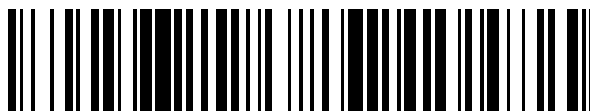


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 033**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)  
**C12N 9/50** (2006.01)  
**C12Q 1/37** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2010** E 17192861 (7)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019** EP 3281953

54 Título: **Ensayos de actividad de endopeptidasa redirigida basados en inmunología**

30 Prioridad:

**13.03.2009 US 160217 P**

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

**30.06.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WANG, JOANNE;**  
**ZHU, HONG;**  
**HODGES, D. DIANE y**  
**FERNANDEZ-SALAS, ESTER**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 770 033 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 endopeptidasa redirigida basados en inmunología

- 5 Las secuencias desveladas en la presente memoria descriptiva figuran en el listado de secuencia presentado como parte de la presente memoria descriptiva.

La capacidad de toxinas clostridiales, tales como: por ejemplo, Neurotoxinas botulínicas (BoNT), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F y BoNT/G y neurotoxina tetánica (TeNT), para inhibir la transmisión neuronal están siendo explotadas 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 en el mercado como composiciones farmacéuticas incluyen, preparaciones de BoNT/A, 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., Francfort, Alemania), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, Corea del Sur), BTX-A (Biogen-tech Ltd., University, Yantai, Shandong, China); y preparaciones de BoNT/B, como, por ejemplo, MYOBLOC®/NEUROBLOC® (Solstice Neurosciences, Inc., South San Francisco, CA). Como ejemplo, BOTOX® está aprobado actualmente en uno o más países para las siguientes indicaciones: acalasia, espasticidad adulta, fisura anal, dolor de espalda, blefaroespasmio, bruxismo, distonía cervical, temblor esencial, líneas del entrecejo o líneas faciales hiperkinéticas, dolor de cabeza, espasmo hemifacial, hiperactividad de la vejiga, hiperhidrosis, parálisis cerebral juvenil, esclerosis múltiple, trastornos mioclónicos, líneas nasolabiales, disfonía espasmódica, estrabismo y trastorno del nervio VII.

Un tratamiento de toxina de Clostridium inhibe neurotransmisores y la liberación de neuropéptidos interrumpiendo el proceso exocitótico utilizado para segregar los neurotransmisores y neuropéptidos en la hendidura sináptica. Existe un gran deseo por la industria farmacéutica de ampliar la utilización de toxinas clostridiales terapias más allá de sus aplicaciones actuales miorelajante para tratar una dolencia basada en los nervios sensoriales, tales como, por ejemplo, diversos tipos de dolor crónico, inflamación neurogénica y trastornos urogenitales, así como otros trastornos, tales como, por ejemplo, la pancreatitis. Un enfoque que actualmente está siendo explotado para ampliar terapias basadas en toxinas clostridiales implica la modificación de una toxina de *Clostridium*, de modo que la toxina modificada tenga una capacidad de dirigirse a una célula alterada para una célula neuronal o no-neuronal de interés. Llamadas endopeptidasa redirigida o Proteínas Moduladoras de Exocitosis Vesicular Dirigida (TVEMP), estas moléculas alcanzan sus efectos inhibidores de exocitosis utilizando un receptor diana presente en la célula diana neuronal o no neuronal de interés. Esta capacidad redirigida se consigue mediante la sustitución de un dominio de unión de origen natural de una toxina de Clostridium por un dominio director que muestra una actividad de unión selectiva para un receptor de toxina no Clostridial presente en una célula diana neuronal o no neuronal de interés. Tales modificaciones de un dominio de unión dan como resultado una molécula que es capaz de unirse selectivamente a un receptor de toxina clostridial presente en la célula diana. Una endopeptidasa redirigida puede unirse a un receptor diana, translocarse en el citoplasma y ejercer su efecto proteolítico sobre el complejo SNARE de la célula diana neuronal o no neuronal de interés.

Un grupo de endopeptidasa redirigida comprende moléculas que tienen un dominio de dirección a opiáceos. Estas endopeptidasas redirigidas a opiáceos comprenden un dominio de dirección a opiáceos, un dominio de translocación de toxinas clostridiales y un dominio enzimático de la toxina Clostridial. Se describen ejemplos no limitantes de endopeptidasa redirigida a opiáceos u opiáceo-TVEMP, por ejemplo, en los documentos Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, Patente de los E.E.U.U. 5.989.545; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Patente de los E.E.U.U. 7.132.259; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de los E.E.U.U. 7.244.437; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de los E.E.U.U. 7.413.742; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de los E.E.U.U. 7.415.338; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Patente de los E.E.U.U. 7.514.088; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, publicación de patente de los E.E.U.U. 2008/0064092; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, publicación de patente de los E.E.U.U. 2009/0035822; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, publicación de patente de los E.E.U.U. 2009/0048431; Keith A. Foster, *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, publicación de patente de los E.E.U.U. 2009US/0162341; Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2005/023309; y Lance E. Steward, *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente WO 2008/008805. El documento WO 96/33273 A1 menciona un anticuerpo que reconoce el producto de la proteólisis del SNAP-25 por la cadena L de BoNT/A y reconoce el recién revelado extremo carboxi del SNAP-25 escindido y menciona la utilización del anticuerpo en un transferencia de Western de muestras de células PC-12 incubadas con 10 mg/ml de un conjugado de NGF y LH<sub>N</sub> (Ejemplo 2). El documento U.S. 2004/0219619 A1 menciona un "anticuerpo anti-SNAP25<sub>197</sub> (Zymed #1 antisuero) que sólo reconoce el producto SNAP25 escindido" (Ejemplo 9). De manera similar Jones y col., *J Immunol Methods*, 329, n.º 1-2, 23.10.2007, págs. 92-101 no divulgan anticuerpos con alta especificidad/sensibilidad de unión. El documento WO 95/33850 divulga un anticuerpo diferente que es específico para un epítipo respectivo que comprende un residuo de glutamina C-terminal, con diferentes sensibilidades de unión.

Una diferencia general entre endopeptidasas redirigidas y toxinas clostridiales es que dado que las endopeptidasas redirigidas típicamente no se dirigen a las neuronas motoras, la letalidad asociada con la sobredosis de un mamífero con una endopeptidasa redirigida se minimiza, si no se evita completamente. Por ejemplo, endopeptidasas redirigidas a opiáceos pueden ser administradas a 10.000 veces la dosis terapéuticamente eficaz antes de que se observe evidencia de letalidad, y esta letalidad es debida a la difusión pasiva de la molécula y no a través del proceso de intoxicación. Por lo tanto, para todos los propósitos prácticos, las endopeptidasas redirigidas son moléculas no letales. Aunque esta propiedad no letal es de gran beneficio terapéutico, surge un problema de fabricación porque el ensayo de actividad estándar utilizado para la fabricación de productos biológicos basados en la toxina Clostridium es un bioensayo DL<sub>50</sub> en ratón, una prueba de letalidad. S. S. Arnon y col., JAMA 285: 1059-1070 (2001). Actualmente un bioensayo DL<sub>50</sub> en ratón es utilizado por todos los fabricantes de productos farmacéuticos para expresar la potencia de sus preparaciones de toxinas clostridiales. De hecho, las unidades de actividad de las toxinas clostridiales son unidades de DL<sub>50</sub> en ratón. Sin embargo, dado que las endopeptidasas redirigidas son esencialmente no-letales, no puede utilizarse un bioensayo DL<sub>50</sub> en ratón para evaluar la potencia de estas moléculas. Así, un ensayo de actividad sencillo, fiable, validado y aceptable por la agencia gubernamental que pueda evaluar la integridad de todas las etapas necesarias en la absorción de endopeptidasa redirigida sería de gran valor.

La presente memoria descriptiva proporciona nuevas composiciones, células y métodos para evaluar la actividad de las endopeptidasas redirigidas útiles para diversas industrias, tales como: por ejemplo, la industria farmacéutica y alimentaria y proporciona ventajas relacionadas. Estas composiciones, células y métodos no utilizan animales vivos o tejidos de animales vivos, pero pueden evaluar todas las etapas necesarias para la acción de endopeptidasa redirigida.

#### Descripción detallada de los dibujos

La figura 1 muestra un diagrama esquemático del actual paradigma de la liberación de neurotransmisores e intoxicación por toxina de Clostridium en una neurona central y periférica. La figura 1A muestra un diagrama esquemático para el mecanismo de liberación del neurotransmisor de una neurona central y periférica. El proceso de liberación puede ser descrito como comprendiendo dos etapas: 1) acoplamiento vesicular, donde la proteína SNARE unida a vesícula de una vesícula que contiene moléculas neurotransmisoras se asocia con las proteínas SNARE unidas a membrana localizadas en la membrana plasmática; y 2) liberación de neurotransmisores, donde la vesícula se fusiona con la membrana plasmática y las moléculas del neurotransmisor son exocitadas. La figura 1B muestra un diagrama esquemático del mecanismo de intoxicación para actividad de toxina tetánica y botulínica en una neurona central y periférica. Este proceso de intoxicación puede ser descrito como compuesto por cuatro etapas: 1) unión al receptor, donde la toxina clostridial toxina se une a un receptor Clostridial complejo e inicia el proceso de intoxicación; 2) internalización del complejo, donde después de la unión a la toxina, una vesícula que contiene un complejo de toxina/sistema receptor es se introduce por endocitosis en la célula; 3) translocación de cadena ligera, donde se cree que se producen múltiples eventos, incluidos los cambios en el pH interno de la vesícula, la formación de un poro del canal que comprende el dominio H<sub>N</sub> de la cadena pesada de la toxina de Clostridium, separación de la cadena ligera de la toxina de Clostridium de la cadena pesada y la liberación de la cadena ligera y 4), modificación de la diana enzimática donde la cadena ligera de la toxina de Clostridium escinde proteolíticamente sus sustratos SNARE diana, tales como, por ejemplo, SNAP-25, VAMP o sintaxina, evitando de este modo el acoplamiento vesicular y la liberación de neurotransmisores.

La figura 2 muestra una respuesta dosis completa a la endopeptidasa redirigida Noc/A en la línea celular clonal ORL-1Clon #6 que sobreexpresa ORL-1. La captación específica de Noc/A puede observarse en la línea celular clonal ORL-1Clon #6 que sobreexpresa ORL-1. El tratamiento con Noc/A (variante de nociceptina de ligando de unión LHN/A plus) y LHN/A (LC/A y HN sin ningún dominio de unión) realizada en la línea celular estable ORL-1 clon #6 en la prueba ELISA con ECL para SNAP-25<sub>197</sub> escindidos demostró que la captación de Noc/A es específica en esta línea celular clonal. La línea celular clonal también muestra gran sensibilidad por Noc/A con una CE<sub>50</sub> de 1,2 nM.

La figura 3 muestra una respuesta de la dosis completa de Noc/en los clones derivados de una única célula SK-N-DZ #3 y #22. La captación específica de Noc/A en clones SK-N-DZ #3 y #22 en comparación con LHN/A (n = 4 experimentos independientes). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de poli-D-lisina en RPMI SFM + N2 + B27 + NGF. El tratamiento con compuestos duró 22 horas. El ensayo ELISA con ECL para SNAP-25<sub>197</sub> escindido demostró que la captación de Noc/A es específica en esta línea celular clonal. Las líneas de células clonales también muestran gran sensibilidad por Noc/A con una CE<sub>50</sub> de 0,3 nM para el clon #3 y un Eco de 0,9 nM para el clon #22.

La figura 4 muestra los resultados de un ensayo ELISA con ECL en sándwich de clones 1C11, 4B7 y 4C9 de ORL1 CD7 tratados con endopeptidasa redirigida Noc/A. Los clones CD7 y ORL1 CD7 parentales fueron tratados durante 24 horas con Noc/A seguido de dos días de incubación. La CE<sub>50</sub> de ND7 parental no podía calcularse dado que sólo alcanzaba aproximadamente el 50% de escisión de SNAP-25<sub>197</sub>. Los clones 4B7 y 1C11 alcanzan más del 80% de escisión de SNAP-25<sub>197</sub>. Se calculó que los valores de CE50 eran de 5,7±0,5, 6,7±0,5 y 8,6±2 nM respectivamente.

La figura 5 muestra que anticuerpos policlonales anti-nociceptina pueden bloquear la captación de endopeptidasa redirigida Noc/a en las líneas celulares SK-N-DZ clon #3, clon #22, y AGN P33 ORL-1 clon #6. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de poli-D-lisina en RPMI SFM + N2 + B27 + NGF y se trataron durante 22 horas en medio libre de suero que contenía los anticuerpos policlonales anti-nociceptina a diferentes diluciones (0-3 µg/ml) en Noc/A 1 nM.

La figura 6 muestra que células del clon AF4 de SiMa y la línea celular establecida PC-12 fueron tratadas con la endopeptidasa redirigida Dyn/A a concentraciones de 0,017 nanómetros a 1 µM tal como se muestra en la imagen de transferencia de Western. Pudo observarse captación dependiente de la dosis para ambas líneas celulares.

La figura 7 muestra curvas BIAcore SPR normalizadas de 7,8 nM de los anticuerpos 2E2A6, 1D3B8, 3C1A5 y 2C9B10 y MC-6050 y MC-6053 comerciales. La figura 7A muestra los datos normalizados para la constante de asociación de cada anticuerpo. La figura 7B muestra los datos normalizados para la constante de disociación de cada anticuerpo.

### Descripción detallada

La presente memoria descriptiva proporciona novedosos ensayos para determinar la presencia o ausencia de una endopeptidasa redirigida activa en una muestra y para la determinación de la actividad/potencia de una endopeptidasa redirigida. Los novedosos ensayos basados en células divulgados en la presente memoria descriptiva dependen de las células, reactivos y métodos de detección que permiten al ensayo detectar cantidades nanomolares de endopeptidasa redirigida en una muestra. Los ensayos basados en células divulgados en la presente memoria descriptiva incluyendo el método y los anticuerpos de la invención tal como se reivindica sirven para analizar múltiples funciones de una endopeptidasa redirigida, es decir, endopeptidasa redirigida que se une a un receptor de superficie celular, internalización del complejo endopeptidasa-receptor, la translocación del dominio enzimático en el citoplasma, escisión del dominio enzimático del sustrato. Tal como se explica más adelante, los novedosos métodos y composiciones pueden utilizarse para analizar muestras impuras y a granel así como endopeptidasas redirigidas bicatenarias altamente purificadas y productos de endopeptidasa redirigida formulados y además son adaptables a formatos de ensayo automatizado de alto rendimiento. La presente invención se describe en las reivindicaciones.

Por lo tanto, uno aspecto desvelado en la presente memoria descriptiva proporciona composiciones que inducen una respuesta inmunitaria para la producción de anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un epítipo que comprende un producto de escisión de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión BoNT/A. Las composiciones que inducen una respuesta inmunitaria pueden comprender un adyuvante y una composición que induce una respuesta inmunitaria que incluye un antígeno de SNAP-25, un portador enlazado a un antígeno de SNAP-25, o un portador enlazado a un espaciador flexible enlazado a un antígeno de SNAP - 25, donde el enlazador flexible está entre el antígeno de SNAP - 25 y el portador. Está previsto que todos y cada uno de los antígenos de SNAP-25 que desencadenan una respuesta inmunitaria que producen un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede ser útil como un antígeno de SNAP-25, incluyendo, sin limitación, un antígeno de SNAP-25 derivado de un SNAP-25 de origen natural, un antígeno de SNAP-25 derivado de un SNAP-25 de origen no natural y un antígeno de SNAP - 25 que comprende un fragmento inmunorreactivo del SNAP-25, el SNAP-25 de un SNAP-25 de origen natural o un SNAP-25 de origen no natural. Los antígenos de SNAP-25 útiles para la producción de anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A incluyen, sin limitación, antígenos de SNAP-25 que comprenden un péptido de SNAP-25 que tiene una glutamina C-terminal carboxilada enlazada a un péptido portador, incluyendo, sin limitación SEQ ID NO: 38. Otras composiciones inductoras de respuesta inmunitaria útiles para preparar anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un epítipo SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A incluyen, sin limitación, una composición inductora de respuesta inmunitaria que comprende un portador enlazado a un enlazador flexible enlazado a un antígeno de SNAP-25, una glutamina C-terminal carboxilada, en la que el enlazador flexible se interpone entre el antígeno de SNAP-25 y el portador. Se prevé que todos y cada uno de los adyuvantes pueden ser útiles en dicha composición inductora de respuesta inmunitaria, incluyendo, sin limitación, polietilenglicol (PEG) monometoxipolietilenglicol (mPEG), alcohol polivinílico (PVA), adyuvante completo e incompleto de Freund.

Otro aspecto desvelado en la presente memoria descriptiva proporciona métodos para producir un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un epítipo que comprende un producto de escisión de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Los aspectos de este método comprenden las etapas de (a) administrar a un animal una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 desvelada en la presente memoria descriptiva; (b) recoger del animal una muestra que contiene un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 o una célula productora de anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25; y (c) aislar el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 de la muestra. Los métodos desvelados son útiles para preparar anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un epítipo que comprende un producto de escisión de SNAP-25 que tiene un

extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A o anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un epítipo que comprende un producto de escisión de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

5 Otro aspecto más desvelado en la presente memoria descriptiva proporciona los anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 incluyendo los anticuerpos tal como se reivindica que se unen selectivamente a un epítipo que comprende un SNAP-25 tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Dichos anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 incluyen anticuerpos tanto de origen natural como de origen no natural, así como anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 o anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25. Los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 útiles como anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que se unen selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, incluyen, sin limitación, los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 producidos a partir de líneas de células de hibridoma 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2.

15 Otro aspecto más desvelado en la presente memoria descriptiva proporciona métodos de detección de actividad endopeptidasa redirigida basados en inmunología. Los aspectos de este método comprenden las etapas de (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende un endopeptidasa redirigida, en la que la célula de una línea celular establecida son susceptible a la actividad de endopeptidasa redirigida por la endopeptidasa redirigida; (b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; (c) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 desvelado en la presente memoria descriptiva; y (d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad de endopeptidasa redirigida. El anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 de la etapa (c) opcionalmente puede enlazarse a un soporte de fase sólida.

20 Otro aspecto más desvelado en la presente memoria descriptiva proporciona métodos de base inmunológica de detección de actividad opioide-TVEMP. Los aspectos de este método comprenden las etapas de (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende endopeptidasa redirigida, en la que la célula de una línea celular establecida puede captar una endopeptidasa redirigida; (b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; (c) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 desvelado en la presente memoria descriptiva; y (d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad de endopeptidasa redirigida. El anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 de la etapa (c) opcionalmente puede enlazarse a un soporte de fase sólida.

30 Un aspecto adicional desvelado en la presente memoria descriptiva proporciona métodos de determinación de la inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en un mamífero. Los aspectos de este método comprenden las etapas de (a) añadir una endopeptidasa redirigida a una muestra obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos  $\alpha$  neutralizantes de endopeptidasa redirigida a; (b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra, en la que la célula de una línea celular establecida es susceptible a actividad de endopeptidasa redirigida; (c) aislar a partir de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; (d) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 desvelado en la presente memoria descriptiva; (e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; (f) repetir las etapas a-e con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de ensayo; y (g) comparar la cantidad del complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa (e) con la cantidad del complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa (f), en la que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa (e) con respecto a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectada en la etapa (f) es indicativa de la presencia de anticuerpos  $\alpha$  neutralizantes de endopeptidasa redirigida. El anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 de la etapa (d) opcionalmente puede enlazarse a un soporte de fase sólida. La muestra de control en la etapa (f) también puede incluir una muestra control positivo, además de la muestra de control negativo.

35 Las toxinas de Clostridium producidas por *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium baratii* y *Clostridium butyricum* son las más ampliamente utilizados en tratamientos terapéuticos y cosméticos de seres humanos y otros mamíferos. Las cepas de *C. botulinum* producen siete serotipos antigénicamente distintos de toxinas botulínicas (BoNT), que han sido identificados por la investigación de brotes de botulismo en el hombre (BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E y BoNT/F), animales (BoNT/C1 y BoNT/D), o aislado del suelo (BoNT/G). Aunque los siete serotipos de toxina botulínica tienen estructura y propiedades biológicas similares, también cada uno muestra características heterogéneas, tales como: por ejemplo, diferentes propiedades farmacológicas. En contraste, la toxina tetánica

(TeNT) es producida por un grupo uniforme de *C. tetani*. Otras dos especies de Clostridios, *C. baratii* y *C. butyricum*, también producen toxinas similares a BoNT/F y BoNT/E, respectivamente.

Las toxinas clostridiales son traducidas, cada una, como un polipéptido de cadena sencilla de aproximadamente 150 kDa que es posteriormente dividido por escisión proteolítica dentro de un bucle disulfuro por una proteasa de origen natural, tal como, por ejemplo, una proteasa de toxina de Clostridium endógena o una proteasa de origen natural producida en el medio ambiente. Este procesamiento postraduccional produce una molécula bicatenaria formada por una cadena ligera de aproximadamente 50 kDa (LC) y una cadena pesada de aproximadamente 100 kDa (HC) que se mantienen unidas por un único puente disulfuro e interacciones no covalentes. Cada molécula bicatenaria madura comprende tres dominios funcionalmente diferenciados: 1) un dominio enzimático localizado en la LC que incluye una región de metaloproteína que contiene una actividad endopeptidasa dependiente de zinc que está específicamente dirigida a componentes fundamentales del aparato de liberación del neurotransmisor; 2) un dominio de translocación contenido dentro de la mitad amino-terminal de la HC (H<sub>N</sub>) que facilita la liberación de la LC de vesículas intracelulares en el citoplasma de la célula diana; y 3) un dominio de unión descubierto dentro de la mitad carboxilo-terminal de la HC (H<sub>C</sub>) que determina la actividad de unión y la especificidad de unión de la toxina al complejo receptor ubicado en la superficie de la célula diana.

La unión, translocación y actividad enzimática de estos tres dominios funcionales son todos necesarios para la toxicidad. Aunque todos los detalles de este proceso no se conocen todavía con precisión, 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 tienen ningún deseo de quedar limitados por la siguiente descripción, el mecanismo de intoxicación puede ser descrito como que comprende como mínimo cuatro etapas: unión al receptor 1), 2) internalización del complejo, translocación de cadena ligera 3) y modificación de la diana enzimática 4) (figura 1). El proceso se inicia cuando el dominio HC de una toxina de Clostridium se une a un sistema receptor de específico de toxina ubicado en la superficie de la membrana plasmática de una célula diana. La especificidad de unión de un complejo receptor está pensada para conseguirse, en parte, mediante combinaciones específicas de los gangliósidos y receptores de proteínas que parecen comprender claramente cada complejo receptor de toxinas clostridiales. Una vez unido, los complejos toxina/receptor son internalizados por endocitosis y las vesículas internalizadas son clasificadas para las rutas intracelulares específicas. La etapa de translocación parece estar desencadenada por la acidificación del compartimento de la vesícula. Este proceso parece iniciar importantes reorganizaciones estructurales dependientes de pH que aumentan la hidrofobia, promueven la formación de poros y facilitan la separación de las cadenas pesadas y ligeras de la toxina. Una vez separadas, la endopeptidasa de cadena ligera de la toxina se libera de la vesícula intracelular en el citosol donde aparece dirigirse específicamente a componentes fundamentales del aparato de liberación del neurotransmisor. Estas proteínas fundamentales, proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP)/sinaptobrevina, proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa (SNAP-25) y syntaxina, son necesarias para el acoplamiento de la vesícula sináptica y la fusión en la terminación nerviosa y constituyen los miembros de la familia del receptor de la proteína de unión sensible a N-etilmaleimida soluble (SNARE). BoNT/A y BoNT/E escinden SNAP-25 en la región carboxilo terminal, liberando un fragmento de nueve o veintiséis aminoácidos, respectivamente, y BoNT/C1 también escinde a SNAP-25 cerca del extremo carboxilo liberando un fragmento de ocho aminoácidos. Los serotipos botulínicos BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F y BoNT/G y toxina tetánica, actúan sobre la parte central conservada de VAMP y liberar la parte amino terminal de VAMP en el citosol. BoNT/C1 escinde a syntaxina en un único sitio cerca de la superficie de la membrana citosólica. La proteólisis selectiva de SNARE sinápticas explica el bloque de liberación de neurotransmisores causado por las toxinas clostridiales in vivo. Las dianas de proteínas SNARE de toxinas clostridiales son comunes a la exocitosis en una variedad de tipos no neuronales; en estas células, al igual que en las neuronas, la actividad de peptidasa de cadena ligera inhibe la exocitosis, véase, por ejemplo, el documento de Yann Humeau y col., How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release, 82 (5) Biochimie. 427 - 446 (2000); Kathryn Turton y col., Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Structure, Function and Therapeutic Utility, 27 (11) Trends Biochem. Sci. 552 - 558. (2002); Giovanna Lalli y col., The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons, 11 (9) Trends Microbiol. 431 - 437, (2003).

