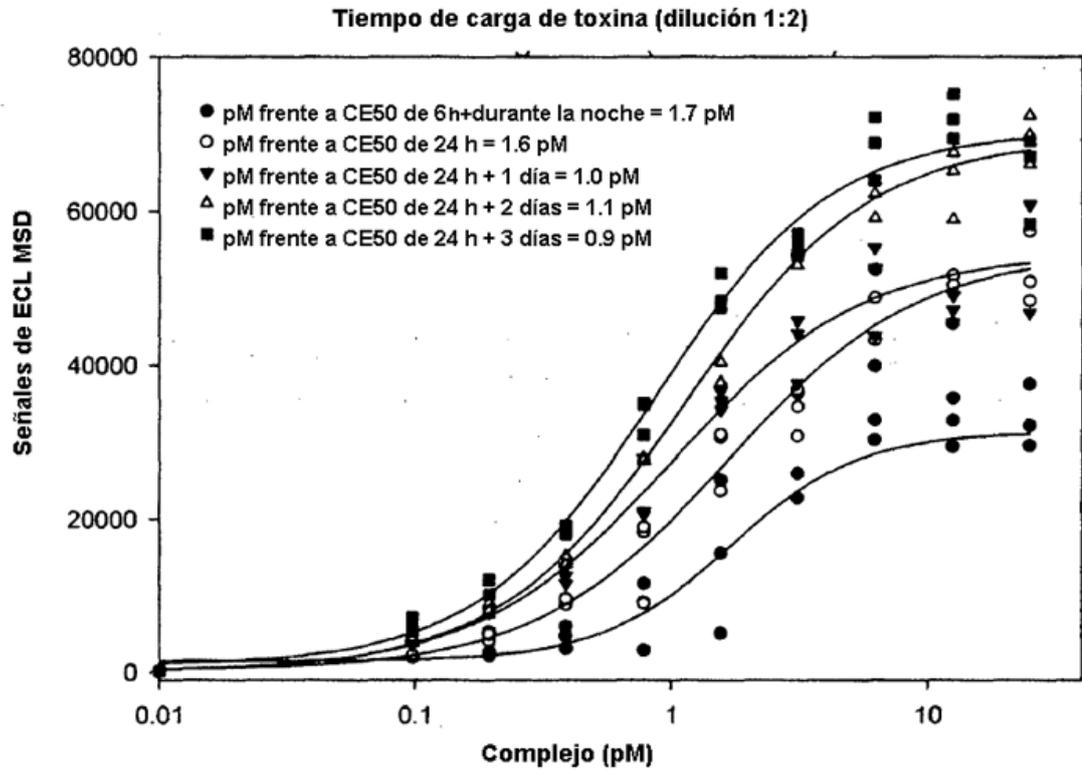


FIG. 6.

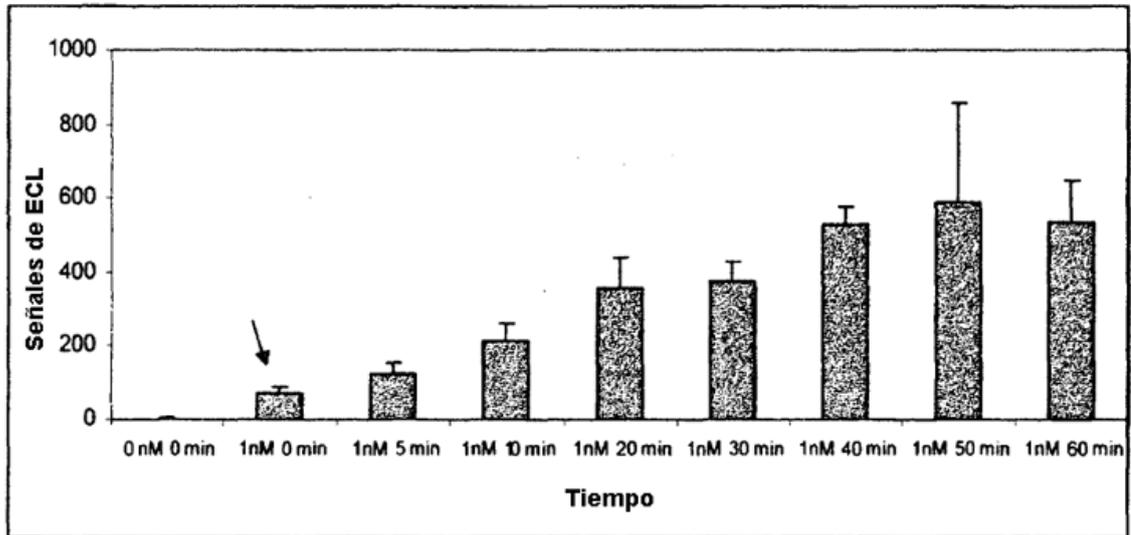


FIG. 7.