Las endopeptidasas redirigidas generalmente sustituyen al sitio de escisión de proteasa del bucle bicatenario de origen natural por un sitio de escisión de proteasa exógena. Véase por ejemplo, Dolly, J.O. y col., Activatable Clostridial Toxins, patente de los E.E.U.U. 7.419.676. Aunque las endopeptidasas redirigidas varían en su peso molecular total debido al tamaño de la molécula directora, el proceso de activación y su dependencia de la escisión en el sitio de escisión exógeno para producir una molécula bicatenaria es esencialmente igual a la de toxinas clostridiales. Véase por ejemplo, Steward, L.E. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2009/0005313; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, Solicitud de patente de los E.E.U.U. 11/776.075; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0241881.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una composición inductora de respuesta inmunitaria para la producción de anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "composición inductora de 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 este modo anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. La expresión “respuesta inmunitaria” se refiere a cualquier respuesta por el sistema inmunitario de un animal a una composición inductora respuesta inmunitaria. Las respuestas inmunitarias ejemplares incluyen, aunque no se limitan a, inmunidad celular así como humoral local y sistémica, tales como: por ejemplo, Respuestas CTL, incluyendo la inducción específica de antígeno de CD8 + CTL, respuestas de células T auxiliares, incluyendo respuestas proliferativas del células T y liberación de citoquinas y las respuestas de células B incluyendo, por ejemplo, una respuesta que produce anticuerpos. La expresión “que induce una respuesta inmunitaria” se refiere a la administración de una composición inductora de respuesta inmunitaria o un polinucleótido que codifica la composición inductora de respuesta inmunitaria, donde una respuesta inmunitaria es afectada, es decir, estimulada, iniciada o inducida.

Una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “antígeno” se refiere a una molécula que desencadena una respuesta inmunitaria y que incluye, sin limitación, péptidos, polisacáridos y conjugados de lípidos, tales como: por ejemplo, lipoproteínas y glucolípidos. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “antígeno de SNAP-25” se refiere a cualquier antígeno que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A que puede provocar una respuesta inmunitaria. Un antígeno de SNAP-25 utilizado en una composición inductora de respuesta inmunitaria debe ser lo suficientemente grande como para ser sustancialmente único en secuencia, reduciendo de este modo la posibilidad de producir anticuerpos que sean reactivos de forma cruzada contra antígenos diferentes de SNAP-25. Además, un antígeno de SNAP-25 utilizado en una composición inductora de respuesta inmunitaria debe ser lo suficientemente pequeño para desencadenar solamente una respuesta inmunitaria sustancialmente contra un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, aumentando de este modo la posibilidad de producir anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden distinguir un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Además, también es muy deseable generar anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 de una única secuencia de aminoácidos con un buen rendimiento que sean selectivos de forma reproducible y que se unen con avidez aceptable para permitir el diseño de un ensayo altamente sensible.

La secuencia que rodea a un sitio de escisión de BoNT/A presente en SNAP-25 se indica como P<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>'-P<sub>3</sub>'-P<sub>4</sub>'-P<sub>5</sub>', con P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' representando el enlace escindible. Durante la escisión con endopeptidasa redirigida, los productos de escisión resultantes producidos comprenden un fragmento que incluye la secuencia P<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub> y un fragmento que incluye la P<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>'-P<sub>3</sub>'-P<sub>4</sub>'-P<sub>5</sub>'. De este modo, tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A” se refiere a cualquier SNAP-25 que tiene el residuo P<sub>1</sub> como su aminoácido carboxilo-terminal. Por ejemplo, Q<sub>197</sub>-R<sub>198</sub> de SNAP-25 humano (SEQ ID NO: 5) representa el enlace escindible P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' para el sitio de escisión de BoNT/A. Como tal, “SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo terminal del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A” sería cualquier producto de escisión de SNAP-25 que tiene una glutamina en su aminoácido carboxilo terminal donde la glutamina representa Q<sub>197</sub> del enlace escindible. Como otro ejemplo, K<sub>204</sub>-H<sub>205</sub> de SNAP-25 de *Torpedo marmorata* (SEQ ID NO: 16) representa el enlace escindible P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' para el sitio de escisión de BoNT/A. Como tal, “SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo terminal del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A” sería cualquier producto de escisión de SNAP-25 que tiene una lisina en su aminoácido carboxilo terminal donde la lisina representa K<sub>204</sub> del enlace escindible.

El antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A desde el sitio de escisión de BoNT/A puede ser modificado para mejorar la inmunogenia de un antígeno de SNAP-25, un hapteno, o cualquier otro compuesto antigénico es inmunógeno, no inmunógeno o débilmente inmunógeno cuando no se asocia a la modificación. En un aspecto de esta realización, el residuo P<sub>1</sub> carboxilo terminal residuos del enlace escindible de un antígeno de SNAP-25 pueden estar carboxilado. La carboxilación aumenta las propiedades inmunógenas deseadas de un antígeno de SNAP-25 en dos sentidos. En primer lugar, porque los aminoácidos cargados mejoran la inmunogenia, la adición de un grupo COO<sup>-</sup> al residuo carboxilo terminal aumentará la inmunogenia global de un antígeno de SNAP-25. En segundo lugar, porque el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A está en un estado cargado durante la escisión, la adición de un grupo COO<sup>-</sup> al residuo carboxilo terminal imitará mejor al antígeno real que los anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 desvelados en la presente memoria descriptiva que están diseñados para unirse selectivamente.

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 fijar el antígeno de SNAP-25 a una proteína transportadora, tal como, por ejemplo, un hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de la tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP). Por ejemplo, un residuo de cisteína puede colocarse en el extremo amino con el fin de conjugar la proteína portadora KLH.

Por lo tanto, una realización, un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace

escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener, por ejemplo, como mínimo 5, como mínimo 6, como mínimo 7, como mínimo 8, como mínimo 9, como mínimo 10, como mínimo 11, como mínimo 12, como mínimo 13, como mínimo 14, como mínimo 15, como mínimo 16, como mínimo 17, como mínimo 18, como mínimo 19, como mínimo 20, como mínimo 25 o como mínimo 30 aminoácidos de longitud. En otra realización, un antígeno de SNAP-25 tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener, por ejemplo, como máximo 5, como máximo 6, como máximo 7, 8 como máximo, 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. En otra realización más, un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, puede tener por ejemplo, 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 en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 33. En los aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38 o la SEQ ID NO: 39. En una realización adicional, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 40.

En otra realización más, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 41. En aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45, la SEQ ID NO: 46. En una realización adicional, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 47.

Está previsto que todos y cada uno de los antígenos de SNAP-25 que desencadenan una respuesta inmunitaria que produce anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede ser útil como antígeno de SNAP-25. Por lo tanto, variantes de la secuencia de aminoácidos que comprenden la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46 pueden ser útiles como antígeno de SNAP-25 para desencadenar una respuesta inmunitaria que produce anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. De este modo, en una realización, un antígeno de SNAP-25 puede sustituir como mínimo 1, como mínimo 2, como mínimo 3, como mínimo 4 o como mínimo 5 sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos a los antígenos de SNAP-25 que comprenden la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38 la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46. En otra realización más, un antígeno de SNAP-25 puede tener como mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con los antígenos de SNAP-25 que comprenden la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46.

Se prevé que uno o más portadores podrían estar enlazados a un antígeno de SNAP-25 para mejorar la inmunogenia de un antígeno de SNAP-25 que es inmunógeno, no inmunógeno o débilmente inmunógeno cuando no está asociado con el portador. Los ejemplos no limitantes, incluyen por ejemplo, una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de la 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 acoplado el antígeno a un portador. Diversos otros portadores y métodos para acoplar un antígeno a un portador son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*, 1998a; Harlow y Lane, *supra*, 1998b; y David W. Waggoner, Jr. y col., *Immunogenicity-enhancing Carriers and compositions thereof and methods of using the same*, publicación patente de E.E.U.U. N° 20040057958 (25 de marzo de 2004). También se pueden generar un epítipo expresando el epítipo como una proteína de fusión. Métodos para expresar las fusiones del polipéptido son bien conocidos por los expertos en la materia, tal como se describe, por ejemplo, en Ausubel y col. *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 P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, un portador debe estar enlazado al extremo amino del antígeno de SNAP-25.

Se prevé que uno o más espaciadores flexibles puedan estar enlazados a un antígeno de SNAP-25 con el fin de mejorar la inmunogenia de un antígeno de SNAP-25 que es inmunógeno, no inmunógeno o débilmente inmunógeno cuando no está asociado con los enlazadores flexibles. Un espaciador flexible aumenta la longitud peptídica total del antígeno de SNAP-25 y proporciona flexibilidad, facilitando la adecuada presentación del antígeno de SNAP-25 a las células inmunitarias. Como un ejemplo no limitante, una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-



25 puede comprender un antígeno de SNAP-25 enlazado a uno o más espaciadores flexibles en tándem para presentar mejor el antígeno de SNAP-25 a las células inmunitarias, facilitando así la respuesta inmunitaria.

5 Un espaciador flexible que comprende un péptido tiene como mínimo un aminoácido de longitud y comprende aminoácidos no cargados con grupos R de cadena lateral pequeña, tales como: por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina o serina. De este modo, en una realización un espaciador flexible puede tener, por ejemplo, como mínimo 1, como mínimo 2, como mínimo 3, como mínimo 4, como mínimo 5, como mínimo 6, como mínimo 7, como mínimo 8, como mínimo 9 o como mínimo 10 aminoácidos de longitud. En otra realización, un espaciador flexible puede tener, por ejemplo, como mínimo 1, 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. En otra realización más, un espaciador flexible puede tener, por ejemplo, entre 1-3 aminoácidos, entre 2-4 aminoácidos, entre 3-5 aminoácidos, entre 4-6 aminoácidos o entre 5-7 aminoácidos. Los ejemplos no limitantes de un espaciador flexible, por ejemplo, un espaciador G tal como GGG, GGGG (SEQ ID NO: 57) y GGGGS (SEQ ID NO: 58) o un espaciador A como AAA, AAAA (SEQ ID NO: 59) y AAAAV (SEQ ID NO: 60). Un espaciador flexible está enlazado en marco al antígeno de SNAP-25 como una proteína de fusión.

20 Tal como se ha descrito anteriormente, un espaciador flexible se utiliza, en parte, para aumentar la longitud total del péptido del antígeno de SNAP-25. Por ejemplo, un antígeno de SNAP-25 de 5-10 aminoácidos puede tener su longitud total incrementada enlazando un espacio flexible de 3-5 aminoácidos al extremo amino del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno de SNAP-25 de 5-10 aminoácidos puede tener su longitud total incrementada enlazando un espacio flexible de 4-6 del aminoácidos al extremo amino del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno de SNAP-25 de 5-10 aminoácidos puede tener su longitud total incrementada enlazando un espacio flexible de 7 a 10 aminoácidos al extremo amino del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno de SNAP-25 de 7-12 aminoácidos puede tener su longitud total incrementada enlazando un espacio flexible de 1 a 3 aminoácidos al extremo amino del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno de SNAP-25 de 7-12 aminoácidos puede tener su longitud total incrementada enlazando un espacio flexible de 4-6 aminoácidos al extremo amino del antígeno de SNAP-25. La mayor longitud proporcionada por el espaciador flexible permite la selección de un antígeno de SNAP-25 tamaño pequeño, lo que aumenta la probabilidad de que el antígeno de SNAP-25 sólo desencadenará una respuesta inmunitaria substancialmente contra un SNAP-25 tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> de enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, aumentando así la posibilidad de producir anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden distinguir un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

35 Se prevé que una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 desvelada en la presente memoria descriptiva opcionalmente puede comprender un antígeno de SNAP-25 desvelado en la presente memoria descriptiva y uno o más adyuvantes. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "adyuvante" cuando se utiliza en referencia a una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 se refiere a cualquier sustancia o mezcla de sustancias que aumenta o diversifica la respuesta inmunitaria a un antígeno de SNAP-25. Un adyuvante inductor de respuesta inmunitaria puede, por ejemplo, servir para reducir el número de inmunizaciones o la cantidad de antígeno necesaria para la inmunización protectora. La utilización de los adyuvantes inductores de respuesta inmunitaria en una composición inductora respuesta inmunitaria es bien conocida. El objetivo principal de estos adyuvantes es permitir un aumento en la respuesta inmunitaria. Los adyuvantes no limitantes incluyen, por ejemplo, liposomas, fases oleosas, incluyendo, sin limitación, el tipo de Freund de adyuvantes, tales como: por ejemplo, Adyuvante completo de Freund (FCA); Adyuvante incompleto de Freund (FIA); sapogenina glucósidos, tales como: por ejemplo, saponinas; Carbopol; N-acéilmuramilo-L-alanilo-D-isoglutamina (comúnmente conocida como Muramil dipéptido o "MDP"); y lipopolisacárido (LPS). Dichos adyuvantes son utilizados generalmente en forma de una emulsión con una fase acuosa o, más comúnmente, pueden consistir de sales inorgánicas insolubles en agua. Estas sales inorgánicas pueden consistir, por ejemplo, de hidróxido de aluminio, sulfato de zinc, hidróxido de hierro coloidal, fosfato de calcio o cloruro de calcio. El hidróxido de aluminio (Al (OH)<sub>3</sub>) es un coadyuvante utilizado habitualmente. En la actualidad, el único adyuvante aprobado por la FDA para utilización en seres humanos es sales de aluminio (alumbre) que se utilizan para los antígenos de "depósito" mediante la precipitación de los antígenos. Los adyuvantes proporcionados anteriormente son meramente ejemplares. De hecho, cualquier adyuvante inductor de respuesta inmunitaria puede utilizarse en una composición inductora de respuesta inmunitaria desvelada en la presente memoria descriptiva mientras el adyuvante cumpla las características necesarias para inducir una respuesta inmunitaria.

60 Un portador desvelado en la presente memoria descriptiva también puede actuar como adyuvante. Los adyuvantes y métodos específicos de fabricación y utilización se describirán en, por ejemplo, Gupta y col., Vaccine 11: 993-306, 1993; AMON, R. (Ed.) Synthetic Vaccines 1: 83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987; y David W. Waggoner, Jr. y col., *Immunogenicity-Enhancing Carriers and Compositions Thereof and Methods of Using the Same*, publicación patente de E.E.U.U. N° 20040057958 (25 de marzo de 2004). Los adyuvantes adicionales incluyen cualquier compuesto descrito en el capítulo 7 (págs 141-227) del documento "Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach" (eds. Powell, M. F. y Newman, J. M.) Pharmaceutical Biotechnology, volumen 6, Plenum Press (Nueva York). Los ejemplos de este compendio incluyen Muramil dipéptido (MDP) y Montanide 720. Moléculas tales como Poliinosina:Citosina (Poli me: C) o ADN plasmídico que contiene motivos CpG también puede administrarse

como adyuvantes en combinación con antígenos encapsulados en micropartículas. En otro ejemplo, el adyuvante es un agente que facilita la entrada del complejo antigénico en el citoplasma de una célula, tal como listeriolisina, estreptolisina o una mezcla de los mismos.

5 De este modo, en una realización, una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo terminal carboxilada enlazada a un péptido portador. En aspectos de esta realización, un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo terminal carboxilada comprende la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38 o la SEQ ID NO: 39. En otro aspecto de esta realización, un antígeno de SNAP-25  
10 comprende la SEQ ID NO: 40. En aspectos de esta realización, el péptido portador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de la tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP).

15 En otra realización, una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo terminal carboxilada enlazada a un péptido portador. En aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo terminal carboxilada comprende la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46. En otro aspecto de esta realización, un antígeno de SNAP-25 comprende la SEQ ID NO: 47. En aspectos de esta realización, el péptido portador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY),  
20 una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de la tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP).

25 En otra realización, una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina C-terminal carboxilada enlazada a uno o más enlazadores flexibles y un péptido portador en el que los enlazadores flexibles se interponen entre el antígeno de SNAP-25 y el péptido portador. En aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo terminal carboxilada comprende la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38 o la SEQ ID NO: 39. En otra realización, un antígeno de SNAP-25 comprende la SEQ ID NO: 46. En aspectos de esta realización, el péptido portador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de la tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP). En aspectos de esta realización, el enlazador flexible es un espaciador G o un espaciador A.  
30

35 En otra realización más, una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una lisina c-terminal carboxilada enlazada a un enlazador flexible y un péptido portador en el que el enlazador flexible se interpone entre el antígeno de SNAP-25 y el péptido portador. En aspectos de esta realización, el antígeno de SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo terminal carboxilada comprende la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46. En otro aspecto de esta realización, un antígeno de SNAP-25 comprende la SEQ ID NO: 47. En aspectos de esta realización, el péptido portador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovoalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de la tripsina de soja (STI) o un péptido de unión múltiple (MAP).  
40 En aspectos de esta realización, el enlazador flexible es un espaciador G o un espaciador A.

45 Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un método para producir anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede producirse mediante muy diversos métodos que son bien conocidos en la técnica. Protocolos específicos para preparar y utilizar los anticuerpos así como para detectar y medir la especificidad de unión del anticuerpo, afinidad de unión y avidéz de unión son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow y David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>a</sup> ed. 1998a); y USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL: PORTABLE PROTOCOL n° 1 (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998b); Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2001; and Current Protocols in Molecular Biology, 2004; David Anderson y col., *Therapeutic Polypeptides, Nucleic Acids Encoding Same, and Methods of Use*, Patente de los E.E.U.U. 7.034.132 (25 de abril de 2005); y Beatriz M. Carreño y col., *Antibodies Against CTLA4*, Patente de los E.E.U.U. 7.034.121 (25 de abril de 2006).  
50  
55

60 Como un ejemplo no limitante, anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 que se unen selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A pueden producirse inyectando a un animal, tal como: por ejemplo, un conejo, una cabra, un ratón u otro mamífero, con una o más inyecciones de una composición inductora de respuesta inmunitaria desvelada en la presente memoria descriptiva. Como otro ejemplo no limitante, anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 que se unen selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede producirse inyectando a un huevo, tal como: por ejemplo, un huevo de gallina, con una o más inyecciones de una composición inductora de respuesta inmunitaria desvelada en la presente memoria descriptiva. El título de anticuerpos en el animal inmunizado puede monitorizarse a lo largo del tiempo mediante técnicas estándar, tales como con una ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando antígeno inmovilizado o un ensayo basado en la  
65

actividad de la célula. Si se desea, los anticuerpos policlonales para un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A pueden aislarse los mamíferos (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas conocidas, como la cromatografía por afinidad a proteína A para obtener la fracción IgG, o purificación por afinidad contra el péptido utilizado para producir los anticuerpos.

Como otro no ejemplo limitante, el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede producirse utilizando un método de hibridoma. Por ejemplo, ver el capítulo 6 del documento Monoclonal Antibodies, págs. 196 244, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; y el capítulo 7 del documento Growing Hybridomas, págs. 245 - 282, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; y Delta, 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, es típicamente expuesto a una o varias inyecciones de un antígeno de SNAP-25 desvelado en la presente memoria descriptiva para activar a los linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que se unirán específicamente a un SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. El título de anticuerpos en el animal inmunizado puede monitorizarse a lo largo del tiempo mediante técnicas estándar, tales como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando antígeno inmovilizado o un ensayo basado en actividad celular. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro* utilizando una línea de cultivo celular adecuada. En el momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos son más altos, células productoras de anticuerpos se aíslan del animal. En general, se utilizan linfocitos de sangre periférica, si se desean células de origen humano, o se utilizan células del bazo o células de los ganglios linfáticos, si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Las células productoras de anticuerpos aisladas se fusionan con una línea celular inmortal utilizando un agente fusión conveniente, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Las líneas celulares inmortalizadas son generalmente células de mamíferos transformadas, particularmente células de mieloma de origen bovino, roedor y humano. Por lo general, una línea celular de mieloma murino se fusiona con esplenocitos recogidos de un ratón apropiadamente inmunizado para producir los hibridomas. Las líneas celulares inmortales preferidas: son líneas de células de mieloma de ratón que son sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Cualquiera de una serie de líneas celulares de mieloma puede utilizarse como un socio de fusión según las técnicas estándar, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x 63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan entonces utilizando medio HAT, que mata las células del mieloma no fusionadas y fusionadas de forma improductiva (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días en el cultivo porque no se transforman). El medio de cultivo en el que las células del hibridoma se cultivan pueden ensayarse entonces para la presencia de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 que se unen selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Por ejemplo, pueden cribarse sobrenadantes de hibridoma utilizando medios positivos  $\alpha$ -SNAP-25 en un ensayo de inmunoprecipitación, ensayo de unión *in vitro*, tal como, por ejemplo, un radioinmunoensayo (RIA) un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) o en un ensayo basado en la actividad celular. Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase el capítulo 11 del Immunoblotting, págs. 421 - 470, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; el Capítulo 12 del documento Immunoblotting, págs. 471 - 510, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; el Capítulo 14 del documento immunoassays, págs. 553 - 612, Harlow & Lane, *supra*, 1998a. Estudios adicionales pueden hacerse a continuación para determinar si el anticuerpo también es no reactivo con un SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. También se puede determinar la afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard. Véase, por ejemplo, Peter J. Munson y David Rodbard, ligando: A Versatile Computerized Approach For Characterization of Ligand- Binding Systems, 107 (1) Anal. Biochem. 220 - 239 (1980). Después de que las células de hibridoma deseadas se identifican, se utilizan procedimientos de dilución limitante para aislar clones procedentes de una sola célula hasta obtener una línea celular clonal que expresa el anticuerpo monoclonal deseado. Aquellos anticuerpos suficientemente selectivos para un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A y que se unen con avidez suficientemente alta son elegidos para estudio y caracterización adicionales.

Otra alternativa para la preparación de un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A es cribando una biblioteca combinatoria recombinante de la inmunoglobulina, tal como: por ejemplo, un biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos, con un péptido de SNAP-25 y miembros de la biblioteca de inmunoglobulina aislados que se unen a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Kits para la generación y el cribado de bibliotecas de presentación en fagos están disponibles en el mercado, tales como, por ejemplo el Recombinant Phage Antibody System (Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ); y el SurfZAP™ Phage Display Kit (Stratagene, La Jolla, California). Además, pueden encontrarse ejemplos de métodos y útiles en la generación y cribado de biblioteca de presentación de anticuerpos reactivos en, por ejemplo, los documentos Ladner y col patentes de Estados Unidos 5.223.409; Borrebaeck y col patente de E.E.U.U 5.712.089; Griffiths y col. patente de E.E.U.U 5.885.793; Griffiths y col. patente de E.E.U.U 5.962.255; McCafferty y col patente de E.E.U.U 5.969.108; Griffiths y col. patente de E.E.U.U 6.010.884; Jespers y col patente de E.E.U.U 6.017.732; Borrebaeck y col patente de E.E.U.U 6.027.930; Johnson y col patente de

E.E.U.U 6.140.471; McCafferty y col patente de E.E.U.U 6.172.197.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, recoger una muestra que contiene un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 o células productoras de anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "muestra que contiene un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 o células productoras de anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25" se refiere a cualquier sustancia biológica que contiene o contiene potencialmente como mínimo un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Se prevé que todas y cada una de las muestras que pueden contener un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede utilizarse en este método, incluyendo, sin limitación, sangre, plasma, suero y fluido linfático. También se prevé que cualquier célula capaz de producir un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede utilizarse en este método, incluyendo, sin limitación, células CD8, una célula CTL, una célula T auxiliar y una célula B. Diversos métodos bien conocidos pueden ser utilizados para recoger de un individuo una muestra que contiene el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 o células productoras de anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25, véase, por ejemplo, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; y Harlow & Lane, *supra*, 1998b. Del mismo modo, pueden utilizarse diversos métodos bien conocidos para procesar una muestra para aislar un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Un procedimiento para la recogida de una muestra puede seleccionarse en función del tipo de anticuerpo a aislar. Como un ejemplo no limitante, cuando se aísla un anticuerpo policlonal  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, una muestra adecuada puede ser una muestra de sangre que contienen tales anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25, mientras que cuando se aísla un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, una muestra adecuada puede ser una célula productora de anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 como una célula del bazo o hibridoma.

Los aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, aislar un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de la muestra. Métodos de aislar un dicho anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25, tales como: por ejemplo, los anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 que se unen selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A o anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 que se unen selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A son bien conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*, 1998a; y Harlow y Lane, *supra*, 1998b. Por ejemplo, dichos anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 pueden ser aislados de la muestra mediante técnicas conocidas, tales como, por ejemplo, cromatografía por afinidad utilizando la proteína A o proteína G, que proporcionan principalmente la fracción IgG del suero inmunitario. Posteriormente, o como alternativa, un antígeno específico de SNAP-25 puede ser inmovilizado en una columna o perlas magnéticas para purificar los anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 que se unen selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A mediante cromatografía por inmovilización. Un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede ser aislado del medio de cultivo o líquido ascítico mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxipatita, cromatografía por afinidad, diálisis o electroforesis en gel.

De este modo, en una realización, un método de producir un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende las etapas (a) administrar a un animal una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 que comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina c-terminal carboxilada enlazada a un péptido portador; (b) recoger del animal una muestra que contiene un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 o una célula productora de anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25; y (c) aislar el componente del anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 de la muestra. En un aspecto de esta realización, el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A es un anticuerpo policlonal. En otro aspecto de esta realización, el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A es un anticuerpo monoclonal. En otro aspecto de esta realización, un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A producido es un subtipo de IgG. En otros aspectos de esta realización, la composición que induce una respuesta inmunitaria de SNAP-25 comprende además un adyuvante, tal como: por ejemplo, Polietilenglicol (PEG), monometoxipolietilenglicol (mPEG) o alcohol polivinílico (PVA).

En otra realización, un método para producir anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A comprende

las etapas (a) administrar a un animal una composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 que comprende un péptido de SNAP-25 que tiene una glutamina c-terminal carboxilada enlazada a un enlazador flexible y un péptido portador en el que el enlazador flexible se interpone entre el péptido de SNAP-25 y el péptido portador; (b) recoger del animal una muestra que contiene un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 o células productoras de anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25; y (c) aislar el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 de la muestra. En un aspecto de esta realización, los anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A es un anticuerpo policlonal. En otro aspecto de esta realización, el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A es un anticuerpo monoclonal. En otro aspecto de esta realización, el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A producido en un subtipo de IgG. En otros aspectos de esta realización, composición inductora de respuesta inmunitaria de SNAP-25 comprende además un adyuvante, tal como: por ejemplo, Polietilenglicol (PEG), monometoxipolietilenglicol (mPEG) o alcohol polivinílico (PVA).

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 aislado, que incluye un anticuerpo según la invención, que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Tal como se utiliza 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 de origen natural como anticuerpos de origen no natural. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aislar" se refiere a separar una molécula de su ambiente natural mediante la utilización de la intervención humana. 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 una célula como un receptor de Ig, un anticuerpo lineal, un diacuerpo o un minicuerpo, mientras el fragmento exhiba la actividad biológica deseada y derivados de cadena sencilla de la misma. Un anticuerpo puede ser una molécula de inmunoglobulina de longitud completa que comprende los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, así como un dominio constante de cadena ligera (C<sub>L</sub>) y los dominios constantes de cadena pesada, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>, o un fragmento inmunológicamente activo de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, tal como: por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fc, un fragmento Fd, un fragmento Fv. Un anticuerpo puede obtenerse de cualquier especie de vertebrados (por ejemplo, ser humano, cabra, caballo, burro, ratón, rata, conejo o pollo) 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 (IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). Para divulgación general sobre la estructura de anticuerpos de origen natural, anticuerpos de origen no natural y fragmentos de unión a un compuesto antigénico, véase, 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*, 2<sup>a</sup> ed. (Oxford University Press, 1995).

Los anticuerpos de origen natural generalmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas de (H). Cada cadena ligera está enlazada a una cadena pesada por un puente disulfuro covalente, mientras que el número de puentes disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios equidistantes. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V<sub>H</sub>) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V<sub>L</sub>) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios de cadena ligera y de cadena pesada variables.

El sitio de completo reconocimiento del antígeno y de unión del antígeno 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<sub>H</sub>) y un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) en asociación estrecha, no-covalente. Cada dominio comprende de cuatro regiones marco (FR), que en gran medida adoptan una configuración de lámina  $\beta$ , conectados por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman, la estructura de la lámina  $\beta$ . Cada región hipervariable comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región determinante de complementariedad (CDR). Colectivamente, es la configuración tridimensional de las seis regiones CDR la que define un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> que confiere especificidad de unión del antígeno. Véase por ejemplo, Cyrus Chothia, y col., *Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions*, *Nature* 342(6252): 877-883 (1989); Elvin A. Kabat, y col. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. (1991). Los dominios constantes del anticuerpo no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Un antígeno diana general tiene uno o más sitios de unión, también llamados epítipos, que son reconocidos por el sitio de unión al antígeno formado en CDR. Tal como se utiliza en el presente documento, un "epítipo" es sinónimo de "determinante antigénico" y se refiere al sitio de un antígeno diana, tal como, por ejemplo, un péptido,

polisacárido o molécula que contienen lípidos, capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de células T o de interactuar de otra manera con una molécula. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítipo diferente tiene una estructura diferente. Por lo tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente.

5 Anticuerpos policlonales se refieren a una población heterogénea de moléculas de anticuerpo que contienen como mínimo dos especies de anticuerpos capaces de unirse a un antígeno particular. Por definición, un anticuerpo policlonal incluye dos anticuerpos diferentes que se unen a como mínimo dos epítopos diferentes. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" o "anticuerpos monoclonales" se refieren a una población sustancialmente homogénea de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie de anticuerpos capaces de unirse a un antígeno particular, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades secundarias. Por definición, un anticuerpo monoclonal se une a un único epítipo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con los anticuerpos policlonales, cada anticuerpo monoclonal es dirigido contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que ellos pueden ser sintetizados sin contaminar por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que requiere la producción de anticuerpos por cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán según la presente divulgación podrán prepararse mediante el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y col (1975) Nature 256: 495, o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo: La Patente de E.E.U.U. N° 4.816.567; Patente de E.E.U.U. N° 5.807.715). Los anticuerpos monoclonales también pueden ser aislados de bibliotecas de anticuerpos fago utilizando las técnicas descritas en Clackson y col (1991) Nature, 352:624 - 628; Marks y col (1991) J. Mol. Biol., 222:581 - 597; por ejemplo.

25 El anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 es tal como se define en las reivindicaciones.

30 En otra realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se une específicamente a un epítipo que comprende un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. En un aspecto de esta realización, el epítipo comprende la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36 o la SEQ ID NO: 37. En un aspecto de esta realización, el epítipo comprende la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43 o la SEQ ID NO: 44.

35 Tal como se ha descrito anteriormente, la secuencia que rodea a un sitio de escisión de BoNT/A presente en SNAP-25 se denota como P<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>'-P<sub>3</sub>'-P<sub>4</sub>'-P<sub>5</sub>', con P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' representando el enlace escindible. Durante la escisión de BoNT/A, los productos de escisión resultantes producidos comprenden un fragmento que incluye la secuencia P<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub> y un fragmento que incluyen la secuencia P<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>'-P<sub>3</sub>'-P<sub>4</sub>'-P<sub>5</sub>'. Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que se unen selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A" se refiere a un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a cualquier fragmento del producto de escisión de SNAP-25 compuesto por la secuencia P<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>, pero no a cualquier fragmento del producto de escisión de SNAP-25 compuesto por la secuencia P<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>'-P<sub>3</sub>'-P<sub>4</sub>'-P<sub>5</sub>' o a cualquier SNAP-25 que tiene un enlace escindible P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' intacto de un sitio de escisión de BoNT/A. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25197" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente a un SNAP-25 que tiene un residuo P<sub>1</sub> en el extremo carboxilo que corresponde a la glutamina 197 de SEQ ID NO: 5. tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25204" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente a un SNAP-25 teniendo un residuo P<sub>1</sub> en el extremo carboxilo que corresponde a la lisina 204 de la SEQ ID NO: 16.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "selectivamente" se refiere a tener un efecto único o influencia o reaccionar de una sola manera o con una sola cosa. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "se une selectivamente", o "unión selectiva" cuando se emplea en referencia a un anticuerpo, se refiere a la unión discriminatoria del anticuerpo al epítipo diana indicado de modo que el anticuerpo no reaccione de forma cruzada substancialmente con epítopos no diana. El tamaño mínimo de un epítipo peptídico, tal como se define en el presente documento, es aproximadamente cinco aminoácidos, y un epítipo peptídico típicamente comprende como mínimo 5, como mínimo 6, como mínimo 7, como mínimo 8, como mínimo 9, como mínimo 10, como mínimo 15 o como mínimo 20 aminoácidos. Un epítipo peptídico puede ser discontinuo, es decir, comprende residuos de aminoácidos que no son adyacentes en la estructura primaria del péptido sino que se reúnen en un epítipo a través de la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria del péptido. Además, también se observa que un epítipo podría comprender una parte de una molécula que no sea una secuencia de aminoácidos, como, por ejemplo, un grupo de hidratos de carbono, un resto lipídico como lipoproteínas o glucolípidos o un resto de aminoácidos modificados químicamente como un aminoácido fosforilado. En aspectos de esta realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A que comprende como mínimo 5, como mínimo 6, como mínimo 7, como mínimo 8, como mínimo 9, como mínimo 10, como mínimo 15 o como mínimo 20

aminoácidos. En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/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. Véase David J. King, *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies*, págs. 240 (1998). La afinidad de unión se refiere al periodo de tiempo que los anticuerpos residen en su sitio de unión al epítipo y puede considerarse como la fuerza con la que un anticuerpo une su epítipo. La afinidad de unión puede describirse como la constante de disociación de en equilibrio de un anticuerpo (K<sub>D</sub>), que se define como la relación K<sub>d</sub>/K<sub>a</sub> en equilibrio. Donde K<sub>a</sub> es la constante de velocidad de asociación del anticuerpo y K<sub>d</sub> es la constante de velocidad de disociación del anticuerpo. La afinidad de unión se determina por la asociación y la disociación y en solitario ni una asociación alta o una baja disociación puede asegurar alta afinidad. La constante de velocidad de asociación (K<sub>a</sub>), o constante de asociación (K<sub>on</sub>), mide el número de eventos de unión por unidad de tiempo, o la propensión de los anticuerpos y los antígenos a asociarse de forma reversible en su complejo antígeno-anticuerpo. La constante de velocidad de asociación se expresa en M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> y se simboliza como sigue: [Ab] x [Ag] x K<sub>on</sub>. Cuanto mayor sea la constante de velocidad de asociación, más rápidamente se une el anticuerpo a su antígeno, o mayor será la afinidad de unión entre el antígeno y el anticuerpo. La constante de velocidad de disociación (K<sub>d</sub>) o constante de disociación (K<sub>off</sub>), mide el número de eventos de disociación por unidad de tiempo o la propensión de un complejo antígeno-anticuerpo a separarse (disociarse) de forma reversible en sus componentes moleculares, es decir el anticuerpo y el antígeno. La constante de velocidad de disociación se expresa en s<sup>-1</sup> y se simboliza como sigue: [Ab + Ag] x K<sub>off</sub>. Cuanto menor sea la constante de velocidad de disociación, más fuertemente unido está el anticuerpo a su antígeno, o mayor será la afinidad de unión entre el antígeno y anticuerpo. La constante de disociación en equilibrio (K<sub>D</sub>) mide la velocidad a la cual se formaron nuevos complejos antígeno-anticuerpo es igual a la velocidad a la que los complejos anticuerpo-antígeno se disocian en equilibrio. La constante de disociación en equilibrio se expresa en M y se define como K<sub>off</sub>/K<sub>on</sub> = [Ab] x [Ag]/[Ab + Ag], donde [Ab] es la concentración molar del anticuerpo, [Ag] es la molar concentración del antígeno y [Ab + Ag] es la concentración molar del complejo antígeno-anticuerpo, donde están todas las concentraciones de dichos componentes cuando el sistema está en equilibrio. Cuanto menor sea la constante de disociación en equilibrio, más fuertemente unido está el anticuerpo a su antígeno, o mayor será sea la afinidad de unión entre el antígeno y anticuerpo.

De este modo, en una realización, la afinidad de unión de un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación de, por ejemplo, menos de 1 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, menos de 1 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, menos de 1 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, o menos de 1 x 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación de, por ejemplo, más de 1 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> más de 1 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, más de 1 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, o más de 1 x 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. En otros aspectos, la afinidad de unión de un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación entre 1 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 1 x 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 1 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 1 x 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 1 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 1 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> o 1 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 1 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de disociación de menos de 1 x 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>, menos de 1 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, o menos de 1 x 10<sup>-5</sup> s<sup>-1</sup>. En otros aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de disociación de, por ejemplo, menos de 1,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, menos de 2,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, menos de 3,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, menos de 4,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, menos de 5,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, menos de 6,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, menos de 7,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, menos de 8,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, o menos de 9,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>. En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de disociación de, por ejemplo, más de 1 x 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>, más de 1 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, o más de 1 x 10<sup>-5</sup> s<sup>-1</sup>. En otros aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de disociación de por ejemplo, más de 1,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, más de 2,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, más de 3,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, más de 4,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, más de 5,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, más de 6,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, más de 7,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, más de 8,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, o más de 9,0 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>.

En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de disociación en equilibrio del menos de 0,500 nM. En aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo

carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de disociación en equilibrio de por ejemplo, menos de 0,500 nM, menos 0,450 nM, menos 0,400 nM, menos 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  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de disociación en equilibrio de más de 0,500 nM. En aspectos de esta realización, la afinidad de unión de un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de disociación en equilibrio de, por ejemplo, más de 0,500 nM, más de 0,450 nM, más 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.

En otra realización más, la afinidad de unión de un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación para el SNAP-25 intacto 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  $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , o menos de  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . En otra realización, la afinidad de unión de un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación para el SNAP-25 intacto 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  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

La 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 en comparación con la velocidad de asociación  $K_{on}$  del anticuerpo para una molécula que no contiene ese epítipo. Por ejemplo, comparando la constante de velocidad de asociación ( $K_a$ ) de un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A en relación con un SNAP-25 que no comprende ese epítipo, tal como: por ejemplo, un epítipo de SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A o un epítipo SNAP-25 que tiene un enlace escindible P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' de un sitio de escisión de BoNT/A. En aspectos de esta realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación ( $K_a$ ) para un SNAP-25 que no comprende su epítipo 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  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación ( $K_a$ ) para un SNAP-25 que no comprende su epítipo 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  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación ( $K_a$ ) para su epítipo con respecto a un SNAP-25 que no comprende el epítipo de, por ejemplo, como mínimo 2 veces más, más como mínimo 3 veces más, como mínimo 4 veces más, como mínimo 5 veces más, como mínimo 6 veces más, como mínimo 7 veces más, como mínimo 8 veces más o como mínimo 9 veces más. En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación ( $K_a$ ) para su epítipo con respecto a un SNAP-25 que no comprende ese epítipo de, por ejemplo, como mínimo 10 veces más, como mínimo 100 veces más, como mínimo 1000 veces más, como mínimo 10.000 veces más. En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación ( $K_a$ ) para su epítipo con respecto a un SNAP-25 que no comprende el 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. En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación ( $K_a$ ) para su epítipo en relación con un SNAP-25 que no comprende el epítipo de, por ejemplo, como máximo 10 veces más, como máximo 100 veces más, como máximo 1000 veces más o como máximo 10.000 veces más.

La especificidad de unión de un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede también ser caracterizada como una relación que dicho un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 puede discriminar su epítipo SNAP-25 con respecto a un SNAP-25 que no comprende ese epítipo, tal como, por ejemplo, un epítipo de SNAP-25 que carece



de un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A o un epítipo de SNAP-25 que tiene un enlace escindible P<sub>-1</sub>-P<sub>1</sub>' intacto de un sitio de escisión de BoNT/A. En aspectos de esta realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una relación de especificidad de unión para su epítipo de SNAP-25 con respecto a un SNAP-25 que no comprende ese epítipo de por ejemplo, como mínimo 2:1, como mínimo 3:1, como mínimo 4:1, como mínimo 5:1, como mínimo 64:1, como mínimo 7:1, como mínimo 8:1, como mínimo 9:1, como mínimo 10:1, como mínimo 15:1, como mínimo 20:1, como mínimo 25:1, como mínimo 30:1, como mínimo 35:1, o como mínimo 40:1. En otros aspectos más de esta realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> de la enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una relación de especificidad de unión para su epítipo de SNAP-25 con respecto a un SNAP-25 que carece de un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de por ejemplo, como mínimo 2:1, como mínimo 3:1, como mínimo 4:1, como mínimo 5:1, como mínimo 6:1, como mínimo 7:1, como mínimo 8:1, como mínimo 9:1, como mínimo 10: 1, como mínimo 15:1, como mínimo 20:1, como mínimo 25:1, como mínimo 30:1, como mínimo 35:1, o como mínimo 40:1. En otros aspectos más de esta realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A tiene una relación de especificidad de unión para su epítipo de SNAP-25 con respecto a un SNAP-25 con un enlace escindible P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' intacto de un sitio de escisión de BoNT/A, de por ejemplo, como mínimo 2:1, como mínimo 3:1, como mínimo 4:1, como mínimo 5:1, como mínimo 64:1, como mínimo 7:1, como mínimo 8:1, como mínimo 9:1, como mínimo 10:1, como mínimo 15:1, como mínimo 20:1, como mínimo 25:1, como mínimo 30:1, como mínimo 35:1 o como mínimo 40:1.

La avidéz de unión, también conocida como afinidad funcional, se refiere a la suma total de la fuerza de unión funcional entre su antígeno y un anticuerpo multivalente. 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 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 dado que deben romperse simultáneamente para que el anticuerpo se disocie completamente todas las interacciones antígeno-anticuerpo. Se prevé que un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A pueda unirse selectivamente a todos y cada uno de los epítipos para ese anticuerpo.

De este modo, en una realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 es un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. En aspectos de esta realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 es un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo terminal o un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo terminal. En otros aspectos de esta realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 es un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un residuo P<sub>1</sub> en el extremo carboxilo que corresponde a la glutamina 197 de SEQ ID NO: 5 o un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo SNAP-25 teniendo un residuo P<sub>1</sub> en el extremo carboxilo que corresponde a la lisina 204 de la SEQ ID NO: 16. En otros aspectos más de esta realización, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 es un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene una secuencia de aminoácidos carboxilo terminal de la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un método basado en inmunología de detectar actividad endopeptidasa redirigida que incluye un método de la invención según lo definido por las reivindicaciones. Los métodos basados en inmunología desvelados en la presente memoria descriptiva pueden evaluarse mediante varios parámetros incluyendo, por ejemplo, exactitud, precisión, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), intervalo, especificidad, selectividad, linealidad, robustez y adecuación del sistema. La exactitud de un método es la medida de la exactitud de un método analítico o la cercanía del acuerdo 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 acuerdo entre los resultados de las pruebas 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 en días (repetibilidad); y 3) la variabilidad entre días (precisión intermedia); y 4) variabilidad entre laboratorios (reproducibilidad). El coeficiente de variación (CV %) es una medida cuantitativa de la precisión expresada en relación con el valor observado o teórico.

Un método basado en la inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva debe ser capaz de detectar, sobre el fondo, la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que comprende un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/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 en blanco y representa la menor concentración de analito que puede distinguirse del

fondo.

De este modo, en una realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva puede detectar el LOD de endopeptidasa redirigida en una cantidad que es significativamente diferente de un control negativo o en blanco. En el aspecto de esta realización, el método basado en inmunología, desvelado 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 endopeptidasa redirigida. En todavía aspectos más de esta realización, el método basado en inmunología desvelado 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 endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado 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 endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado 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 endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado 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 endopeptidasa redirigida.

En otro aspecto de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de por ejemplo, 100 nM o menos o menos, 90 nM o menos o menos, 80 nM o menos o menos, 70 nM o menos o menos, 60 nM o menos o menos, 50 nM o menos o menos, 40 nM o menos o menos, 30 nM o menos o menos, 20 nM o menos o menos, 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 endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado 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 endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado 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 endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de por ejemplo, 10 pM o menos endopeptidasa redirigida, 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 endopeptidasa redirigida.

Los límites de cuantificación (LOQ) son las más bajas y las más altas concentraciones de analito en una muestra o espécimen que se pueden medir con un nivel aceptable de exactitud y precisión. El límite inferior de cuantificación se refiere a la dosis más baja que un método de detección puede medir consistentemente desde el fondo. El límite de cuantificación es la dosis más alta que un método de detección puede medir constantemente antes de que se produzca la saturación de la señal. El intervalo lineal del método es el área entre los límites inferiores y superiores de cuantificación. El intervalo lineal se calcula restando el límite inferior de cuantificación del límite superior de cuantificación. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "relación señal a ruido para la asíntota inferior" se refiere a la señal detectada en el método en el límite inferior de detección dividido por la señal de fondo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "relación señal a ruido para la asíntota superior" se refiere a la señal detectada en el método en el límite superior de detección dividida por la señal de fondo.

De este modo, en una realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva puede detectar el LOQ de endopeptidasa redirigida en una cantidad que es significativamente diferente de un control negativo o en blanco. En el aspecto de esta realización, el método basado en inmunología desvelado 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 endopeptidasa redirigida. En otros aspectos más de esta realización, el método basado en inmunología desvelado 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 endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado 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 endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado 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 endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado 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, 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 endopeptidasa redirigida.

En otro aspecto de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva

5 tiene un LOQ de por ejemplo, 100 nM o menos o menos, 90 nM o menos o menos, 80 nM o menos o menos, 70 nM o menos o menos, 60 nM o menos o menos, 50 nM o menos o menos, 40 nM o menos o menos, 30 nM o menos o menos, 20 nM o menos o menos, 10 nM o menos o menos, 9 nM o menos o menos, 8 nM o menos o menos, 7 nM o menos o menos, 6 nM o menos o menos, 5 nM o menos o menos, 4 nM o menos o menos, 3 nM o menos o menos, 2 nM o menos o menos, o 1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado 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 endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado 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 endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de por ejemplo, 10 pM o menos de una endopeptidasa redirigida, 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 endopeptidasa redirigida.

15 Un ensayo basado en inmunología útil para poner en práctica un aspecto de los métodos desvelados debe tener una precisión de no más del 50%. En los aspectos de esta realización, un ensayo basado en inmunología 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 basado en inmunología 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 basado en inmunología tiene una precisión de no más del 4%, no más del 3%, no más del 2%, o no más del 1%.

20 Un ensayo basado en inmunología útil para poner en práctica un aspecto de los métodos desvelados debe tener una precisión de como mínimo el 50%. En aspectos de esta realización, un ensayo basado en inmunología tiene una precisión de como mínimo el 50%, como mínimo el 60%, como mínimo el 70% o como mínimo el 80%. En otros aspectos de esta realización, un ensayo basado en inmunología tiene una precisión de como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95%. En otros aspectos de esta realización, un ensayo basado en inmunología tiene una precisión de como mínimo el 96%, como mínimo el 97%, como mínimo el 98% o como mínimo el 99%.

25 Un método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva debe tener una relación señal a ruido para la asíntota inferior que es estadísticamente significativa y una relación señal a ruido para la asíntota superior que es estadísticamente significativa. En aspectos de esta realización, un método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva tiene una relación señal a ruido para la asíntota inferior de por ejemplo, como mínimo 3:1, como mínimo 4:1, como mínimo 5:1, como mínimo 6:1, como mínimo 7:1, como mínimo 8:1, como mínimo 9:1, como mínimo 10:1, como mínimo 15:1 o como mínimo 20:1. En otros aspectos de esta realización, un método basado en inmunología tiene una relación señal a ruido para la asíntota superior de por ejemplo, como mínimo 10:1, como mínimo 15:1, como mínimo 20:1, en como mínimo 25, como mínimo 30:1, como mínimo 35:1, como mínimo 40:1, como mínimo 45:1, como mínimo 50:1, como mínimo 60:1, como mínimo 10:1, como mínimo 80:1, como mínimo 90:1, o como mínimo 100:1, como mínimo 150:1, como mínimo 200:1, como mínimo 250:1, como mínimo 300:1, como mínimo 350:1, como mínimo 400:1, como mínimo 450:1, como mínimo 500:1, como mínimo 550:1, o como mínimo 600:1.