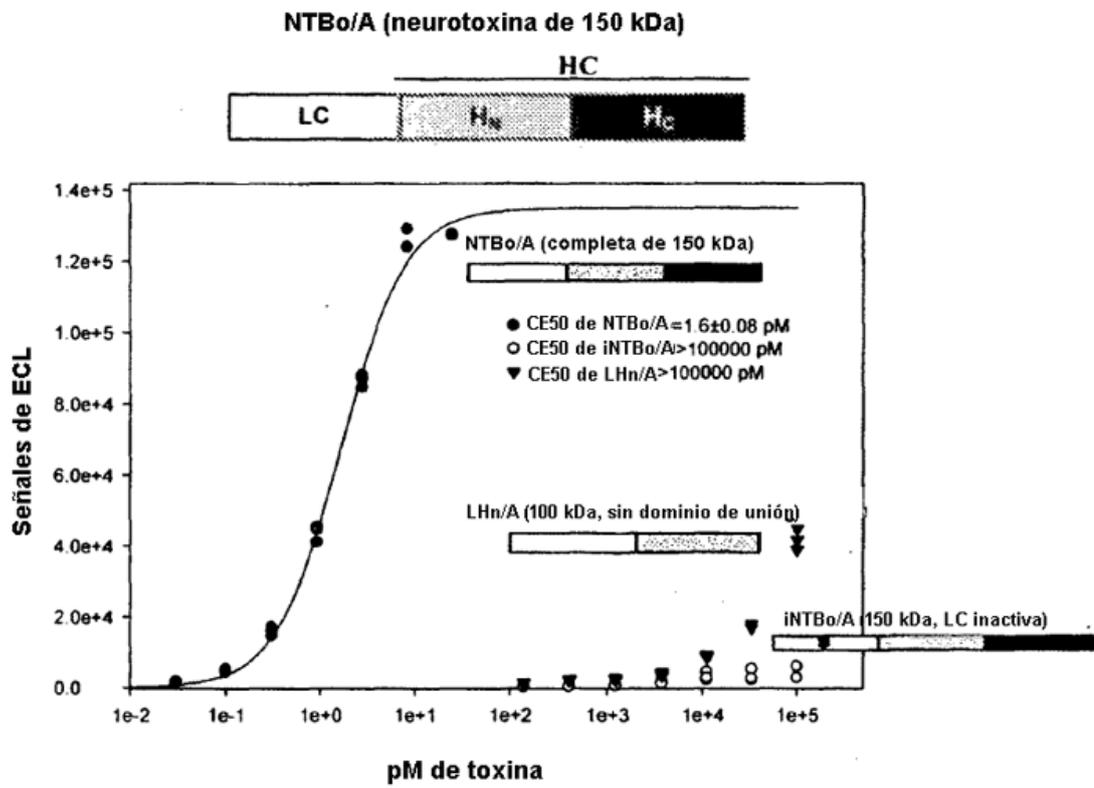


FIG. 8.

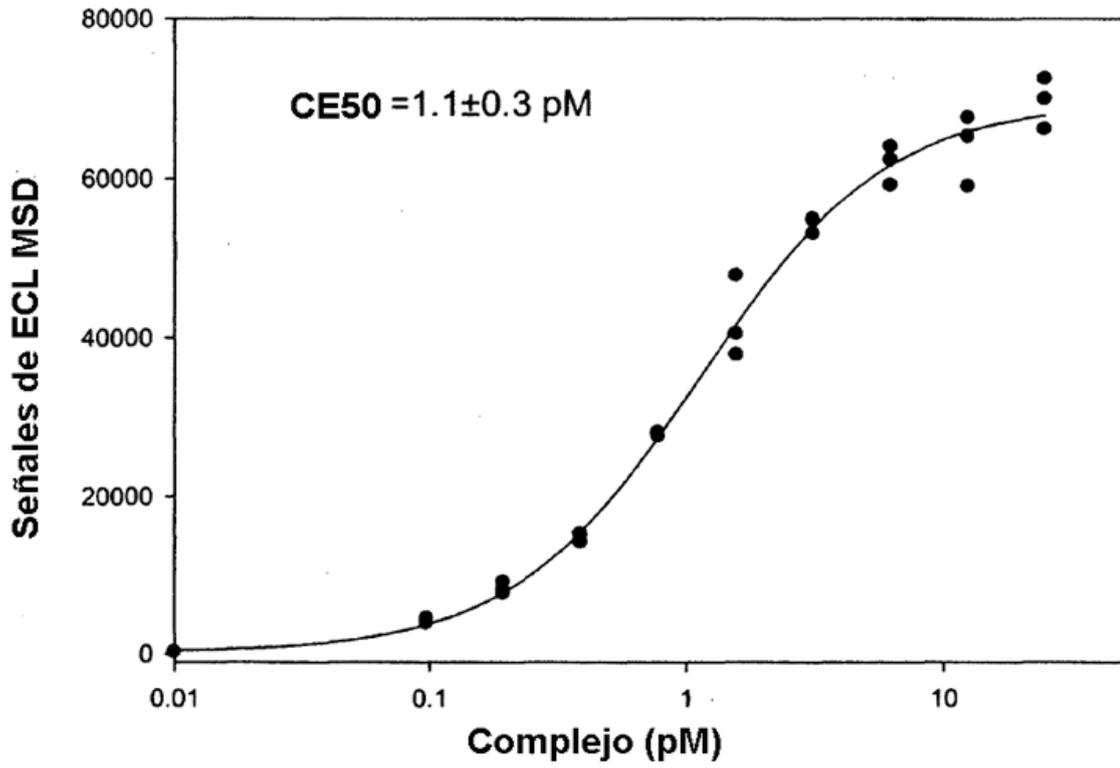


FIG.9.

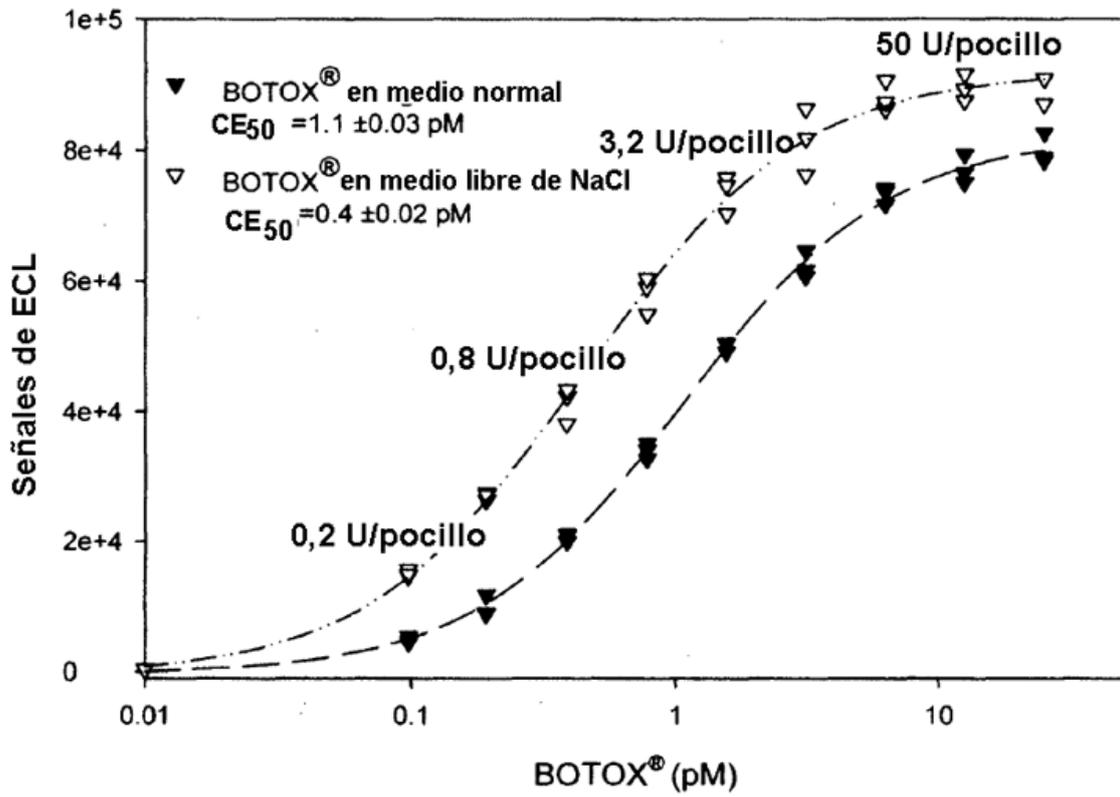


FIG. 10.