30 La especificidad de un método define la capacidad del método para medir los analitos de interés con la 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 distinguir diferentes sustancias en una muestra. La linealidad del método es su capacidad para obtener resultados que son directamente, o mediante una transformación matemática bien definida, proporcionales a la concentración de analito en la muestra. De este modo, en una realización, un método basado en inmunología desvelado en la presente memoria descriptiva puede distinguir endopeptidasa redirigida completamente activa de endopeptidasa redirigida parcialmente activa, 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 la endopeptidasa redirigida totalmente activa.

35 La solidez del método es la reproducibilidad de los resultados obtenidos para muestras idénticas en condiciones de ensayo 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 de método y proporciona una indicación de su fiabilidad en la utilización normal. Por lo tanto, mientras que la solidez evalúa cambios inevitables, la robustez evalúa cambios deliberados. Parámetros típicos evaluados por solidez y robustez incluyen los efectos de congelación/descongelación, tiempos de incubación, temperatura de incubación, longevidad de reactivo, preparación de muestras, almacenamiento de muestras, número de paso celular, lotes de endopeptidasa redirigida, variabilidad entre purificaciones y la variabilidad entre las reacciones de corte/digestión. Parámetros de robustez para ensayos basados en células incluyen el banco celular (principio, medio y final de congelación), nivel de paso celular, densidad de siembra, densidad de solución madre celular (Cuántos días en cultivo), edad de la célula en frasco (tiempo de espera para la siembra), tiempo de incubación, diferentes placas, cantidades excesivas de suero y fuente de reactivos. La idoneidad del sistema del método es la determinación del rendimiento de análisis, incluyendo el rendimiento de los reactivos y los instrumentos, a lo largo del tiempo mediante el análisis de un estándar de referencia o una molécula de referencia. La idoneidad del sistema se resalta en la orientación de la FDA en

referencia al hecho de que el equipo, los aparatos electrónicos, el rendimiento del ensayo y las muestras para ser analizadas, constituyen un sistema integrado. La idoneidad del sistema puede ser evaluada ensayando el paralelismo, que es cuando se representa gráficamente la dosis logarítmica frente a la respuesta, diluciones sucesivas de la referencia y diluciones sucesivas de las muestras deben dar lugar a curvas paralelas.

5 Aspectos de la presente divulgación constituyen, en parte, una célula de una línea celular establecida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “célula” se refiere a cualquier célula eucariota susceptible a actividad endopeptidasa redirigida por endopeptidasa redirigida o cualquier célula eucariota que puede captar endopeptidasa redirigida. El término célula abarca las células de una variedad de organismos, tales como: por ejemplo, ratón, rata, porcino, bovino, equino, primates y células humanas; de una variedad de tipos de células tales como, por ejemplo, neuronales y no neuronales; y puede ser aislada de o formar parte de una población heterogénea de células, tejido u organismo. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “línea celular establecida” es sinónimo de “línea celular inmortal”, o “línea celular transformada” y se refiere a un cultivo celular de las células seleccionadas para propagación indefinida de una población de células derivada de una fuente del organismo, tejido u órgano. Por definición, una línea celular establecida excluye un cultivo celular de células primarias. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “células primarias” son las células recogidas directamente de tejidos u órganos frescos y no tienen el potencial de propagarse indefinidamente. Una línea celular establecida puede constar de una población heterogénea de células o una población uniforme de células. Una línea celular establecida derivada de una sola célula se conoce como una línea celular clonal. Una línea celular establecida puede ser una cuyas células expresan de forma endógena todos los componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo general celular mediante el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25 y abarca la unión de la endopeptidasa redirigida a su receptor, la internalización del complejo endopeptidasa/receptor, la translocación de la cadena ligera de la endopeptidasa redirigida de una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de un SNAP-25. Como alternativa, una línea celular establecida puede ser una en cuyas células ha sido introducido, desde una fuente exógena, como mínimo uno de los componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo general celular mediante el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25 y abarca la unión de la endopeptidasa redirigida a su receptor, la internalización del complejo endopeptidasa/receptor, la translocación de la cadena ligera de la endopeptidasa redirigida de una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de un SNAP-25. También referido como una línea celular manipulada genéticamente, las células de dicha una línea celular establecida pueden, por ejemplo, expresar una endopeptidasa redirigida exógena, tal como: por ejemplo, un ORL1 exógeno, un DOR exógeno, un KOR exógeno, un MOR exógeno, un receptor de galanina exógeno 1, un receptor de galanina exógeno 2, un receptor de galanina exógeno 3 o cualquier combinación de éstos.

35 Aspectos de la presente divulgación constituyen, en parte, una célula de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones “células susceptibles a la actividad endopeptidasa redirigida”, “células susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida por una endopeptidasa redirigida” o “células de una línea celular establecida susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida por una endopeptidasa redirigida” se refieren a células que pueden experimentar el mecanismo general celular mediante el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25 inhibiendo de este modo la exocitosis y abarca la unión de la endopeptidasa redirigida a su receptor, la internalización del complejo endopeptidasa/receptor, la translocación de la cadena de actividad endopeptidasa redirigida de una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de un SNAP-25. Por definición, células susceptibles a la actividad endopeptidasa redirigida deben expresar o diseñarse para expresar, como mínimo un receptor de endopeptidasa redirigida y como mínimo un sustrato de SNAP-25. Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones “células que pueden captar endopeptidasa redirigida” o “células que comprenden una línea de células establecidas que pueden captar endopeptidasa redirigida” se refieren a las células que pueden experimentar el mecanismo general celular mediante el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25 inhibiendo de este modo la exocitosis y abarca la unión de la endopeptidasa redirigida a su receptor, la internalización del complejo endopeptidasa/receptor, la translocación de la cadena ligera de la endopeptidasa redirigida de una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de un SNAP-25. Por definición, células que pueden captar endopeptidasa redirigida deben expresar o diseñarse para expresar, como mínimo un receptor de endopeptidasa redirigida y como mínimo un sustrato de SNAP-25.

55 Por lo tanto, en una realización, las células de una línea celular establecida son susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, son susceptibles a la actividad endopeptidasa redirigida, las células de una línea celular establecida por ejemplo, aproximadamente 100 nM o menos o menos, aproximadamente 90 nM o menos o menos, aproximadamente 80 nM o menos o menos, cerca de 70 nM o menos o menos, aproximadamente 60 nM o menos o menos, aproximadamente 50 nM o menos o menos, aproximadamente 40 nM o menos o menos, aproximadamente 30 nM o menos o menos, aproximadamente 20 nM o menos o menos, aproximadamente 10 nM o menos o menos de la endopeptidasa redirigida. En otros aspectos, las células de una línea celular establecida son susceptibles a la actividad endopeptidasa redirigida a por ejemplo, aproximadamente 9 nM o menos, aproximadamente 8 nM o menos, aproximadamente 7 nM o menos, aproximadamente 6 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 4 nM o menos, aproximadamente 3 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos, las células de una línea celular establecida son susceptibles a la actividad endopeptidasa redirigida a por

ejemplo, aproximadamente 0,9 nM o menos, aproximadamente 0,8 nM o menos, aproximadamente 0,7 nM o menos, aproximadamente 0,6 nM o aproximadamente 0,5 nM o menos, aproximadamente 0,4 nM o menos aproximadamente 0,3 nM o menos, aproximadamente 0,2 nM o aproximadamente 0,1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “aproximadamente” cuando califica a un valor de un elemento declarado, número, porcentaje o término se refiere a un intervalo de más o menos el diez por ciento del valor del artículo, porcentaje, parámetro o término indicado.

En otra realización, las células que componen una línea celular establecida pueden captar endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, las células que componen una línea celular establecida pueden captar, por ejemplo, aproximadamente 100 nM o menos o menos, cerca de 90 nM o menos o menos, aproximadamente 80 nM o menos o menos, aproximadamente 70 nM o menos o menos, aproximadamente 60 nM o menos o menos, aproximadamente 50 nM o menos o menos, aproximadamente 40 nM o menos o menos, aproximadamente 30 nM o menos o menos, aproximadamente 20 nM o menos o menos, aproximadamente 10 nM o menos o menos de la endopeptidasa redirigida. En otros aspectos, las células que componen una línea celular establecida poseen la capacidad de captación de aproximadamente 9 nM o menos, aproximadamente 8 nM o menos, aproximadamente 7 nM o menos, aproximadamente 6 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 4 nM o menos, aproximadamente 3 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos, las células que componen una línea celular establecida poseen la capacidad de captación de aproximadamente 0,9 nM o menos, aproximadamente 0,8 nM o menos, aproximadamente 0,7 nM o menos, aproximadamente 0,6 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos, aproximadamente 0,4 nM o menos, aproximadamente 0,3 nM o menos, aproximadamente 0,2 nM o menos, o aproximadamente 0,1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, células de una línea celular establecida que exhiben una unión selectiva para endopeptidasa redirigida desvelada en la presente memoria descriptiva. En este documento, la expresión “se une selectivamente”, o “unión selectiva” que cuando hace referencia a una endopeptidasa redirigida, se refiere a la unión discriminatorias de endopeptidasa redirigida al receptor diana indicado, tal que la endopeptidasa redirigida no se une sustancialmente a un receptor no diana. El grado en que las células de una exposición de línea celular establecida se unen selectivamente a endopeptidasa redirigida puede medirse mediante el grado de captación no selectiva que estas células exhiben para una molécula que carece del dominio de dirección de la endopeptidasa redirigida. Es una forma de evaluar la captación no selectiva para una molécula que carece del dominio de dirección de la endopeptidasa redirigida es medir la captación no selectiva de un fragmento LH<sub>N</sub>. Un fragmento LH<sub>N</sub> es uno que se compone de un dominio de translocación de toxinas clostridiales y un dominio enzimático de toxinas clostridiales, pero carece de cualquier dominio de dirección en conjunto. Los ejemplos no limitantes de un fragmento LH<sub>N</sub> incluyen un fragmento LH<sub>N</sub>/A fragmento, un fragmento LH<sub>N</sub>/B, un fragmento LH<sub>N</sub>/C, un fragmento LH<sub>N</sub>/D, un fragmento LH<sub>N</sub>/E, un fragmento LH<sub>N</sub>/F y un fragmento LH<sub>N</sub>/G. Un fragmento LH<sub>N</sub>/A ejemplar es la SEQ ID NO: 146 que es codificada por la molécula de polinucleótido SEQ ID NO: 147.

De este modo, en una realización, las células de una línea celular establecida exhiben unión selectiva para una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida exhiben unión selectiva para una endopeptidasa redirigida que representa, por ejemplo, como mínimo el 75% de la actividad total ensayada, como mínimo el 80% de la actividad total ensayada, como mínimo el 85% de la actividad total ensayada, como mínimo el 90% de la actividad total ensayada, o como mínimo el 95% de la actividad total ensayada. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida exhiben unión selectiva para una endopeptidasa redirigida que representa, por ejemplo, aproximadamente el 75% a aproximadamente el 100% de la actividad total ensayada, cerca del 80% a aproximadamente el 100% de la actividad total ensayada, cerca del 85% a cerca del 100% de la actividad total ensayada, aproximadamente el 90% a aproximadamente el 100% de la actividad total ensayada.

En otra realización, las células de una línea celular establecida exhiben captación no selectiva mínima de un fragmento LH<sub>N</sub>. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida muestran captación no selectiva de un fragmento LH<sub>N</sub> que es, por ejemplo, como máximo el 25% de la captación total medida, como máximo el 20% de la captación total medida, como máximo el 15% de la captación total medida, como máximo el 10% de la captación total medida, o como máximo el 5% de la captación total medida. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida muestran captación no selectiva de un fragmento LH<sub>N</sub> que es, por ejemplo, aproximadamente el 0% a aproximadamente el 25% de la captación total medida, aproximadamente el 0% a aproximadamente el 20% de la captación total medida, aproximadamente el 0% a aproximadamente el 15% de la captación total medida, aproximadamente el 0% a cerca del 10% de la captación total medida, o aproximadamente el 0% a aproximadamente el 5% de la captación total medida.

En otra realización, las células de una línea celular establecida exhiben captación no selectiva mínima de un fragmento LH<sub>N</sub>/A. En los aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida muestran captación no selectiva de un fragmento LH<sub>N</sub>/A que es, por ejemplo, como máximo el 25% de la captación total medida, como máximo el 20% de la captación total medida, como máximo el 15% de la captación total medida, como máximo el 10% de la captación total medida, como máximo el 5% de la captación total medida. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida muestran captación no selectiva de un

fragmento LH<sub>N</sub>/A que está por ejemplo, aproximadamente el 0% a aproximadamente el 25% de la captación total medida, aproximadamente el 0% a aproximadamente el 20% de la captación total medida, aproximadamente el 0% a aproximadamente el 15% de la captación total medida, aproximadamente el 0% a aproximadamente el 10% de la captación total medida, o aproximadamente el 0% a cerca del 5% de la captación total medida.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, las células de una línea celular establecida que exhiben un número suficiente de sitios de unión del receptor en la membrana plasmática para conferir unión sensible y selectiva para endopeptidasa redirigida. Un ensayo de unión de saturación en equilibrio mide la unión total e inespecífica de un ligando a diferentes concentraciones. La constante de disociación en equilibrio ( $K_d$ ) para el ligando y el número máximo de sitios de unión al receptor,  $B_{max}$ , pueden calcularse a partir de la unión específica mediante el análisis de regresión no lineal. La unión específica se calcula restando la unión inespecífica de un ligando de la unión total observada.  $K_d$  es la concentración de ligando requerida para alcanzar la mitad de la unión máxima y se mide en términos de molaridad.  $B_{max}$  es el número máximo de sitios de unión presentes en la membrana plasmática y se mide en términos de pmol/mg, pmol/célula, fmol/célula o sitios/célula.

De este modo, en una realización, las células de una línea celular establecida exhiben un número suficiente de sitios de unión al receptor en la membrana plasmática para conferir unión sensible y selectiva para endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida exhiben un valor  $B_{max}$  de, por ejemplo, como mínimo 0,1 fmol/célula, como mínimo 0,2 fmol/célula, como mínimo 0,3 fmol/célula, como mínimo 0,4 fmol/célula, como mínimo 0,5 fmol/célula, como mínimo 0,6 fmol/célula, como mínimo 0,7 fmol/célula, como mínimo 0,8 fmol/célula, como mínimo 0,9 fmol/célula, o como mínimo 1,0 fmol/célula, para la ligando de dirección de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida exhiben un valor  $B_{max}$  de, por ejemplo, como mínimo 1 fmol/célula, como mínimo 2 fmol/célula, como mínimo 3 fmol/célula, como mínimo 4 fmol/célula, como mínimo 5 fmol/célula, como mínimo 6 fmol/célula, como mínimo 7 fmol/célula, como mínimo 8 fmol/célula, como mínimo 9 fmol/célula, o como mínimo 10 fmol/célula, para el ligando de dirección de una endopeptidasa redirigida.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, las células de una línea de células clonales establecidas susceptible a actividad endopeptidasa redirigida que son más estables que las células de la línea celular parental de la que deriva la línea celular clonal. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "estable" se refiere a células de una línea celular clonal establecida para un número de pase particular que exhiben una  $CE_{50}$  relativa, sensibilidad, eficacia, asíntota superior bien definida y/o una curva de respuesta a la dosis bien definida para actividad endopeptidasa redirigida que es similar a los valores de  $CE_{50}$  relativa, sensibilidad, eficacia, asíntota superior bien definida o una curva de respuesta a la dosis bien definida exhibida por las células de la línea celular parental de la cual se deriva la línea celular clonal, en el número de pase igual o similar, donde se utilizan las mismas condiciones de ensayo y la misma endopeptidasa redirigida en ambos ensayos.

Por lo tanto, en una realización, las células de una línea celular clonal establecida son más estables en comparación con las de la línea celular parental de la que se deriva la línea celular clonal. En un aspecto de esta realización, las células de una línea celular clonal establecida son más estables en comparación con la línea celular parental SK-N-DZ. En otro aspecto de esta realización, las células de una línea celular clonal establecida son más estables en comparación con la línea celular parental SK-N-DZ ATCC CRL-2149. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular clonal establecida son más estables por ejemplo, como mínimo 5 pases más, como mínimo 10 pases más, como mínimo 15 pases más, como mínimo 20 pases más, como mínimo 25 pases más o como mínimo 30 pases más, en comparación con la de la línea celular parental de la que deriva la línea celular clonal. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular clonal establecida son más estables por ejemplo, como mínimo 5 pases más, como mínimo 10 pases más, como mínimo 15 pases más, como mínimo 20 pases más, como mínimo 25 pases más o como mínimo 30 pases más, en comparación con la de la línea celular parental de la que deriva la línea celular clonal.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, las células de una línea celular clonal establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida que son estables en una pluralidad de pases de la célula. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "estable" se refiere a células de una línea celular clonal establecida para un número de pase particular que exhiben una  $CE_{50}$  relativa, sensibilidad, eficacia, asíntota superior bien definida o una curva de respuesta a la dosis bien definida para actividad endopeptidasa redirigida que es similar a los valores de  $CE_{50}$  relativa, sensibilidad, eficacia, asíntota superior bien definida o una curva de respuesta a la dosis bien definida exhibida por las células de la misma línea celular clonal establecida, sino de un pase o pases previos, donde se utilizan las mismas condiciones de ensayo y la misma endopeptidasa redirigida en ambos ensayos.

Las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva pueden exhibir una sensibilidad consistente para actividad endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pases de la célula. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sensibilidad por actividad endopeptidasa redirigida" se refiere a la dosis más baja que un ensayo puede medir consistentemente por encima de la señal detectada por una señal de control o fondo no de tratamiento.

De este modo, en una realización, las células de la línea celular clonal establecida exhiben una sensibilidad para

actividad endopeptidasa redirigida para cualquier pase dado que es por ejemplo, 100 nM o menos, aproximadamente 80 nM o menos, cerca de 70 nM o menos, aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 30 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 0.9 nM o menos, aproximadamente 0,8 nM o menos, aproximadamente 0,7 nM o menos, aproximadamente 0,6 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos, aproximadamente 0,4 nM o menos, aproximadamente 0,3 nM o menos, aproximadamente 0,2 nM o menos, o aproximadamente 0,1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, las células de la línea celular clonal establecida exhiben una sensibilidad para actividad endopeptidasa redirigida para cualquier pase dado, por ejemplo, aproximadamente 0.01 nM a aproximadamente 100 nM, aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 75 nM, aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 50 nM, aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 25 nM, aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 20 nM, aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 15 nM, aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 10 nM, aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 5 nM, aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 100 nM, aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 75 nM, aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 50 nM, aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 25 nM, aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 20 nM, aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 15 nM, aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 10 nM o aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 5 nM de una endopeptidasa redirigida.

En otra realización, las células de la línea celular clonal establecida exhiben una sensibilidad para la actividad endopeptidasa redirigida que es de aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, menos aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente de 15 nM o menos, aproximadamente de 10 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos para, por ejemplo, 5 o más pases de la célula, 10 o más pases de la célula, 15 o más pases de la célula, 20 o más pases de la célula, 25 o más pases de la célula, 30 o más pases de la célula, 35 o más pases de la célula, 40 o más pases de la célula, 45 o más pases de la célula o 50 o más pases de la célula. En otros aspectos de esta realización, las células de la línea celular clonal establecida exhiben una sensibilidad para la actividad endopeptidasa redirigida que es de aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, menos aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 15 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos para, por ejemplo, aproximadamente 15 a 60 pases, aproximadamente 20 a 60 pases, aproximadamente 25 a 60 pases, aproximadamente 30 a 60 pases, aproximadamente 35 a 60 pases, aproximadamente 40 a 60 pases, aproximadamente 45 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 50 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 15 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 20 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 25 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 30 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 35 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 40 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 15 a aproximadamente 40 pases, aproximadamente 20 a aproximadamente 40 pases, alrededor de 25 a 40 pases, o aproximadamente 30 a aproximadamente 40 pases.

Las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva pueden exhibir una eficacia relativa consistente de captación de endopeptidasa redirigida o actividad endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pases de la célula. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "eficacia relativa" se refiere a lo bien que compara la asíntota superior para la actividad endopeptidasa redirigida detectada en el ensayo actual ejecutado con la asíntota superior para la actividad endopeptidasa redirigida detectada en un estándar de referencia, una molécula de referencia o un número de pase de referencia utilizado en ese ensayo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "relación señal a ruido para la asíntota superior" se refiere a la señal detectada en un ensayo en el límite superior de detección dividido por la señal detectada por una señal de control o fondo no de tratamiento. El límite superior de detección es la dosis más alta que un ensayo puede medir de forma consistente antes de que se produzca la saturación de la señal.

De este modo, en una realización, células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva pueden exhibir una asíntota superior bien definida en una pluralidad de pases de la célula y mantener una relación señal a ruido que es consistente y adecuada para el análisis. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva deben tener una bien definida relación señal a ruido para la asíntota superior para actividad endopeptidasa redirigida por ejemplo, como mínimo 3:1, como mínimo 4:1, como mínimo 5:1, como mínimo 6:1, como mínimo 7:1, como mínimo 8:1, como mínimo 9:1, como mínimo 10:1, como mínimo 15:1, como mínimo 20:1, como mínimo 25:1, como mínimo 30:1, como mínimo 35:1, como mínimo 40:1, como mínimo 45:1, como mínimo 50:1, como mínimo 60:1, como mínimo 70:1, como mínimo 80:1, como mínimo 90:1, o como mínimo 100:1, como mínimo 150:1, como mínimo 200:1, como mínimo 250:1, como mínimo 300:1, como mínimo 350:1, como mínimo 400:1, como mínimo 450:1, como mínimo 500:1, como mínimo 550:1 o como mínimo 600:1, en, por ejemplo, 5 o más pases de la célula, 10 o más pases de la célula, 15 o más pases de la célula, 20 o más pases de la célula, 25 o más pases de la célula, 30 o más pases de la célula, 35 o más pases de la célula, 40 o más pases de la célula, 45 o más pases de la célula o 50 o más pases de la célula. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva deben tener una bien definida relación señal a ruido para la asíntota superior para actividad endopeptidasa redirigida por ejemplo, como mínimo 3:1, como mínimo 4:1, como mínimo 5:1, como mínimo 6:1, como mínimo 7:1, como mínimo 8:1, como mínimo 9:1, como mínimo 10:1, como mínimo 15:1, como mínimo 20:1,

como mínimo 25:1, como mínimo 30:1, como mínimo 35:1, como mínimo 40:1, como mínimo 45:1, como mínimo 50:1, como mínimo 60:1, como mínimo 70:1, como mínimo 80:1, como mínimo 90:1, o como mínimo 100:1, como mínimo 150:1, como mínimo 200:1, como mínimo 250:1, como mínimo 300:1, como mínimo 350:1, como mínimo 400:1, como mínimo 450:1, como mínimo 500:1, como mínimo 550:1 o como mínimo 600:1, en, por ejemplo, aproximadamente 15 a 60 pases, aproximadamente 20 a 60 pases, aproximadamente 25 a 60 pases, aproximadamente 30 a 60 pases, aproximadamente 35 a 60 pases, aproximadamente 40 a 60 pases, aproximadamente 45 a 60 pases, aproximadamente 50 a 60 pases, aproximadamente 15 a 50 pases, aproximadamente 20 a 50 pases, aproximadamente 25 a 50 pases, aproximadamente 30 a 50 pases, aproximadamente 35 a 50 pases, aproximadamente 40 a 50 pases, aproximadamente 15 a 40 pases, aproximadamente 20 a 40 pases, aproximadamente 25 a 40 pases, o aproximadamente 30 a 40 pases.

Células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva pueden exhibir una curva de respuesta a la dosis bien definida para la actividad endopeptidasa redirigida a una pluralidad de pases de la célula. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "curva de respuesta a la dosis" se refiere a lo bien que los datos brutos encajan en el modelo estadístico de elección para el ensayo. Como un ejemplo no limitante, una curva sigmoideal con un ajuste logístico de cuatro parámetros es una curva de respuesta a la dosis para un ensayo de actividad enzimática, tal como, por ejemplo un ensayo de potencia. Como otro ejemplo no limitante, un ligando con un ajuste de saturación del sitio es una curva de respuesta a la dosis para un ensayo de unión ligando/anticuerpo.

De este modo, en una realización, las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva exhiben una curva de respuesta a la dosis bien definida para actividad endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pases de la célula. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva exhiben una curva de respuesta a la dosis viene definida para actividad endopeptidasa redirigida en por ejemplo, 5 o más pases de la célula, 10 o más pases de la célula, 15 o más pases de la célula, 20 o más pases de la célula, 25 o más pases de la célula, 30 o más pases de la célula, 35 o más pases de la célula, 40 o más pases de la célula, 45 o más pases de la célula o 50 o más pases de la célula. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva exhiben una curva de respuesta a la dosis bien definida para actividad endopeptidasa redirigida en por ejemplo, aproximadamente 15 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 20 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 25 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 30 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 35 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 40 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 45 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 50 a aproximadamente 60 pases, aproximadamente 15 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 20 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 25 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 30 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 35 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 40 a aproximadamente 50 pases, aproximadamente 15 a aproximadamente 40 pases, aproximadamente 20 a aproximadamente 40 pases, aproximadamente 25 a aproximadamente 40 pases, o aproximadamente 30 a aproximadamente 40 pases.

Las células de una línea celular establecida desvelada en la presente memoria descriptiva pueden exhibir un valor de  $CE_{50}$  relativa consistente de actividad endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pases de la célula. En este documento, el término " $CE_{50}$  relativa" o "valor de  $CE_{50}$  relativa" se refiere a un valor de  $CE_{50}$  de actividad endopeptidasa redirigida que se normaliza contra la  $CE_{50}$  calculada para un estándar de referencia, una molécula de referencia o un número de pase de referencia utilizado en el ensayo.

De este modo, en una realización, las células de una línea celular clonal establecida exhiben una  $CE_{50}$  relativa consistente para la actividad endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pases de la célula. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular clonal establecida exhiben una  $CE_{50}$  relativa consistente para actividad endopeptidasa redirigida es decir, por ejemplo, aproximadamente  $\pm 10\%$ , aproximadamente  $\pm 20\%$ , aproximadamente  $\pm 30\%$ , aproximadamente  $\pm 40\%$ , aproximadamente  $\pm 50\%$ , aproximadamente  $\pm 60\%$ ,  $\pm$  aproximadamente  $70\%$  o aproximadamente  $\pm 75\%$  la  $CE_{50}$  relativa para actividad endopeptidasa redirigida en por ejemplo, 5 o más pases de la célula, 10 o más pases de la célula, 15 o más pases de la célula, 20 o más pases de la célula, 25 o más pases de la célula, 30 o más pases de la célula, 35 o más pases de la célula, 40 o más pases de la célula, 45 o más pases de la célula o 50 o más pases de la célula. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular clonal establecida exhiben una  $CE_{50}$  relativa para actividad endopeptidasa redirigida es decir, por ejemplo, aproximadamente  $\pm 10\%$  a aproximadamente el  $75\%$ , aproximadamente  $\pm 10\%$  a aproximadamente el  $70\%$ , aproximadamente  $\pm 10\%$  a aproximadamente el  $60\%$ , aproximadamente  $\pm 10\%$  a aproximadamente el  $50\%$ , aproximadamente  $\pm 10\%$  a aproximadamente el  $40\%$ , aproximadamente  $\pm 10\%$  a aproximadamente el  $30\%$  o aproximadamente  $\pm 10\%$  a aproximadamente el  $20\%$  la  $CE_{50}$  relativa para actividad endopeptidasa redirigida por ejemplo en, 5 o más pases de la célula, 10 o más pases de la célula, 15 o más pases de la célula, 20 o más pases de la célula, 25 o más pases de la célula, 30 o más pases de la célula, 35 o más pases de la célula, 40 o más pases de la célula, 45 o más pases de la célula o 50 o más pases de la célula.

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "endopeptidasa redirigida" es sinónimo de "Proteína Moduladora de Exocitosis Vesicular Dirigida" o "TVEMP". Los ejemplos no limitantes de endopeptidasa redirigida se desvelan por ejemplo, en Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, Patente de



los E.E.U.U. 5.989.545; Clifford C. Shone y col., *Recombinant Toxin Fragments*, Patente de los E.E.U.U. 6.461.617; Conrad P. Quinn y col., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, Patente de los E.E.U.U. 6.632.440; Lance E. Steward y col., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, Patente de los E.E.U.U. 6.843.998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, publicación de patente de E.E.U.U. 2002/0037833; Keith A. Foster y col., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente de E.E.U.U. 2003/0180289; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, 2001 WO/014570; Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2005/023309; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Solicitud de patente nº 11/376.696; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, Solicitud de patente nº 11/776.075; Dolly, J.O. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, Solicitud de patente nº 11/829.475; Foster, K.A. y col., *Fusion Proteins*, Publicación de patente internacional 2006 WO/059093; y Foster, K.A. y col., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2006/059105. Ejemplos no limitantes de las endopeptidasa redirigidas incluyen la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 130 y la SEQ ID NO: 131.

De este modo en una realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una endopeptidasa redirigida desvelada Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, Patente de los E.E.U.U. 5.989.545; Clifford C. Shone y col., *Recombinant Toxin Fragments*, Patente de los E.E.U.U. 6.461.617; Conrad P. Quinn y col., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, Patente de los E.E.U.U. 6.632.440; Lance E. Steward y col., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, Patente de los E.E.U.U. 6.843.998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, publicación de patente de E.E.U.U. 2002/0037833; Keith A. Foster y col., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente de E.E.U.U. 2003/0180289; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, 2001 WO/014570; Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2005/023309; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Solicitud de patente nº 11/376.696; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, Solicitud de patente nº 11/776.075; Dolly, J.O. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, Solicitud de patente nº 11/829.475; Foster, K.A. y col., *Fusion Proteins*, Publicación de patente internacional 2006 WO/059093; y Foster, K.A. y col., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2006/059105. En aspectos de esta realización, una endopeptidasa redirigida es la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 130 o la SEQ ID NO: 131.

En otra realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una endopeptidasa redirigida que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con una endopeptidasa redirigida desvelada en Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, Patente de los E.E.U.U. 5.989.545; Clifford C. Shone y col., *Recombinant Toxin Fragments*, Patente de los E.E.U.U. 6.461.617; Conrad P. Quinn y col., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, Patente de los E.E.U.U. 6.632.440; Lance E. Steward y col., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, Patente de los E.E.U.U. 6.843.998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, publicación de patente de E.E.U.U. 2002/0037833; Keith A. Foster y col., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente de E.E.U.U. 2003/0180289; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, 2001 WO/014570; Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2005/023309; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Solicitud de patente nº 11/376.696; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, Solicitud de patente nº 11/776.075; Dolly, J.O. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, Solicitud de patente nº 11/829.475; Foster, K.A. y col., *Fusion Proteins*, Publicación de patente internacional 2006 WO/059093; y Foster, K.A. y col., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2006/059105. En otra realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de endopeptidasa redirigida que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con una endopeptidasa redirigida de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 130 o la SEQ ID NO: 131.

En otros aspectos de esta realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una endopeptidasa redirigida 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 respecto a una endopeptidasa redirigida desvelada en Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, Patente de los E.E.U.U. 5.989.545; Clifford C. Shone y col., *Recombinant Toxin Fragments*, Patente de los E.E.U.U. 6.461.617; Conrad P. Quinn y col., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, Patente de los E.E.U.U. 6.632.440; Lance E. Steward y col., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, Patente de los E.E.U.U. 6.843.998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, publicación de

patente de E.E.U.U. 2002/0037833; Keith A. Foster y col., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente de E.E.U.U. 2003/0180289; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, 2001 WO/014570; Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2005/023309; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Solicitud de patente nº 11/376.696; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, Solicitud de patente nº 11/776.075; Dolly, J.O. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, Solicitud de patente nº 11/829.475; Foster, K.A. y col., *Fusion Proteins*, Publicación de patente internacional 2006 WO/059093; y Foster, K.A. y col., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2006/059105. En otros aspectos de esta realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una endopeptidasa redirigida 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 respecto a una endopeptidasa redirigida de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 130, o la SEQ ID NO: 131.

En otros aspectos de esta realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una variante endopeptidasa redirigida de origen no 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 respecto a una endopeptidasa redirigida desvelada en Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, Patente de los E.E.U.U. 5.989.545; Clifford C. Shone y col., *Recombinant Toxin Fragments*, Patente de los E.E.U.U. 6.461.617; Conrad P. Quinn y col., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, Patente de los E.E.U.U. 6.632.440; Lance E. Steward y col., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, Patente de los E.E.U.U. 6.843.998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, publicación de patente de E.E.U.U. 2002/0037833; Keith A. Foster y col., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente de E.E.U.U. 2003/0180289; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, 2001 WO/014570; Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación internacional de patente WO 2005/023309; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Solicitud de patente nº 11/376.696; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, Solicitud de patente nº 11/776.075; Dolly, J.O. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, Solicitud de patente nº 11/829.475; Foster, K.A. y col., *Fusion Proteins*, Publicación de patente internacional 2006 WO/059093; y Foster, K.A. y col., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, La publicación de patente WO 2006/059105. En otros aspectos de esta realización, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una variante de endopeptidasa redirigida de origen no 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 respecto a una endopeptidasa redirigida de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 130 o la SEQ ID NO: 131.

En otra realización más, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de una endopeptidasa redirigida a opioides. Se describen ejemplos no limitantes de endopeptidasa redirigida a opioides o TVEMP de opioides, por ejemplo, Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions* Patente de los E.E.U.U. 5.989.545; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, Patente de los E.E.U.U. 7.132.259; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de los E.E.U.U. 7.244.437; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de los E.E.U.U. 7.413.742; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, Patente de los E.E.U.U. 7.415.338; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Patente de los E.E.U.U. 7.514.088; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0064092; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2009/0035822; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2009/0048431; Keith A. Foster, *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2009/0162341; Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, Publicación de patente internacional WO 2005/023309; y Lance E. Steward, *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente WO 2008/008805.

En otra realización más, la actividad endopeptidasa redirigida que es detectada es de endopeptidasa redirigida a galanina. Se describen ejemplos no limitantes de endopeptidasa redirigida a galanina o TVEMP de galanina, en, por ejemplo, Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capability and Enhanced Targeting Activity*, solicitud de patente de E.E.U.U. nº 11/776.043 (11 de julio de 2007); Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente estadounidense Nº 11/776.052 (11 de julio de 2007); Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente estadounidense Nº 11/776.075 (11 de julio de 2007).

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un SNAP-25. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "SNAP-25" se refiere a un SNAP-25 de origen natural o un SNAP-25 de origen no natural que

preferentemente es escindido por una endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "preferentemente escindido" se refiere a que la tasa de escisión del SNAP-25 por endopeptidasa redirigida es como mínimo un orden de magnitud superior a la de cualquier otro sustrato por una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, la tasa de escisión de SNAP-25 por una endopeptidasa redirigida es como mínimo dos órdenes de magnitud mayor, como mínimo tres órdenes de magnitud mayor, como mínimo cuatro órdenes de magnitud mayor o como mínimo cinco órdenes de magnitud mayor entonces que la tasa de escisión de cualquier otro sustrato por endopeptidasa redirigida.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "SNAP-25 de origen natural" se refiere a cualquier SNAP-25 producida por un proceso natural, incluyendo, sin limitación, isoformas de SNAP-25 producidas a partir de una modificación post traduccional, una transcripción cortada y empalmada de forma alternativa, o una mutación espontánea y subtipos de SNAP-25. Un SNAP-25 de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24, o una que sustituye, elimina o agrega, 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 la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "SNAP-25 de origen no natural" se refiere a cualquier SNAP-25 cuya estructura se modificó con ayuda de manipulación humana, incluyendo, sin limitación, un SNAP-25 producido por ingeniería genética mediante mutagénesis al azar o diseño racional y un SNAP-25 producido por síntesis química in vitro. Ejemplos no limitantes de SNAP-25 de origen no natural se describen en, por ejemplo, Steward, L.E. y col., *FRET Protease Assays for Clostridial Toxins*, Patente de los E.E.U.U. 7.332.567; Fernandez-Salas y col., *Lipophilic Dye-based FRET Assays for Clostridial Toxin Activity*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0160561. Un SNAP-25 de origen no 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 la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24.

Por lo tanto en una realización, un SNAP-25 es SNAP-25 de origen natural. En aspectos de esta realización, el SNAP-25 es una isoforma de SNAP-25 o un subtipo de SNAP-25. En aspectos de esta realización, el SNAP-25 de origen natural es el SNAP-25 de origen natural de la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta realización, el SNAP-25 es un SNAP-25 de origen natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70% de identidad de aminoácidos, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24.

En otra realización, un SNAP-25 es un SNAP-25 de origen no natural. En otros aspectos de esta realización, el SNAP-25 es un SNAP-25 de origen no natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4. En otros aspectos de esta realización, el SNAP-25 es un SNAP-25 de origen no 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, delecciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con respecto a la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta realización, el SNAP-25 es un SNAP-25 de origen no 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, delecciones o adiciones de aminoácidos contiguos con respecto a la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24.

Un SNAP-25 puede ser un SNAP-25 endógeno o un SNAP-25 exógeno. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "SNAP-25 endógeno" se refiere a un SNAP-25 naturalmente presente en la célula porque está codificado naturalmente dentro del genoma de la célula, tal que la célula inherentemente expresa el SNAP-25 sin necesidad de una fuente externa de SNAP-25 o una fuente externa de material genético que codifica un SNAP-25. La expresión de un SNAP-25 endógeno puede ser con o sin estimulación ambiental como, por ejemplo, la diferenciación celular. Por definición, sólo puede ser un SNAP-25 endógeno un SNAP-25 de origen natural o sus variantes. Por ejemplo, las siguientes líneas celulares establecidas expresan un SNAP-25 endógeno: 2-M17, Kelly, LA1-55n, N1E - 115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108 - 15, PC12, SH - SY5Y, SiMa, SK-N-DZ y SK - N - BE 2-C.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "SNAP-25 exógeno" se refiere a un SNAP-25 expresado en una célula a través de la introducción de una fuente externa de SNAP-25 o una fuente externa de material genético que codifica un SNAP-25 por manipulación humana. La expresión de un SNAP-25 exógeno puede ser con o sin estimulación ambiental como, por ejemplo, diferenciación celular. Como un ejemplo no limitante, las células de una línea celular establecida pueden expresar un SNAP-25 exógeno por transfección transitoria o estable de un SNAP-25. Como otro ejemplo no limitante, las células de una línea celular establecida pueden expresar un SNAP-25 exógeno por transfección de proteína de un SNAP-25. Un SNAP-25 exógeno puede ser un SNAP-25 de origen natural o sus variantes, o un SNAP-25 de origen no natural o sus variantes.

De este modo, en una realización, células de una línea celular establecida expresan un SNAP-25 endógeno. En aspectos de esta realización, el SNAP-25 endógeno expresado por las células de una línea celular establecida es un SNAP-25 de origen natural. En otros aspectos de esta realización, el SNAP-25 endógeno expresado por las células de una línea celular establecida es la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta realización, el SNAP-25 endógeno expresado por las células de una línea celular establecida es un SNAP-25 de origen natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de SNAP-25 o un subtipo de SNAP-25. En otros aspectos de esta realización, el SNAP-25 endógeno expresado por las células de una línea celular establecida es un SNAP-25 de origen natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70% de identidad de aminoácidos, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24.

En otra realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 exógeno. En un aspecto de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 de origen natural. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar el SNAP-25 de origen natural de la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23, o la SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 de origen natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de SNAP-25 o un subtipo de SNAP-25. En otros aspectos más de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 de origen natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70% de identidad de aminoácidos, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24.

En otro aspecto de la realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 de origen no natural. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 de origen no natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea de células establecidas están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 de origen no 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 respecto a la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO:

10, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea de células establecidas están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un SNAP-25 de origen no 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 respecto a la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24.

Los ensayos que detectan la escisión de un SNAP-25 después de la exposición a una endopeptidasa redirigida pueden utilizarse para evaluar si una célula está expresando un SNAP-25 endógeno o exógeno. En estos ensayos, se detectaría en las células que expresan un SNAP-25 después del tratamiento con endopeptidasa redirigida la generación de un producto de escisión de SNAP-25. Los ejemplos no limitantes de análisis de transferencia de Western específicos, así como los reactivos bien caracterizados, condiciones y protocolos están disponibles de proveedores comerciales que incluyen, sin limitación, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; BioRad laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI y Stratagene, Inc., La Jolla, CA. Se entiende que estos y ensayos similares para escisión de SNAP-25 pueden ser útiles en la identificación de las células que expresan un SNAP-25 endógeno o exógeno.

Como ejemplos no limitantes, puede utilizarse análisis de transferencia de Western utilizando un anticuerpo que reconoce un producto de escisión de SNAP-25 o tanto las formas de SNAP-25 escindida como no escindida para ensayo para la captación de la endopeptidasa redirigida. Los ejemplos de anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 útiles para estos ensayos incluyen, sin limitación, anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -SNAP-25 SMI-81 (Stemberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -SNAP-25 CI 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -SNAP-25 CI 71.2 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -SNAP-25 SP12 (Abcam, Cambridge, MA), antisuero policlonal de conejo  $\alpha$ -SNAP-25 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), antisuero policlonal de conejo  $\alpha$ -SNAP-25 (AbcamCambridge, MA), y antisuero policlonal de conejo  $\alpha$ -SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO).

Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un receptor de endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "receptor de endopeptidasa redirigida" se refiere a cualquier recepción endopeptidasa redirigida de origen natural o un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que interactúa preferentemente con una endopeptidasa redirigida de una manera que provoca una respuesta de actividad endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "interactúa preferentemente" se refiere a la constante de disociación en equilibrio (KD) de endopeptidasa redirigida para un receptor de endopeptidasa redirigida es como mínimo un orden de magnitud inferior a la de la endopeptidasa redirigida para cualquier otro receptor en la superficie celular. La constante de disociación en equilibrio, un tipo específico de la constante de equilibrio que mide la propensión de un complejo endopeptidasa redirigida – receptor de endopeptidasa redirigida para separarse (disociarse) de forma reversible en sus componentes moleculares, es decir la endopeptidasa redirigida y el receptor de endopeptidasa redirigida, se define como  $KD = Ka/Kd$  en equilibrio. La constante de asociación (Ka) se define como  $Ka = [C]/[L] [R]$  y la constante de disociación (Kd) se define como  $Kd = [L] [R] + [C]$ , donde [L] es igual a la concentración molar de endopeptidasa redirigida, [R] es la concentración molar de un receptor de endopeptidasa redirigida, [C] es la concentración molar del complejo endopeptidasa-receptor, y donde están todas las concentraciones de dichos componentes cuando el sistema está en equilibrio. Cuanto menor sea la constante de disociación, más fuertemente unida está la endopeptidasa redirigida a su receptor, o mayor será la afinidad entre endopeptidasa redirigida y el receptor de endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, la constante de disociación de endopeptidasa redirigida para su receptor es como mínimo dos órdenes de magnitud menor, como mínimo tres órdenes de magnitud menor, como mínimo cuatro órdenes de magnitud menor, o como mínimo cinco órdenes de magnitud menor que la de la endopeptidasa redirigida para cualquier otro receptor. En otros aspectos de esta realización, la afinidad de unión de la endopeptidasa redirigida que preferentemente interactúa con su receptor puede tener una constante de disociación en equilibrio (KD) 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 la endopeptidasa redirigida que preferentemente interactúa con su receptor puede tener una constante de disociación en equilibrio (KD) 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 de 10 nM o menos. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "provoca una respuesta de actividad endopeptidasa redirigida" se refiere a la capacidad de un receptor de endopeptidasa redirigida para interactuar con una endopeptidasa redirigida para formar un complejo endopeptidasa/ receptor y la posterior internalización de ese complejo en el citoplasma de la célula.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural" se refiere a cualquier receptor de endopeptidasa redirigida producido por un proceso natural, incluyendo, sin limitación, isoformas de receptor de endopeptidasa redirigida producidas a partir de una modificación post-traduccional, una transcripción cortada y empalmada de forma alternativa, o una mutación espontánea y subtipos de

receptores de endopeptidasa redirigida. Un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural incluye, sin limitación, receptores de opioides de origen natural como un receptor similar a opioide 1 (ORL1), un receptor opioide  $\delta$  (DOR), un receptor opioide  $\kappa$  (KOR) y un receptor opioide  $\mu$  (MOR), tales como los descritos en Christopher Evans y col., *Opioid Receptor Genes*, Patente de los E.E.U.U. 6.265.563; Christopher Evans y col., *Methods of Screening Modulators of Opioid Receptor Activity*, Patente de los E.E.U.U. 6.432.652; Christopher Evans y col., *Opioid Receptors and Methods of Use*, Patente de los E.E.U.U. 7.282.563; y Christopher Evans y col., *Delta Opioid Receptor Proteins*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0219925. Otros ejemplos de un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural incluyen, sin limitación, el receptor de galanina 1, el receptor de galanina 2 y el receptor de galanina 3. En la técnica se conocen receptores opioides de origen natural de otras especies de vertebrados, tales como: por ejemplo, primate, vaca, perro, ratón, rata, pollo, pescado y pueden ser utilizados en aspectos de la presente memoria descriptiva.

Un ORL1 de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 26, o uno 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 la SEQ ID NO: 25 o la SEQ ID NO: 26. Un DOR de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28, o uno 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 la SEQ ID NO: 27 o la SEQ ID NO: 28. Un KOR de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 29 y la SEQ ID NO: 30, o uno 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 la SEQ ID NO: 29 o la SEQ ID NO: 30. Un MOR de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 31 o uno 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 la SEQ ID NO: 31.

Un receptor de galanina 1 de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137 y la SEQ ID NO: 138, o uno 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 la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137 o la SEQ ID NO: 138. Un receptor de galanina 2 de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 139, o uno 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 la SEQ ID NO: 139. Un receptor de galanina 3 de origen natural incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 140, o uno 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, o 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 140.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "variante del receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural" se refiere a cualquier receptor de endopeptidasa redirigida producido con ayuda de manipulación humana o de diseño, incluyendo, sin limitación, un receptor de endopeptidasa redirigida producido por ingeniería genética mediante mutagénesis al azar o diseño racional y un receptor de endopeptidasa redirigida producido por síntesis química. Ejemplos no limitantes de variantes del receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural incluyen, por ejemplo, variantes conservativas del receptor de endopeptidasa redirigida, variantes no conservativas del receptor de endopeptidasa redirigida, variantes quiméricas del receptor de endopeptidasa redirigida y fragmentos activos del receptor de endopeptidasa redirigida.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural" se refiere a cualquier receptor de endopeptidasa redirigida cuya estructura se modificó con la ayuda de manipulación humana, incluyendo, sin limitación, un receptor de endopeptidasa redirigida producido por ingeniería genética mediante mutagénesis al azar o diseño racional y un receptor de endopeptidasa redirigida producido por síntesis química in vitro. Un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural puede sustituir, delecionar 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 la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140.

De este modo, en una realización, un receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural tal como: por ejemplo, ORL1, DOR, KOR o MOR. En aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es una isoforma del receptor de endopeptidasa redirigida o un subtipo del receptor de endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural es el receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural de la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 31. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70% de identidad de aminoácidos, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 31.

En otra realización, un receptor de endopeptidasa redirigida es un no-natural receptor de endopeptidasa redirigida, tal como: por ejemplo, un ORL1 manipulado genéticamente, un DOR manipulado genéticamente, un KOR manipulado genéticamente o un MOR manipulado genéticamente. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 31. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no 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 respecto a la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 31. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no 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 respecto a la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 31.

En otra realización, un receptor de endopeptidasa redirigida es receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural tal como: por ejemplo, receptor de galanina 1, receptor de galanina 2 o receptor de galanina 3. En aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es una isoforma del receptor de endopeptidasa redirigida o un subtipo del receptor de endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural es el receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural de la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70% de identidad de aminoácidos, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140.

En otra realización, un receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural, tales como: por ejemplo, un receptor de galanina 1 manipulado genéticamente, un receptor de galanina 2 manipulado o un receptor de galanina 3 manipulado genéticamente. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un endopeptidasa redirigida receptor de origen no natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida no manipulado 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 respecto a la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140. En otros aspectos de esta realización, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no 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 respecto a la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140.

Un receptor de endopeptidasa redirigida puede ser un receptor de endopeptidasa redirigida endógeno o un receptor de endopeptidasa redirigida exógeno. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "receptor de endopeptidasa redirigida endógeno" se refiere a un receptor de endopeptidasa redirigida naturalmente presente en la célula dado que está codificado naturalmente dentro del genoma de la célula, tal que la célula inherentemente expresa el receptor de endopeptidasa redirigida sin la necesidad de una fuente externa de receptor de endopeptidasa redirigida o una fuente externa de material genético que codifica un receptor de endopeptidasa redirigida. La expresión de un receptor endógeno de endopeptidasa redirigida puede ser con o sin estimulación ambiental tal como por ejemplo, diferenciación celular o activación del promotor. Por ejemplo, las siguientes líneas celulares establecidas expresan como mínimo un receptor endógeno de endopeptidasa redirigida: P33 AGN, Neuro-2a, SiMa y SK-N-DZ. Un receptor endógeno de endopeptidasa redirigida sólo puede ser un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural o variantes de origen natural del mismo.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "receptor de endopeptidasa redirigida exógeno" se refiere a un receptor de endopeptidasa redirigida expresado en una célula a través de la introducción de una fuente externa de receptor de endopeptidasa redirigida o una fuente externa de material genético que codifica un receptor de endopeptidasa redirigida por manipulación humana. La expresión de un receptor de endopeptidasa redirigida exógeno puede ser con o sin estimulación del medio ambiente tal como, por ejemplo, diferenciación celular o activación del promotor. Como ejemplo no limitante, las células de una línea celular establecida pueden expresar uno o más receptores de endopeptidasa redirigida exógenos mediante la transfección transitoria o estable de una molécula de polinucleótido que codifica un receptor de endopeptidasa redirigida, tal como: por ejemplo, un ORL1, un DOR, un KOR, un MOR, un receptor de galanina 1, un receptor de galanina 2 o un receptor de galanina 3. Como

otro ejemplo no limitante, células de una línea celular establecida pueden expresar uno o más receptores de endopeptidasa redirigida exógenos mediante transfección de proteínas de los receptores de endopeptidasa redirigida, tales como: por ejemplo, un ORL1, un DOR, un KOR, un MOR, un receptor de galanina 1, un receptor de galanina 2 o un receptor de galanina 3. Un receptor de endopeptidasa redirigida exógeno puede ser un receptor de endopeptidasa redirigido de origen natural o variantes de origen natural del mismo, o un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural o variantes de origen no natural del mismo.

De este modo, en una realización, células de una línea celular establecida expresan un receptor endógeno de endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, el receptor endógeno de endopeptidasa redirigida expresado por las células de una línea celular establecida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural. En otros aspectos de esta realización, el receptor endógeno de endopeptidasa redirigida expresado por las células de una línea celular establecida es la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140. En otros aspectos de esta realización, el receptor endógeno de endopeptidasa redirigida expresado por las células de una línea celular establecida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural, tal como, por ejemplo, una isoforma del receptor de endopeptidasa redirigida o un subtipo del receptor de endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, el receptor endógeno de endopeptidasa redirigida expresado por las células de una línea celular establecida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70% de identidad de aminoácidos, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140.

En otra realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida exógeno. En un aspecto de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar la natural receptor de endopeptidasa redirigida de la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140. En otros aspectos más de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural, tal como: por ejemplo, una isoforma del receptor de endopeptidasa redirigida o un subtipo de receptores de endopeptidasa redirigida. En otros aspectos más de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70% de identidad de aminoácidos, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140.

En otro aspecto de la realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ejemplo, como mínimo el 70%, como mínimo el 75%, como mínimo el 80%, como mínimo el 85%, como mínimo el 90% o como mínimo el 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no 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 de la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no 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 respecto a la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137, la SEQ ID NO: 138, la SEQ ID NO: 139 o la SEQ ID NO: 140.

En otra realización, células de una línea de células establecidas están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un ORL1 exógeno, un DOR exógeno, un KOR exógeno, un MOR exógeno o cualquier combinación de éstos. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma



transitoria o estable para expresar un ORL1 de origen natural, un DOR de origen natural, un KOR de origen natural, un MOR de origen natural o cualquier combinación de éstos. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un ORL1 de origen no natural, un DOR de origen no natural, un KOR de origen no natural, un MOR de origen no natural o cualquier combinación de éstos. En otros aspectos más de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un ORL1 de origen natural o un ORL1 de origen no natural, un DOR de origen natural o un DOR de origen no natural, un KOR de origen natural o un KOR de origen no natural, un MOR de origen natural o un MOR de origen no natural o cualquier combinación de éstos.

En otra realización, células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de galanina 1 exógeno, un receptor de galanina 2 exógeno, un receptor de galanina 3 exógeno o cualquier combinación de éstos. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de galanina 1 de origen natural, un receptor de galanina 2 de origen natural, un receptor de galanina 3 de origen natural o cualquier combinación de éstos. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de galanina 1 de origen no natural, un receptor de galanina 2 de origen no natural, un receptor de galanina 3 de origen no natural, o cualquier combinación de éstos. En otros aspectos más de esta realización, las células de una línea celular establecida están manipuladas de forma transitoria o estable para expresar un receptor de galanina 1 de origen natural o un receptor de galanina 1 de origen no natural, un receptor de galanina 2 de origen natural o un receptor de galanina 2 de origen no natural, un receptor de galanina 3 de origen natural o un receptor de galanina 3 de origen no natural o cualquier combinación de éstos.

Las células que expresan uno o más receptores endógenos o exógenos de endopeptidasa redirigida pueden identificarse por métodos rutinarios incluyendo ensayos directos e indirectos para captación de endopeptidasa redirigida. Pueden utilizarse ensayos que determinan propiedades de unión o captación de endopeptidasa redirigida para evaluar si una célula está expresando un receptor de endopeptidasa redirigida. Dichos ensayos incluyen, sin limitación, ensayos de reticulación utilizando endopeptidasa redirigida marcada, tales como, por ejemplo, [125I] endopeptidasa redirigida, véase, por ejemplo, Noriko Yokosawa y col., Binding of Clostridium botulinum type C neurotoxin to different neuroblastoma cell lines, 57 Infect. Immun. 272-277 (1989); Noriko Yokosawa y col., Binding of botulinum type C1, D and E neurotoxins to neuronal cell lines and synaptosomes, 29 Toxicon 261-264 (1991); y Tei-ichi Nishiki y col., 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 limitantes incluyen ensayos inmunocitoquímicos que detectan la unión a endopeptidasa redirigida utilizando anticuerpos marcados o sin marcar, véase, por ejemplo, Atsushi Nishikawa y col., 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, véase, por ejemplo, Yukako Fujinaga y col., Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes, Microbiology 150(Pt 5) 1529-1538 (2004), que detectan endopeptidasa redirigida unida utilizando anticuerpos marcados o sin marcar. Los anticuerpos útiles para estos ensayos incluyen, sin limitación, anticuerpos seleccionados contra endopeptidasa redirigida o anticuerpos seleccionados contra un receptor de endopeptidasa redirigida, tal como, por ejemplo, ORL1, DOR, KOR, MOR, receptor de galanina 1, receptor de galanina 2 o receptor de galanina 3. Si el anticuerpo está marcado, la unión de la molécula puede ser detectada por diversos medios, incluyendo el análisis de transferencia de Western, observación microscópica directa de la localización celular del anticuerpo, medición del anticuerpo unido a la célula o sustrato después de una etapa de lavado, citometría de flujo, electroforesis o electroforesis capilar, empleando las técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Si el anticuerpo no está marcado, se puede emplear 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 similares que determinan las propiedades o características de captación de endopeptidasa redirigida pueden ser útiles en la identificación de las células que expresan receptores endógenos o exógenos de endopeptidasa redirigida.

Ensayos que monitorizan la liberación de una molécula después de exposición a una endopeptidasa redirigida pueden utilizarse también para determinar si una célula está expresando uno o más receptores de endopeptidasa redirigida endógenos o exógenos. En estos ensayos, la inhibición de la liberación de la molécula se produciría en las células que expresan un receptor de endopeptidasa redirigida después del tratamiento con endopeptidasa redirigida. Ensayos bien conocidos incluyen métodos que miden la inhibición de la liberación de catecolaminas radiomarcadas de neuronas, tales como, por ejemplo, [3H] noradrenalina o la liberación de dopamina [3H], véase por ejemplo, A Fassio y col., Evidence for calcium-dependent vesicular transmitter release insensitive to tetanus toxin and botulinum toxin type F, 90(3) Neurosciencie 893-902 (1999); Sara Stigliani y col., 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 mediante un procedimiento fluorométrico, véase, por ejemplo, Anton de Paiva y col., 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 y col., 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 y col., 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 limitantes incluyen ensayos que miden la inhibición de la liberación de la hormona de las células endocrinas, tales como, por ejemplo, pituitaria anterior o células ováricas. Se entiende que estos ensayos similares para la liberación de la molécula pueden ser útiles en la identificación de las células que expresan receptores endógenos o exógenos de endopeptidasa redirigida.

Análisis que detectan la escisión de un sustrato de SNAP-25 después de exposición a una endopeptidasa redirigida también puede utilizarse para evaluar si una célula está expresando uno o más receptores de endopeptidasa redirigida endógenos o exógenos. En estos ensayos, la generación de un producto de escisión de SNAP-25, o la desaparición de la SNAP-25 intacta, se detectaría en las células que expresan un receptor de endopeptidasa redirigida después de un tratamiento con endopeptidasa redirigida. Los ejemplos no limitantes de análisis de transferencia de Western específicos, así como los reactivos bien caracterizados, condiciones y protocolos están disponibles de proveedores comerciales que incluyen, sin limitación, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; BioRad laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI y Stratagene, Inc., La Jolla, CA. Se entiende que estos ensayos similares para escisión de SNAP-25 pueden ser útiles en la identificación de las células que expresan receptores de endopeptidasa redirigida endógenos o exógenos.

Como ejemplos no limitantes, análisis de transferencia de Western utilizando un anticuerpo que reconoce el producto de SNAP-25 escindido o las formas de SNAP-25 tanto escindida como sin escindir pueden utilizarse para ensayar para la captación de una endopeptidasa redirigida. Los ejemplos de anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 útiles para estos ensayos incluyen, sin limitación, anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -SNAP-25 SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -SNAP-25 Cl 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -SNAP-25 Cl 71.2 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -SNAP-25 SP12 (Abcam, Cambridge, MA), antisuero policlonal de conejo  $\alpha$ -SNAP-25 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), antisuero policlonal de conejo  $\alpha$ -SNAP-25 S9684 (SigmaSt. Louis, MO), y antisuero policlonal de conejo  $\alpha$ -SNAP-25 (Abcam, Cambridge, MA).

Aspectos de la presente divulgación proporcionan células que a través de manipulación genética o ingeniería recombinante se les hace expresar un SNAP-25 exógeno y/o uno o más receptores de endopeptidasa redirigida exógenos. Las células útiles para expresar un SNAP-25 exógeno o uno o más receptores de endopeptidasa redirigida exógenos a través de manipulación genética o ingeniería recombinante incluyen células neuronales y células no neuronales que pueden o no expresar un SNAP-25 endógeno o uno o más receptores endógenos de endopeptidasa redirigida. Además, se entiende que dicha células genéticamente manipuladas o manipuladas por vía recombinante pueden expresar un SNAP-25 exógeno y uno o más receptores exógenos de endopeptidasa redirigida bajo control de un elemento promotor, elemento potenciador constitutivo, específico de tejido, específico de células o inducible, o ambos. Se entiende que cualquier célula es útil mientras la célula pueda ser manipulada genéticamente o por vía recombinante para expresar un SNAP-25 exógeno o uno o más receptores de endopeptidasa redirigida exógenos y sea capaz de experimentar actividad endopeptidasa redirigida.

Métodos útiles para introducir en una célula una molécula de Polinucleótido exógena que codifica un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25, tales como: por ejemplo, un SNAP-25, un ORL1, un DOR, un KOR o un MOR, incluyen, sin limitación, métodos de administración mediados químicamente, tales como: por ejemplo, mediado por fosfato de calcio, mediado por dietil-aminoetil (DEAE) dextrano, mediado por lípidos, mediado por polietileneimina (PEI), mediado por polilisina y mediado por polibreno; métodos de administración mediado físicamente, tales como: por ejemplo, suministro mediante partículas biolísticas, Microinyección, fusión de protoplasto y electroporación; y métodos de administración mediado por virus, tales como: por ejemplo, transfección mediada por retrovirus, véase por ejemplo, el documento *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 y col., *Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells*, (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 & sons, págs 9.16.4-9.16.11 (2000). Un experto en la materia entiende que la selección de un método específico para introducir una molécula polinucleotídica en una celda de dependerá, en parte, de si la célula contendrá de forma estable o transitoria un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente a un sustrato de SNAP-25. Ejemplos no limitantes de molécula polinucleotídica que codifica un componente necesario para que las células experimentan el mecanismo celular global por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25 son los siguientes: molécula polinucleotídica de ORL1 de la SEQ ID NO: 61 o la SEQ ID NO: 62; Molécula polinucleotídica de DOR de la SEQ ID NO: 63 o la SEQ ID NO: 64; Molécula polinucleotídica de KOR de la SEQ ID NO: 65 o la SEQ ID NO: 66; Molécula polinucleotídica de MOR de la SEQ ID NO: 67; molécula polinucleotídica del receptor de galanina 1 de la SEQ ID NO: 141, la SEQ ID NO: 142 o la SEQ ID NO: 143, molécula polinucleotídica del receptor de galanina 2 de la SEQ ID NO: 144, o molécula polinucleotídica del receptor de galanina 3 de la SEQ ID NO: 145 y molécula polinucleotídica de la SNAP-25 de la SEQ ID NO: 68 o la SEQ ID NO: 69.

Métodos de administración mediados químicamente son conocidos por un experto en la materia 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 y col., *Polyethylenimine Strategies for Plasmid Delivery to Brain-Derived Cells*, 33 (2) *métodos* 144 - 150 (2004). Tales métodos de administración mediados químicamente pueden prepararse mediante los procedimientos estándar y están disponibles en el mercado, véase, por ejemplo, el Kit de transfección CellPect (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).

Métodos de administración mediados físicamente son conocidos por un experto en la materia y se describen en, por ejemplo, Jeike E. Biewenga y col, *Plasmid-Mediated Gene Transfer in Neurons using the Biolistics Technique* plásmido 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 y col., *In Vitro and In Vivo Electric Field-Mediated Permeabilization*, 33 (2) *métodos* 126 - 135 (2004); y Oliver Greschet y col., *New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells*, 33 (2) *Methods* 151 - 163 (2004).

Métodos de administración mediados por virus son conocidos a un experto en la materia y se describen en, por ejemplo, Chooi M. Lai y col., *Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors*, 21(12) *DNA Cell Biol* 895 - 913 (2002); Ilya Frolov y col., *Alphavirus-Based Expression Vectors: Strategies and Applications*, 93 (21) *Proc. National Acad. Sci. E.E.U.U.* "11371 - 11377 (1996); Roland Wolkowicz y col., *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 y col., *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 de E.E.U.U Nº 5. 464.758; Hermann Bujard & Manfred Gossen, *Methods for Regulating Gene Expression*, patente de E.E.U.U Nº 5.814.618; David S. Hogness, *Polynucleotides Encoding Insect Steroid Hormone Receptor Polypeptides and Cells Transformed With Same*, patente de E.E.U.U Nº 5.514.578; David S. Hogness, *Polynucleotide Encoding Insect Ecdysone Receptor*, Patente de los E.E.U.U. 6.245.531; Elisabetta Vegeto y col., *Progesterone Receptor Having C. Terminal Hormone Binding Domain Truncations*, patente de E.E.U.U Nº 5.364.791; Elisabetta Vegeto y col., *Mutated Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy*, patente de E.E.U.U Nº 5.874.534. Dichos métodos de administración mediados por virus pueden prepararse mediante los procedimientos estándar y están disponibles en el mercado, véase, por ejemplo, el sistema de expresión adenoviral ViraPower™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y el manual de instrucciones del sistema de expresión adenoviral ViraPower™ 25 - 0543 versión A, Invitrogen, Inc., (15 de julio de 2002); y el sistema vectorial adenoviral AdEasy™ (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) y el manual de instrucciones del sistema vectorial adenoviral AdEasy™ 064004f, Stratagene, Inc. Además, dichos sistemas de vectores virales puede prepararse mediante métodos estándar y están disponibles en el mercado, véase, por ejemplo, los sistemas de expresión génica BD™ Tet - Off y Tet - On (BD Biosciences - Clontech, Palo Alto, CA) y el manual del usuario de los sistemas de expresión génica BD™ Tet - Off y Tet - On, PT3001 - 1, BD Biosciences Clontech, (Mar. 2003), el sistema GeneSwitch™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y el sistema de expresión regulado por mifepristona GeneSwitch™ System A para las células de mamíferos, versión D, 25 - 0313, Invitrogen, Inc., (04 de noviembre de 2002); El sistema de expresión lentiviral ViraPower™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y el manual de instrucciones del sistema de expresión lentiviral ViraPower™ 25 - 0501 versión E, Invitrogen, Inc., (08 de diciembre de 2003); y el sistema de expresión en mamífero inducible retroviral Compleat Control® (Stratagene, La Jolla, California) y el manual de instrucciones del sistema de expresión en mamífero inducible retroviral Complete Control®, 064005e.

De este modo, en una realización, células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen una molécula polinucleotídica que codifica un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular en general por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25. En otra realización, células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen una molécula polinucleotídica que codifica una pluralidad de componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo celular en general por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25. En aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen una molécula polinucleotídica que codifica ORL1, DOR, KOR, MOR o SNAP-25. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 61 o la SEQ ID NO: 62 que codifica ORL1. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 63 o la SEQ ID NO: 64 que codifican DOR. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 65 o la SEQ ID NO: 66 que codifican KOR. En otros aspectos más de esta realización, las células de una

línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 67 que codifica MOR.

5 En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 141, la SEQ ID NO: 142 o la SEQ ID NO: 143 que codifica el receptor de galanina 1. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 144 que codifica el receptor de galanina 2. En otros aspectos más de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 145 que codifica el receptor de galanina 3. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida transitoriamente contienen la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 68 o la SEQ ID NO: 69 que codifica SNAP-25.

15 En otra realización, células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable una molécula polinucleotídica que codifica un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25. En otra realización, células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable una molécula polinucleotídica que codifica una pluralidad de componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo celular global por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25. En aspectos de esta realización, células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable una molécula polinucleotídica que codifica ORL1, DOR, KOR, MOR o SNAP-25. En aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 61 o la SEQ ID NO: 62 que codifica ORL1. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a la actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 63 o la SEQ ID NO: 64 que codifica DOR. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 65 o la SEQ ID NO: 66 que codifica KOR. En otros aspectos más de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 67 que codifica MOR.

35 En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 141, la SEQ ID NO: 142 o la SEQ ID NO: 143 que codifica el receptor de galanina 1. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 144 que codifica el receptor de galanina 2. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 145 que codifica el receptor de galanina 3. En otros aspectos de esta realización, las células de una línea celular establecida susceptible a actividad endopeptidasa redirigida contienen de forma estable la molécula polinucleotídica de la SEQ ID NO: 68 o la SEQ ID NO: 69 que codifica SNAP-25.

45 Tal como se mencionó anteriormente, un componente exógeno necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25, tales como, por ejemplo, un SNAP-25, un ORL1, un DOR, un KOR, un MOR, un receptor de galanina 1, un receptor de galanina 2 o un receptor de galanina 3, desvelado en la presente memoria descriptiva puede introducirse en una célula. Cualquier método útil para introducir dicho componente exógeno con un agente de administración a una población celular puede ser útil con la salvedad de que este método introduce transitoriamente el componente exógeno desvelado en la presente memoria descriptiva en como mínimo el 50% de las células dentro de una población celular dada. De este modo, aspectos de esta realización pueden incluir una población celular en la cual, por ejemplo, como mínimo el 50%, como mínimo el 60%, como mínimo el 70%, como mínimo el 80% o como mínimo el 90% de la población celular dada transitoriamente contiene un componente exógeno necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global por el que una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25, tal como, por ejemplo, un SNAP-25, un ORL1, un DOR, un KOR, un MOR, un receptor de galanina 1, un receptor de galanina 2 o un receptor de galanina 3, desvelado en la presente memoria descriptiva. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "agente de administración" se refiere a cualquier molécula que permite o favorece la interiorización de un unido covalentemente, unido no covalentemente o unido de cualquier otra manera con un polipéptido en una célula. Por lo tanto, La expresión "agente de administración" incluye, sin limitación, las proteínas, péptidos, peptidomiméticos, pequeñas moléculas, las moléculas polinucleotídicas, liposomas, lípidos, virus, retrovirus y células que, sin limitación, transportan una molécula enlazada covalente o no covalentemente a la membrana de la célula, el citoplasma de las células o el núcleo. Además, se entiende que la expresión "agente de administración" abarca las moléculas que son internalizadas por cualquier mecanismo, incluyendo agentes de administración que funcionan mediante endocitosis mediada por receptores y aquellas que son independientes de endocitosis mediada por receptores.

Un agente de administración también puede ser un agente que permite o mejora la captación celular de un componente enlazado covalentemente, como SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, receptor de galanina 1, receptor de galanina 2 o receptor de galanina 3, tales como: por ejemplo, por conjugación química o por proteínas de fusión producidas genéticamente. Métodos que enlazan covalentemente agentes de administración y métodos de utilización de tales agentes se describen en, por ejemplo, Steven F. Dowdy, *Protein Transduction System and Methods of Use Thereof*, Publicación internacional No WO 00/34308; Gerard Chassaing & Alain Prochiantz, *Peptides which can be Used as Vectors for the Intracellular Addressing of Active Molecules*, patente de E.E.U.U. n° 6.080.724; Alan Frankel y col., *Fusion Protein Comprising TAT-derived Transport Moiety*, patente de E.E.U.U. n° 5.674.980; Alan Frankel y col., *TAT-derived Transport Polypeptide Conjugates*, patente de E.E.U.U. n° 5.747.641; Alan Frankel y col., *TAT-derived Transport Polypeptides and Fusion Proteins*, patente de E.E.U.U. n° 5.804.604; Peter F. J. O'Hare y col., *Use of Transport Proteins* patente de E.E.U.U. n° 6.734.167; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, patente de E.E.U.U. n° 5.807.746; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, patente de E.E.U.U. n° 6.043.339; Yao-Zhong Lin y col., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, patente de E.E.U.U. n° 6.248.558; Yao-Zhong Lin y col., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, patente de E.E.U.U. n° 6.432.680; Jack J. Hawiger y col., *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, patente de E.E.U.U. n° 6.495.518; Yao-Zhong Lin y col., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity* patente de E.E.U.U. n° 6.780.843; Jonathan B. Rothbard & A Paul Wender, *Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes*, patente de E.E.U.U. n° 6.306.993; Jonathan B. Rothbard & A Paul Wender, *Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes*, patente de E.E.U.U. n° 6.495.663; y Pamela B. Davis y col., *Fusion Proteins for Protein Delivery*, N° de patente US 6.287.817.

Un agente de administración también puede ser un agente que permite o mejora la captación celular de un componente no covalentemente asociado, como SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, receptor de galanina 1, receptor de galanina 2 o receptor de galanina 3. Métodos que funcionan en ausencia de enlace covalente y métodos de utilización de tales agentes se describen en, por ejemplo, Gilles Divita y col, *Peptide-Mediated Transfection Agents and Methods of Use*, patente de E.E.U.U. n° 6.841.535; Philip L Felgner y Olivier Zelphati, *Intracellular Protein Delivery Compositions and Methods of Use*, Publicación de patente de Estados Unidos N° 2003/0008813; y Michael Karas, *Intracellular Delivery of Small Molecules, Proteins and Nucleic Acids*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2004/0209797. Tales agentes de administración peptídicos pueden ser preparados y utilizados mediante los métodos estándar y están disponibles en el mercado, véase, por ejemplo el reactivo CHARIOT™ (Active Motif, Carlsbad, CA); Reactivo BIO-PORTER® (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA), reactivo de administración proteico BIO TREK™ (Stratagene, La Jolla, California) y reactivo de transfección de proteínas PROJECT™ (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

Aspectos de la presente divulgación constituyen, en parte, una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "muestra que comprende una endopeptidasa redirigida" se refiere a cualquier materia biológica que contiene o potencialmente contiene una endopeptidasa redirigida activa. Una variedad de muestras puede ensayarse según un método establecido en la presente memoria descriptiva incluyendo, sin limitación, endopeptidasa redirigida purificada, parcialmente purificada o no purificada; endopeptidasa redirigida de cadena única recombinante o de doble cadena con una secuencia de origen natural o de origen no natural; endopeptidasa redirigida recombinante con una especificidad de proteasa modificada; endopeptidasa redirigida recombinante con una especificidad celular alterada; endopeptidasa redirigida a granel; un producto de endopeptidasa redirigida formulado; y las células o lisados celulares impuros, fraccionados o parcialmente purificados de por ejemplo, bacterias, levaduras, insectos o fuentes mamíferas; sangre, plasma o suero; alimentos crudos, parcialmente cocinados, cocinados o procesados; bebidas; alimentos para animales; muestras de suelo; muestras de agua; sedimentos de estanque; lociones; cosméticos; y formulaciones clínicas. Se entiende que el término la muestra abarca muestras de tejido, incluyendo, sin limitación, muestras de tejidos de mamíferos, las muestras de tejido de animales como ovejas, muestras de tejido de vaca y cerdo; muestras de tejido de primates; y muestras de tejido humano. Dichas muestras comprenden, sin limitación, muestras intestinales tales como muestras intestinales infantiles, y muestras de tejido obtenidas de una herida. Como ejemplos no limitantes, un método para detectar cantidades picomolares de actividad endopeptidasa redirigida puede ser útil para determinar la presencia o actividad de la endopeptidasa redirigida en una muestra de comida o bebida; ensayar una muestra de un humano o animal, por ejemplo, expuesta a una endopeptidasa redirigida o que tiene uno o más síntomas de botulismo; para seguir la actividad durante la producción y purificación de endopeptidasa redirigida a granel; ensayar un producto de endopeptidasa redirigida formulado utilizado en aplicaciones farmacéuticas o cosméticos; o ensayar un suero sanguíneo del sujeto para la presencia o ausencia de anticuerpos  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida neutralizantes.

Por lo tanto, en una realización, una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida es una muestra que comprende cualquier cantidad de endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta realización, una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida 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 endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta realización, una

muestra que comprende una endopeptidasa redirigida comprende aproximadamente 1 mM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.

5 Aspectos de la presente divulgación constituyen, en parte, aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “componente de SNAP-25 que  
10 comprende un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A” se refiere a un componente celular que contiene el producto de escisión de SNAP-25. Se prevé que cualquier método conveniente para enriquecer o aislar a un componente de SNAP-25 pueda ser útil, incluyendo, sin limitación, protocolos de lisis celular, protocolos de purificación en columna, inmunoprecipitación, purificación por afinidad y cromatografía de proteínas.

15 Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 enlazado a un soporte de fase sólida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “soporte de fase sólida” es sinónimo de “fase sólida” y se refiere a cualquier matriz que puede utilizarse para inmovilizar a un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 desvelado en la presente memoria descriptiva. Ejemplos no limitantes de soportes de fase sólida incluyen, por ejemplo, un tubo; una placa; una columna; clavijas o “tiras reactivas”; una partícula magnética, una perla u otros medios cromatográficos  
20 esféricos o fibrosos, como, por ejemplo, agarosa, sefarsa, sílice y plástico; y las láminas o membranas, tales como, por ejemplo, nitrocelulosa y fluoruro de polivinilideno (PVDF). El soporte de fase sólida puede ser construido utilizando una amplia variedad de materiales tales como: por ejemplo, vidrio, carbono, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, diazocelulosa o almidón. El soporte de fase sólida seleccionado puede tener una propiedad física que hace que sea fácilmente separable de material soluble o no unido y  
25 generalmente permite que los materiales no unidos, tales como: por ejemplo, el exceso de reactivos, subproductos de la reacción o disolventes, se separen o se retiren de otra forma (mediante, por ejemplo, lavado, filtración, centrifugación, etc.) del componente de ensayo unido al soporte de fase sólida. Ejemplos no limitantes de cómo realizar y utilizar un soporte de fase sólida se describen en, por ejemplo, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, *supra*, (2001); y Current Protocols in Molecular Biology, *supra*, (2004).

30 Aspectos de la presente divulgación que incluyen realizaciones de la invención definida por las reivindicaciones comprenden, en parte, detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A y un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo  
35 en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Se prevé que pueda utilizarse cualquier sistema de detección para poner en práctica los aspectos de este método basado en inmunología desvelado, con la salvedad de que la relación señal a ruido puede distinguir de manera estadísticamente significativa la señal del complejo antígeno-anticuerpo de la señal de fondo. Ejemplos no limitantes de sistemas de detección de base inmunológica incluyen el análisis de *immunoblot*, como transferencia de Western y *dot-Blot*, análisis de inmunoprecipitación, análisis de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y ELISA en sándwich. La detección de la señal puede lograrse mediante autorradiografía con imagenología o fosforimagenología (AU), quimioluminiscencia (CL), electroquimioluminiscencia (ECL), bioluminiscencia (BL), fluorescencia, transferencia de energía de resonancia, polarización en plano, colorimétrica o por citometría de flujo (FC). Descripciones de sistemas de detección de base inmunológica se desvelan por ejemplo, en Michael M. Rauhut, Chemiluminescence, en Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (Ed. Grayson, 3<sup>a</sup> ed., John Wiley and Sons, 1985); A. W. caballero, A Review of Recent Trends in Analytical Applications of Electrogenenerated Chemiluminescence, Trends Anal. Chem 18: 47-62 (1999); K Fahrnich, A., y col., Recent Applications of Electrogenenerated 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, 3<sup>a</sup> ed. 2001); Detection Systems, págs. A9.1-A9-49 (Sambrook & Russell, eds., Vol. 3, Molecular Cloning a Laboratory Manual 3<sup>a</sup> ed. 2001);  
45 Electrogenenerated Chemiluminescence, (Ed. Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004).

Un ELISA en sándwich (o inmunoensayo en sándwich) es un método basado en dos anticuerpos, que se unen a diferentes epítopos en el antígeno. Un anticuerpo de captura que tiene una elevada especificidad de unión por el antígeno de interés, está unido a una superficie sólida. El antígeno se añade a continuación seguido por la adición de un segundo anticuerpo conocido como el anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección se une al antígeno en un epítipo diferente que el anticuerpo de captura. El antígeno, por lo tanto, es ‘emparedado’ entre los dos anticuerpos. La afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno suele ser el principal determinante de la 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 utilizarse diferentes sistemas informadores, tales como, por ejemplo, una enzima unida al anticuerpo secundario y un sustrato informador donde la reacción enzimática constituye una lectura como la señal de detección. La señal generada es proporcional a la cantidad de antígeno diana presente en la muestra. El sustrato informador utilizado para medir el evento de unión determina el modo de detección. Un lector de placas espectrofotométrico se utiliza para la detección colorimétrica. Se han desarrollado sustratos quimioluminiscentes y electroquimioluminiscentes que amplifican adicionalmente la señal y pueden leerse en un lector luminiscente. El informador también puede ser una lectura  
65

fluorescente donde la etapa enzimática del ensayo se sustituye por un fluoróforo y la lectura se mide a continuación mediante un lector fluorescente. Los reactivos y protocolos necesarios para llevar a cabo un ELISA en sándwich con ECL están disponibles en el mercado, incluyendo, sin excepción, la plataforma de detección MSD sandwich ELISA-ECL (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

Así, en una realización de acuerdo con la invención definida en las reivindicaciones, detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que se une selectivamente a un epítipo de SNAP-25 tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A y un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A puede realizarse mediante un análisis inmunoblot, un análisis de la inmunoprecipitación, un ELISA o un ELISA en sándwich. En aspectos de esta realización, la detección se realiza utilizando un análisis inmunoblot 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 en sándwich, AU, CL, ECL, BL o FC.

Aspectos de la presente divulgación pueden ponerse en práctica de manera singleplex o multiplex. Un método basado en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida practicado de manera singleplex es uno que sólo detecta la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Un método basado en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida practicado de manera multiplex es uno que detecta de forma concurrente la presencia de dos o más complejos antígeno-anticuerpo; uno de los cuales es el complejo anticuerpo-antígeno que comprende un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; y el otro(s) de los cuales es el complejo antígeno-anticuerpo a una segunda, tercera, cuarta, etc., diferente proteína. Puede utilizarse una segunda proteína, por ejemplo, como control interno para minimizar la variabilidad de muestra a muestra normalizando la cantidad del complejo antígeno-anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25/SNAP-25 detectada respecto a la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectado para la segunda proteína. Como tal, la segunda proteína generalmente es una que es expresada consistentemente por la célula, tal como una proteína constitutiva. Los ejemplos no limitantes de una segunda útil, incluyen, por ejemplo, una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), sintaxina, citoquinas. Se describen los métodos de realización de un ensayo basado en inmunología en un modo múltiple por ejemplo, en 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 y col., Multiplexing Molecular Diagnostics and Immunoassays using Emerging Microarray Technologies, *Expert Rev Mol Diagn.* 7 (1): 87 - 98 (2007); S. X. Leng y col., ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 63 (8): 879 - 884 (2008).

Así, en una realización, un método basado en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida practicado de manera singleplex sólo detecta la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. En otra realización, un método basado en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida practicado de manera multiplex detectando de forma concurrente la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A y como mínimo otro complejo antígeno-anticuerpo para una proteína diferente de SNAP-25, como, por ejemplo, GAPDH o sintaxina.

Aspectos de la presente divulgación, en parte, proporcionan un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida" significa un mamífero que no responde plenamente a una terapia con endopeptidasa redirigida, o muestra un reducido efecto beneficioso de una terapia con endopeptidasa redirigida debido a que la respuesta inmunitaria de ese mamífero, directa o indirectamente, reduce la eficacia de la terapia. Un ejemplo no limitante de eficacia reducida sería la presencia en un mamífero de como mínimo un anticuerpo de neutralizante  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida que se une a endopeptidasa redirigida de una manera que reduce o evita la especificidad o actividad de la endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "terapia con endopeptidasa redirigida" significa un tratamiento, remedio, cura, curación, rehabilitación o cualquier otro medio de contrarrestar algo indeseable en un mamífero que requiere neuromodulación utilizando endopeptidasa redirigida o administrando a un mamífero una o más dosis controladas de un medicamento, preparación o mezcla de endopeptidasa redirigida que tiene un efecto medicinal, terapéutico, curativo, cosmético, correctivo o cualquier otro efecto beneficioso. La terapia con endopeptidasa redirigida abarca, sin limitación, la utilización de cualquier fragmento de la misma de origen natural o modificado, en cualquier formulación, combinado con cualquier portador o ingrediente activo y administrado mediante cualquier vía de administración.

Aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, una muestra de ensayo obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "muestra" se refiere a cualquier materia biológica que contiene o potencialmente contiene como mínimo un anticuerpo  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida. Un anticuerpo  $\alpha$ -endopeptidasa

redirigida puede ser un anticuerpo neutralizante  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida o un anticuerpo no neutralizante  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida” significa cualquier anticuerpo  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida que, en condiciones fisiológicas, se une a una región de una endopeptidasa redirigida de tal manera que reduzca o prevenga que la endopeptidasa redirigida ejerza su efecto en una terapia con endopeptidasa redirigida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpos no neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida” significa cualquier anticuerpo  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida que, en condiciones fisiológicas, se une a una región de un endopeptidasa redirigida, pero no impide que la endopeptidasa redirigida ejerza su efecto en una terapia con endopeptidasa redirigida. Se prevé que se puedan utilizar todas y cada una de las muestras que pueden contener anticuerpos  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida en este método, incluyendo, sin limitación, sangre, plasma, suero y fluido linfático. Además, todos y cada uno de los organismos capaces de generar anticuerpos  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida contra una endopeptidasa redirigida pueden servir como una fuente para una muestra que incluye, aunque sin limitarse a, aves y mamíferos, como ratones, ratas, cabras, ovejas, caballos, burros, vacas, primates y seres humanos. Se describen ejemplos no limitantes de protocolos específicos para la recogida de sangre y la preparación de suero en, por ejemplo, Marjorie Schaub Di Lorenzo & Susan King Strasinger, BLOOD COLLECTION IN HEALTHCARE (F.A. Davis Company, 2001); y Diana Garza & Kathleen Becán-McBride, PHLEBOTOMY HANDBOOK: BLOOD COLLECTION ESSENTIALS (Prentice Hall, 6a ed., 2002). Estos protocolos son procedimientos de rutina bien al alcance de un experto en la materia y de la enseñanza en el presente documento. Una muestra de ensayo puede obtenerse de un organismo antes de la exposición a una endopeptidasa redirigida, después de un único tratamiento con endopeptidasa redirigida, después de múltiples tratamientos con endopeptidasa redirigida, antes del inicio de la resistencia a la terapia con endopeptidasa redirigida o después de la aparición de resistencia a la terapia con endopeptidasa redirigida.

Aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, una muestra de control. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “muestra de control” significa cualquier muestra en la que la presencia o ausencia de la muestra de ensayo es conocida e incluye muestras de control tanto positivo como negativo. Con respecto a anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida, una muestra de control negativo puede ser obtenida de un individuo que nunca había sido expuesto a endopeptidasa redirigida y puede incluir, sin limitación, una muestra del mismo individuo que suministra la muestra de ensayo, pero tomada antes de someterse a una terapia con endopeptidasa redirigida; una muestra tomada de un individuo diferente que nunca ha sido expuesto a endopeptidasa redirigida; una muestra reunida tomada de una pluralidad de individuos diferentes nunca expuestos a BoNT/A. Con respecto a anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida, una muestra de control positivo puede obtenerse de un individuo que manifiesta inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida e incluye, sin limitación, individuo que da positivo en un ensayo de pruebas basadas en pacientes; individuo que da positivo en un bioensayo in vivo; e individuo que muestra hiperinmunidad, por ejemplo, un individuo vacunado contra endopeptidasa redirigida.

Además está previsto que los anticuerpos  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida pueden ser purificados de una muestra. Los anticuerpos  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida pueden ser purificados de una muestra, utilizando diversos procedimientos incluyendo, sin limitación, cromatografía de proteínas A/G y cromatografía por afinidad. Se describen ejemplos no limitantes de protocolos específicos para purificar anticuerpos de una muestra 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, *supra*, (2001). Además, ejemplos no limitantes de métodos de purificación de anticuerpos, así como reactivos bien caracterizados, condiciones y protocolos están 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 al alcance de un experto en la materia.

Así, en una realización, una muestra comprende sangre. En el 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 ensayo comprende plasma del 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 líquido linfático. En el aspecto de esta realización, una muestra comprende líquido linfático de ratón, líquido linfático de rata, líquido linfático de cabra, líquido linfático de oveja, líquido linfático de caballo, líquido linfático de burro, líquido linfático de vaca, líquido linfático de primate o líquido linfático humano. En otra realización, una muestra es una muestra de ensayo. 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.

Aspectos de la divulgación actual proporcionan, en parte, comparación de la cantidad de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A detectada en la etapa (d)



con la cantidad de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> de la enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A detectada en la etapa (e). En una realización, la cantidad de producto de escisión de SNAP-25 en la muestra es mayor en comparación con la cantidad de producto de escisión de SNAP-25 en la muestra de control. En un aspecto de esta realización, una mayor cantidad de producto de escisión de SNAP-25 en la muestra en comparación con una muestra de control positivo indica una reducción o falta de inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en el mamífero. En otro aspecto de esta realización, una cantidad equivalente de producto de escisión de SNAP-25 en la muestra en comparación con una muestra de control negativo indica una reducción o falta de inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en el mamífero. En otra realización, la cantidad de producto de escisión de SNAP-25 en la muestra es menor en comparación con la cantidad de producto de escisión de SNAP-25 en la muestra de control. En un aspecto de esta realización, una cantidad equivalente o inferior del producto de escisión de SNAP-25 en la muestra en comparación con una muestra de control positivo indica un aumento o presencia de inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en el mamífero. En otro aspecto de esta realización, una menor cantidad de producto de escisión de SNAP-25 en la muestra en comparación con una muestra de control negativo indica un aumento o presencia de inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en el mamífero.

Se prevé que todas y cada una de las condiciones de ensayo convenientes para detectar la presencia de un anticuerpo neutralizante  $\alpha$ endopeptidasa redirigida en una muestra sean útiles en los métodos desvelados en la presente memoria descriptiva, tales como, por ejemplo, condiciones de ensayo lineales y condiciones de ensayo no lineales. En una realización, las condiciones de ensayo son lineales. En un aspecto de esta realización, la cantidad de ensayo de una endopeptidasa redirigida está en exceso. En otro aspecto de esta realización, la cantidad de ensayo de una endopeptidasa redirigida es limitante de la velocidad. En otro aspecto de esta realización, la cantidad de ensayo de una muestra de ensayo es limitante de la velocidad.

Aspectos de la presente divulgación también pueden ser descritos como sigue:

1. Un método de detección de reorientarse actividad endopeptidasa, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende endopeptidasa redirigida, en el que la célula de una célula establecida es susceptible a la actividad endopeptidasa redirigida de endopeptidasa redirigida; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; c) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad endopeptidasa redirigida.

2. Un método de detección de actividad endopeptidasa redirigida que incluye un método de la invención según lo definido por las reivindicaciones, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar a una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida, en el que las células de una línea celular establecida son susceptibles a la actividad endopeptidasa redirigida por una endopeptidasa redirigida; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; c) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 enlazado a un soporte de fase sólida, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 une un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad endopeptidasa redirigida.

3. Un método de detección de actividad endopeptidasa redirigida, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar a una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida, en el que las células de una línea celular establecida son susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida por endopeptidasa redirigida; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; c) fijar el componente de SNAP-25 a un soporte de fase sólida; d) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; y e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad endopeptidasa redirigida.

4. Un método de detección de actividad endopeptidasa redirigida, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida, en el que las células de una línea celular establecida pueden captar endopeptidasa redirigida; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; c) poner en contacto al componente de SNAP-25

con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad endopeptidasa redirigida.

5. Un método de detección de actividad endopeptidasa redirigida, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida, en el que las células de una línea celular establecida pueden captar endopeptidasa redirigida; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; c) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 enlazado a un soporte de fase sólida, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad endopeptidasa redirigida.

6. Un método de detección de actividad endopeptidasa redirigida, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida, en el que las células de una línea celular establecida pueden captar endopeptidasa redirigida; b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; c) fijar el componente de SNAP-25 en un soporte de fase sólida; d) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; y e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; en el que la detección por el complejo antígeno-anticuerpo es indicativa de actividad endopeptidasa redirigida.

7. Un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una endopeptidasa redirigida a una muestra de ensayo obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de ensayo, en el que las células de una línea celular establecida son susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; d) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de ensayo, comprendiendo la muestra de control negativo una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida; y g) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con respecto a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida.

8. Un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una endopeptidasa redirigida a una muestra de ensayo obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida; b) tratar a una célula de una línea celular establecida con la muestra de ensayo, en el que las células de una línea celular establecida son susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; d) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 enlazado a un soporte de fase sólida, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida y el producto de escisión de SNAP-25; f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de ensayo, comprendiendo la muestra de control negativo una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida; y g) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con respecto a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida.

9. Un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las

etapas de: a) añadir una endopeptidasa redirigida a una muestra de ensayo obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de ensayo, en el que las células de una línea celular establecida son susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; d) fijar el componente de SNAP-25 a un soporte de fase sólida; e) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; f) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; g) repetir las etapas b-f con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de ensayo, comprendiendo la muestra de control negativo endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida; y h) comparar la cantidad de complejos antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f con la cantidad del complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa g, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f en relación con la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en la etapa g es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida.

10. Un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una endopeptidasa redirigida a una muestra de ensayo obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de ensayo, en el que las células de una línea celular establecida pueden captar endopeptidasa redirigida; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; d) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de ensayo, comprendiendo la muestra de control negativo una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida; y g) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con respecto a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida.

11. Un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir endopeptidasa redirigida a una muestra obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida; b) tratar a una célula de una línea celular establecida con la muestra de ensayo, en el que las células de una línea celular establecida pueden captar endopeptidasa redirigida; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; d) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 enlazado a un soporte de fase sólida, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se une un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de ensayo, comprendiendo la muestra de control negativo una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida; y g) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa e con respecto a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida.

12. Un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: a) añadir una endopeptidasa redirigida a una muestra de ensayo obtenida de un mamífero que está siendo ensayado para la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida; b) tratar a una célula de una línea celular establecida con la muestra de ensayo, en el que las células de una línea celular establecida pueden captar endopeptidasa redirigida; c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; d) fijar el componente de SNAP-25 a un soporte de fase sólida; e) poner en contacto al componente de SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; f) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; g) repetir las etapas b-f con una muestra de control

- negativo en lugar de una muestra de ensayo, comprendiendo la muestra de control negativo una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida; y h) comparar la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f con la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa g, en el que la detección de una menor cantidad de complejo antígeno-anticuerpo detectada en la etapa f con respecto a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectada en la etapa g es indicativa de la presencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -endopeptidasa redirigida.
- 5
13. El método de 1-3 y 7-9, en el que la célula es susceptible a actividad endopeptidasa redirigida por aproximadamente 500 nM o menos, por aproximadamente 400 nM o menos, por aproximadamente 300 nM o menos, por aproximadamente 200 nM o menos, por aproximadamente 100 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.
- 10
14. El método de 4-6 y 10-12, en el que la célula puede captar aproximadamente 500 nM o menos, por aproximadamente 400 nM o menos, por aproximadamente 300 nM o menos, por aproximadamente 200 nM o menos, por aproximadamente 100 nM o menos de endopeptidasa redirigida.
- 15
15. El método de 1-6, en el que la muestra comprende aproximadamente 100 ng o menos, aproximadamente 10 ng o menos, aproximadamente 1 ng o menos, 100 fg o inferior, o menos, 10 fg o menos, o 1 fg o menos de una endopeptidasa redirigida.
- 20
16. El método de 1-6, en el que la muestra comprende aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos, o aproximadamente 0,1 nM o menos, de una endopeptidasa redirigida.
- 25
17. El método de 1-12, en el que la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo se detecta mediante un análisis inmunoblot, un análisis de inmunoprecipitación, un ELISA o un ELISA en sándwich
- 30
18. El método de 1-12, en el que el método tiene una relación señal a ruido para la asíntota inferior de como mínimo 3:1, como mínimo 5:1, como mínimo 10:1, como mínimo 20:1, como mínimo 50:1, o como mínimo 100:1.
- 35
19. El método de 1-12, en el que el método tiene una relación señal a ruido para la asíntota superior de como mínimo 10:1, como mínimo 20:1, como mínimo 50:1, como mínimo 100:1, como mínimo 200:1, como mínimo 300:1, como mínimo 400:1, como mínimo 500:1 o como mínimo 600:1.
- 40
20. El método de 1-12, en el que el método puede detectar la actividad  $CE_{50}$  de, por ejemplo, como mínimo 100 ng, como mínimo 50 ng, como mínimo 10 ng, como mínimo 5 ng, como mínimo 100 pg, como mínimo 50 pg, como mínimo 10 pg, como mínimo 5 pg, como mínimo 100 fg, como mínimo 50 fg, como mínimo 10 fg, o como mínimo 5 fg de endopeptidasa redirigida.
- 45
21. El método de 1-12, en el que el método puede detectar la actividad  $CE_{50}$  de, por ejemplo, como mínimo 10 nM, como mínimo 5 nM, como mínimo 100 nM, como mínimo 50 nM, como mínimo 10 nM, como mínimo 5 nM, como mínimo 1 nM, como mínimo 0,5 nM o como mínimo 0,1 nM de endopeptidasa redirigida.
- 50
22. El método de 1-12, en el que el método 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 endopeptidasa redirigida.
- 55
23. El método de 1-12, en el que el método tiene un LOD de, por ejemplo, 100 nM o menos, 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM o menos, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM o menos o 10 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.
- 60
24. El método de 1-12, en el que el método 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 endopeptidasa redirigida.
- 65
25. El método de 1-12, en el que el método tiene un LOQ de, por ejemplo, 100 nM o menos, 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM o menos, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM o menos o 10 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.
26. El método de 1-12, en el que el método puede distinguir una endopeptidasa redirigida totalmente activa de una endopeptidasa redirigida 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 la actividad de la endopeptidasa redirigida totalmente activa A.
27. El método de 1 a 12, que incluyen un método de la invención según lo definido por las reivindicaciones, en el

que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 une un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25.

5 28. El método de 27, en donde el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 tiene una constante de velocidad de asociación para un epítipo que no comprende una glutamina carboxilo terminal del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A del producto de escisión de SNAP-25 de menos de  $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; y en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 tiene una constante de disociación en equilibrio para el epítipo de menos de 0,450 nM.

10 29. El método de 27 que incluye un método de la invención según lo definido por las reivindicaciones, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 aislado tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEQ ID NO: 72, la SEQ ID NO: 74, la SEQ ID NO: 76, la SEQ ID NO: 80 y la SEQ ID NO: 82; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEQ ID NO: 84, la SEQ ID NO: 86, la SEQ ID NO: 88, la SEQ ID NO: 90 y la SEQ ID NO: 92.

15 30. El método de 27, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 aislado como mínimo comprende la V<sub>H</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 93, la V<sub>H</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 94, la V<sub>H</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 95, la V<sub>H</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 118, la V<sub>H</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 119 o la V<sub>H</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 120.

20 32. El método de 27, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 aislado como mínimo comprende la V<sub>H</sub> CDR2 de la SEQ ID NO: 96, la V<sub>H</sub> CDR2 de la SEQ ID NO: 97, la V<sub>H</sub> CDR2 de la SEQ ID NO: 98, la V<sub>H</sub> CDR2 de la SEQ ID NO: 99, la V<sub>H</sub> CDR2 de la SEQ ID NO: 121, la V<sub>H</sub> CDR<sub>2</sub> de la SEQ ID NO: 122, o la V<sub>H</sub> CDR2 de la SEQ ID NO: 123.

25 33. El método de 27, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 aislado como mínimo comprende la V<sub>H</sub> CDR3 de la SEQ ID NO: 100, la V<sub>H</sub> CDR3 de la SEQ ID NO: 101, la V<sub>H</sub> CDR3 de la SEQ ID NO: 102, o la V<sub>H</sub> CDR3 de la SEQ ID NO: 124.

30 34. El método de 27, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 aislado como mínimo comprende la V<sub>L</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 103, la V<sub>L</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 104, la V<sub>L</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 105, la V<sub>L</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 106, la V<sub>L</sub> CDR<sub>1</sub> de la SEQ ID NO: 107, la V<sub>L</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 125, la V<sub>L</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 126, la V<sub>L</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 127, la V<sub>L</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 128, o la V<sub>L</sub> CDR1 de la SEQ ID NO: 129.

35 35. El método de 27, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 aislado como mínimo comprende la V<sub>L</sub> CDR2 de la SEQ ID NO: 108, la V<sub>L</sub> CDR2 de la SEQ ID NO: 109, la V<sub>L</sub> CDR2 de la SEQ ID NO: 110, la V<sub>L</sub> CDR2 de la SEQ ID NO: 111 o la V<sub>L</sub> CDR2 de la SEQ ID NO: 112.

40 36. El método de 27, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 aislado como mínimo comprende la V<sub>L</sub> CDR3 de la SEQ ID NO: 113, la V<sub>L</sub> CDR3 de la SEQ ID NO: 114, la V<sub>L</sub> CDR3 de la SEQ ID NO: 115, la V<sub>L</sub> CDR3 de la SEQ ID NO: 116 o la V<sub>L</sub> CDR3 de la SEQ ID NO: 117.

45 37. El método de 27, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 aislado comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 93, la SEQ ID NO: 121 y la SEQ ID NO: 100; y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 105, la SEQ ID NO: 110 y la SEQ ID NO: 115.

50 38. El método de 27, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 aislado se une selectivamente al epítipo de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 147 o la SEQ ID NO: 148.

55 39. El método de 27, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 aislado se une selectivamente al epítipo de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43 o la SEQ ID NO: 44.

## Ejemplos

### Ejemplo I

#### Cribado de líneas celulares candidatas para la expresión del receptor endógeno de endopeptidasa redirigida

El siguiente ejemplo ilustra cómo identificar las líneas celulares establecidas que poseen la capacidad de captación de endopeptidasa redirigida necesaria para el desarrollo de un ensayo de potencia basado en células

#### 1. Crecimiento del cultivo madre de líneas celulares candidatas.

Para hacer crecer a las líneas celulares, una densidad adecuada de las células de la línea celular que está siendo ensayadas se sembraron en un matraz de cultivo tisular de 162 cm<sup>2</sup> que contenía 30 ml de medio de cultivo adecuado (véase la tabla 1) y se cultivaron en una incubadora a 37°C al 5% o al 10% de dióxido de carbono hasta

que las células alcanzaron la densidad deseada

Tabla 1. Medios utilizados en el cribado de la línea celular.	
Línea celular	Composición de los medios de cultivo del suero
Clones SiMa y SiMa	RPMI 1640, suero fetal bovino al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%, L-glutamina 2 mM
PC12	RPMI 1640, suero fetal bovino termoinactivado al 5%, suero equino al 10%, GlutaMAX™ 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina-estreptomicina al 1%
N18 ND8/34 NG108-15	DMEM al 90%, suero fetal bovino termoinactivado al 10%, glutamina 2 mM, glucosa 2 mM
SK-N-DZ SK-N-F1 SK-N-SH	DMEM al 90%, suero fetal bovino termoinactivado al 10%, glutamina 4 mM, glucosa 4 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 1,5 g/l de NaHCO <sub>3</sub>
BR(2)-C SK-N-BE(2) SH-SY5Y	EMEM (11090 - 081, Gibco), F12 de Ham (11765 - 054, Gibco), suero fetal bovino termoinactivado al 10%, de glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM,
ND3, CD7, ND15	Medio DMEM con glutamina 2 mM (Invitrogen, Cat # 11885), suero fetal bovino al 10% (Invitrogen, Cat #. 16140) y 1 x antibiótico/antimicótico
Neuro-2a	EMEM, suero fetal bovino termoinactivado al 10%, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 1,5 g/l de NaHCO <sub>3</sub> , piruvato de sodio 1 mM

## 2. Cribado de células que expresan receptores diana en la superficie de la célula.

Las líneas celulares se cribaron para la presencia del receptor diana deseado mediante citometría de flujo y/o ensayos de unión a ligando. Aunque los siguientes ejemplos utilizan reactivos para identificar receptores opioideos o similares a opioideos en la membrana plasmática, los enfoques desvelados a continuación pueden utilizarse para identificar el receptor cognado para cualquier endopeptidasa redirigida.

### a. Identificación de líneas celulares mediante citometría de flujo.

Para identificar células que comprenden líneas celulares establecidas que expresan receptores diana para una endopeptidasa redirigida en la superficie celular, se realizó análisis de citometría de flujo. Se cultivaron células para cada línea celular candidata tal como se describe en la sección 1, se trataron con tripsona, se lavaron en tampón de tinción que comprendía 1 x PBS, BSA al 0,5%, y se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en tampón de tinción y se transfirieron aproximadamente 2,0 x 10<sup>6</sup> células a tubos nuevos, dos para cada receptor ensayado. Para cribar en busca de presencia de un receptor opioideo similar a opioideo, aproximadamente 2,0-5,0 µl de α-ORL-1 RA14133 (Neuromics, Edina, MN), anticuerpo policlonal de conejo α-DOR RA10101 (Neuromics, Edina, MN), anticuerpo policlonal de conejo α-KOR RA10103 (Neuromics, Edina, MN) o anticuerpo policlonal de conejo α-MOR RA10104 (Neuromics, Edina, MN), se añadieron a un tubo y la mezcla se incubó a 4°C durante 1 hora. El segundo tubo se incubó a 4°C durante 1 hora sin anticuerpos y sirvió como control negativo. Después de la incubación del anticuerpo, se añadieron 1,0 ml de tampón de tinción a cada tubo y se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 minutos. El precipitado de células se lavó una vez más con 1,0 ml de tampón de tinción. El precipitado de células se resuspendió en 200 µl de tampón de tinción y se añadieron 2,0 µl de anticuerpo de cabra anti-conejo IgG FITC a cada tubo y se incubó a 4°C durante 1 hora en la oscuridad. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, se añadió 1,0 ml de tampón de tinción a cada tubo y se centrifugó a 1200 rpm durante 3 minutos. El precipitado de células se lavó una vez más con 1,0 ml de tampón de tinción y el sedimento se resuspendió en 500 µl de tampón de tinción. La muestra se analizó mediante un citómetro de flujo y los datos se mostraron como una superposición de la tinción de anticuerpo anti-receptor sobre la tinción de IgG FITC de conejo.

Los resultados indican que de las líneas celulares ensayadas, ORL-1 se expresaba en la superficie celular de aproximadamente el 50% de las células que comprendían las líneas celulares establecidas SiMa, SiMa P > 33, clon H10, CD7, y SK-N-DZ; se expresó en la superficie celular de entre aproximadamente el 25% a aproximadamente el 50% de las células que comprendían líneas celulares establecidas SH-SY5Y y ND15; y se expresó en la superficie celular de menos de aproximadamente el 25% de las células que comprendían las líneas celulares establecidas

ND3, ND8, N18 y Neuro-2a (tabla 2). Los resultados también indican que KOR se expresaba en la superficie celular de aproximadamente el 50% de las células que comprendían líneas celulares establecidas SH-SY5Y y CD7; se expresaba en la superficie celular de entre aproximadamente el 25% y aproximadamente el 50% de las células que comprendían líneas celulares establecidas SiMa clon H10, SiMa P > 33, ND15 y Neuro-2a; y se expresaba en la superficie celular de menos de aproximadamente el 25% de las células que comprendían las líneas celulares establecidas ND3, ND8 y N18 (tabla 2). Los resultados también revelaron que MOR se expresaba en la superficie celular de aproximadamente el 50% de las células que comprendían líneas celulares establecidas CD7, ND15 y SiMa P > 33; se expresaba en la superficie celular de entre aproximadamente el 25% y aproximadamente el 50% de las células que comprendían líneas celulares establecidas SH-SY5Y, SiMa clon H10, ND8 y Neuro-2a y se expresaba en la superficie celular de menos de aproximadamente el 25% de las células que comprendían líneas celulares establecidas ND3 y N18 (tabla 2) El anticuerpo policlonal de conejo  $\alpha$ -DOR RA10101 no funcionó correctamente y no se generaron datos utilizables.

*b. Identificación de líneas celulares utilizando unión al ligando.*

Para identificar las células que comprenden líneas celulares establecidas que expresan receptores diana para una endopeptidasa redirigida en la superficie celular, se realizaron análisis de unión al ligando. células de las líneas celulares candidatas a ensayar se sembraron en una placa de 96 pocillos de fondo negro-transparente durante aproximadamente 4 horas para promover la unión para cribar en busca de la presencia de un receptor opioideo o similar a opioideo, el medio fue aspirado de cada pocillo y sustituido por 50  $\mu$ l de solución de ligando que contenía 0 (control sin tratar), 0,001 nM, 0,01 nM, 0,1 nM, o 1 nM de FAM-nociceptina (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA), o 0 (control sin tratar), 0,001 nM, 0,01 nM, 0,1 nM, o 1 nM de FAM-dinorfina (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA). Las células se incubaron con la solución de ligando durante 1 hora en la incubadora a 37°C en de dióxido de carbono al 5%. Las células fueron lavadas para eliminar el ligando un unido lavando las células tres veces con 100  $\mu$ l de 1x PBS. La placa fue escaneada en el dispositivo Typhoon (Ex 488 y Em 520 nm) y a continuación se leyó en el lector de placas M5 (Ex 495 y Em 520 nm) para señales de RFU. Los resultados indican que las células que comprenden las líneas celulares establecidas SiMa clon H10, SH-SY5Y y SK-N-DZ se unieron a nociceptina, mientras que las células que comprenden SiMa clon H10 también se unían a dinorfina (tabla 2)

Receptor diana	Líneas celulares identificadas				
	Citometría de flujo			Unión a Ligando	
	Más del 50% expresión	Del 25% al 50% expresión	Menos del 50% expresión	Nociceptina	Dinorfina A
ORL-1	AGN P33, SiMa, SiMa clon H10, CD7, SK-N-DZ	SH-SY5Y, ND15	ND3, ND8, N18, Neuro-2a	SiMa clon H10, SH-SY5Y, SK - N-DZ	-
DOR	ND	ND	ND	ND	ND
KOR	SH-SY5Y, CD7	SiMa clon H10, AGN P33, ND15, Neuro-2a	ND3, ND8, N18	-	SiMa clon H10
MOR	CD7, ND15, AGN P33	SH-SY5Y, SiMa clon H10, ND8, Neuro-2a	ND3, N18	ND	ND

Utilizando un enfoque similar, líneas celulares que comprenden células que tienen receptores cognados para otras endopeptidasas redirigidas pueden ser identificadas marcando con FAM los dominios diana de estas endopeptidasas y cribando líneas celulares tal como se ha descrito anteriormente.

*3. Cribado de dosis única de líneas celulares candidato utilizando una molécula de endopeptidasa redirigida.*

Para determinar si una línea celular fue capaz de captar la molécula de endopeptidasa redirigida apropiada, una densidad de células adecuada de un cultivo madre de la línea celular que está siendo ensayada se colocó en los pocillos de las placas de cultivo tisular de 24 pocillos que contenían 1 ml de medio de cultivo sérico apropiado (tabla 1). Las células se cultivaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que las células alcanzaron la densidad deseada (aproximadamente de 18 a 24 horas). Para evaluar la captación de una endopeptidasa redirigida a opiodes, el medio de crecimiento fue aspirado de cada pocillo y se reemplazó por 1)

medio de cultivo fresco que no contenía endopeptidasa redirigida a opioides (línea celular no tratada) o 2) medio de cultivo fresco que contenía 30 nM para la endopeptidasa redirigida a nociceptina (Noc/A) o 100 nM para la endopeptidasa redirigida al dinorfina (Dyn/A) (línea celular tratada). Después de una incubación durante una noche, las células se lavaron aspirando el medio de cultivo y aclarando cada pocillo con 200 µl de 1x PBS. Para recoger las células, el 1 x PBS se aspiró, las células se lisaron añadiendo 50 µl de tampón de carga 2 x SDS, el lisado se transfirió a un tubo de ensayo limpio y la muestra se calentó a 95°C durante 5 minutos.

Para detectar la presencia tanto de sustrato de SNAP-25 no escindido como productos de SNAP-25 no escindido, una alícuota de cada muestra recogida se analizó mediante transferencia de Western. En este análisis, una alícuota de 12 µl de la muestra recogida se separó por electroforesis en gel de poliacrilamida MOPS utilizando geles de poli bis- trisacrilamida prefabricados NuPAGE® Novex al 12% (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) en condiciones desnaturizantes, reductoras. Los péptidos separados se transfirieron desde el gel a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) por transferencia de Western utilizando un aparato de transferencia celular electroforética semiseca TRANS - BLOT SD® (Bio - Rad Laboratories, Hercules, CA). Las membranas de PVDF se bloquearon mediante incubación a temperatura ambiente durante 2 horas en una solución que contenga solución salina tamponada con tris (TBS) (ácido 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiolclorhídrico 25 mM (Tris - HCl) (pH 7,4), cloruro de sodio 137 mM, cloruro de potasio 2,7 mM), TWEEN-20® 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)), albúmina de suero bovino al 2% (BSA), leche desnatada en polvo al 5%. Las membranas bloqueadas se incubaron a 4°C durante una noche en TBS, TWEEN - 20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)), BSA al 2% y leche desnatada en polvo al 5% que contiene 1) una dilución 1:5.000 de un anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 como el anticuerpo primario (SMI-81; Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD); o 2) una dilución 1:5.000 del antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 S9684 como el anticuerpo primario (Sigma, St. Louis, MO). Tanto α-SNAP-25 monoclonal de ratón como los anticuerpos policlonales de conejo pueden detectar el sustrato de SNAP-25 no escindido como el producto de escisión de SNAP-25, permitiendo la evaluación de la expresión global de SNAP-25 en cada línea celular y el porcentaje de SNAP-25 escindido después del tratamiento con endopeptidasa redirigida como parámetro para evaluar la cantidad de captación de endopeptidasa redirigida. Las transferencias sondeadas con anticuerpo se lavaron tres veces durante 15 minutos cada vez en TBS, TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Las membranas lavadas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en TBS, TWEEN - 20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)), BSA al 2% y leche desnatada en polvo al 5% que contenía 1) una dilución 1:10.000 de inmunoglobulina G anti-ratón policlonal de cabra, anticuerpo de cadenas pesadas y ligeras (IgG, H + L) conjugado con peroxidasa de rábano (Zymed, South San Francisco, CA) como un anticuerpo secundario; o 2) una dilución 1:10.000 de la inmunoglobulina G policlonal de conejo anti-cabra, anticuerpo de cadenas pesadas y ligeras (IgG, H + L) conjugado con peroxidasa de rábano (Zymed, South San Francisco, CA) como un anticuerpo secundario. Las transferencias sondeadas con anticuerpo secundario se lavaron tres veces durante 15 minutos cada vez en TBS, TWEEN-20® al 0 1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). La detección de señales de los productos marcados de SNAP-25 se visualizó utilizando el sistema de detección por transferencia de Western ECL Plus™ (GE Healthcare Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se formó una imagen de la membrana y el porcentaje de escindidos se cuantificó con un Typhoon 9410 Variable Mode Imager y un software Imager Analysis (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La elección del tamaño del píxel (100 a 200 píxeles) y ajustes del voltaje PMT (350 a 600, normalmente 400) dependían de la transferencia individual.

En base a la detección del producto de escisión de SNAP-25, las siguientes líneas celulares exhibían captación de Noc/A 30 nM, ser 2-C, N18TG2, Neuro-2a, SiMa, SK-N-BE-2-C y SK - N - DZ (tabla 3), mientras que las siguientes líneas celulares exhibían captación de Dyn/A 100 nM, N18TG2, Neuro-2a, PC12 y SiMa. Algunas de estas líneas celulares sensibles se ensayaron con dosis más bajas de compuestos y/o con respuestas a dosis completa.

Línea celular	Descripción	Fuente	Captación de Noc/A 30 nM	Captación de Dyn/A 100 nM
BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2268	Sí	NT
N18TG2	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 103	Sí	Sí
ND3	Neuroblastoma de ratón / neonatal primaria rata híbrido DRG	ECACC 92090901	NDA	NDA
ND7/23	Neuroblastoma de ratón / primario híbrido DRG rata	ECACC 92090903	No	No
ND8	Neuroblastoma de ratón / neonatal primaria rata híbrido DRG	ECACC 92090904	NDA	NDA



ND15	Neuroblastoma de ratón / neonatal primaria rata híbrido DRG	ECACC 92090907	No	No
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-131	Sí	Sí
NG108-15	Híbrido de glioma de rata neuroblastoma ratón	ECACC 88112302	No	NT
PC12	Feocromocitoma de rata	ATCC CRL-1721	NT	Sí
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266	No	NT
SiMa	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 164	Sí	Sí
SK-N-BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2271	Sí	NT
SK-N-DZ	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2149	Sí	NT
SK-N-F1	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2142	No	NT
SK-N-SH	Neuroblastoma humano	ECACC 86012802	No	NT
NT no ensayada. NDA: Ninguna cantidad detectable de SNAP-25 se detectó en esta línea celular.				

Utilizando un enfoque similar, pueden evaluarse líneas celulares que comprenden células que tienen receptores cognados para otras endopeptidasas redirigidas para la captación de endopeptidasa redirigida

## 5 Ejemplo II

### Cribado de la expresión del receptor endógeno de endopeptidasa redirigida en líneas celulares clonales candidatas

#### 1. Cribado de endopeptidasa redirigida de dosis única de células clonales candidatas de una línea celular SiMa parental.

La solicitud de patente correspondiente Zhu Hong y col., *Cell Lines Useful in Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, solicitud de patente de los E.E.U.U. No de serie: 61/160.199 desvela líneas celulares clonales derivadas de una línea celular SiMa parental que fueron útiles en un ensayo de potencia de BoNT/A, tal como se describe en el documento Ester Fernandez-Salas, y col., *Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, solicitud de patente de los E.E.U.U. No de serie: 12/403.531. Para determinar si estas líneas celulares clonales fueron capaces de captar la endopeptidasa redirigida apropiada, cada una se cribó utilizando un ensayo ELISA en sándwich de ECL.

Para preparar un lisado tratado con endopeptidasa redirigida, una densidad adecuada de las células de un cultivo madre de la línea celular que está siendo ensayada se colocó en los pocillos de las placas de 96 pocillos de cultivo tisular que contiene 100  $\mu$ l de un medio de cultivo sérico apropiado (tabla 1) durante una noche. El medio de las células sembradas se aspiró de cada pozo y se sustituyó por medio fresco que contenía 30 nM de una endopeptidasa redirigida Noc/A u 80 nM de una endopeptidasa redirigida Dyn/A. Después de una incubación de 24 horas, las células se lavaron aspirando el medio de cultivo y aclarando cada pocillo con 200  $\mu$ l de 1 x PBS. Para recoger las células, se aspiró 1 x PBS, las células se lisaron mediante la adición de 30  $\mu$ l de tampón de lisis que comprendía Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1% de cada pocillo y la placa se incubó en un agitador que giraba a 500 rpm durante 30 minutos a 4°C. La placa se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C para que sedimenten los restos celulares y el sobrenadante se trasladó a una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpos de captura para efectuar la etapa de detección.

Para preparar una solución de anticuerpo de captura  $\alpha$ -SNAP-25<sub>197</sub>, el anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -SNAP-25<sub>197</sub> contenido en las ascitis de la línea celular de hibridoma 2E2A6 (ejemplo XI) se purificó utilizando un protocolo estándar de purificación de la proteína A.

Para preparar una solución de anticuerpo de detección  $\alpha$ -SNAP-25, se conjugó anticuerpo policlonal de conejo  $\alpha$ -SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) con reactivo de marcado éster de rutenio (II)-tris-bipiridina (4-metilsulfonato) NHS (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) según las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). La reacción de conjugación se realizó añadiendo a 30  $\mu$ l de agua destilada, solución madre de MSD SULFO - TAG™ reconstituido a 200  $\mu$ l de 2 mg/ml de anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 e incubando la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas en la oscuridad. Los anticuerpos marcados se purificaron

5 utilizando un protocolo de columna de centrifugado estándar y la concentración de proteína se determinó mediante un ensayo colorimétrico estándar de la proteína. Se midió la absorbancia del conjugado de anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 /MSD SULFO - TAG <sup>TM</sup> a 455 nm con un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. La solución de anticuerpo de detección se almacenó a 4°C hasta que sea necesario. El almacenamiento a largo plazo de alícuotas no utilizadas era a -20°C.

10 Para preparar un soporte de fase sólida de  $\alpha$ -SNAP-25 que comprende un anticuerpo de captura  $\alpha$ -SNAP-25<sub>197</sub>, se añaden aproximadamente 5  $\mu$ l de la solución de anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25<sub>197</sub> correspondiente (20  $\mu$ g/ml de 1x PBS) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos MSD High Bind y se permite que la solución se seque al aire en una cabina de seguridad biológica durante 2 - 3 horas para evaporar el líquido de la solución. Las placas bloqueadas se sellaron y se almacenaron a 4°C hasta que fueran necesarias.

15 Para detectar la presencia de un producto de SNAP-25 escindido mediante ELISA en sándwich con ECL, los pocillos unidos a anticuerpo de captura se bloquearon a continuación añadiendo 150  $\mu$ l de tampón de bloqueo que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y de suero de cabra al 10% (VWR, West Chester, PA) a temperatura ambiente durante 2 horas. El tampón de bloqueo se aspiró, se añadieron 25  $\mu$ l de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida a cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante una noche. Los pocillos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y aclarando cada pocillo tres veces con 200  $\mu$ l de 1 x PBS, TWEEN-20 <sup>®</sup> al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)) después del lavado, se añadieron 25  $\mu$ l de solución de anticuerpo de detección  $\alpha$ -SNAP-25 al 5  $\mu$ g/ml que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en 1x PBS TWEEN-20 <sup>®</sup> al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)) a cada pocillo, se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación después de la incubación del anticuerpo de detección  $\alpha$ -SNAP-25, los pocillos se lavaron tres veces con 200  $\mu$ L de 1x PBS, TWEEN-20 <sup>®</sup> al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después de lavar, se añadieron 150  $\mu$ l de 1 x tampón de lectura (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y las placas se leyeron utilizando un lector de imágenes SECTOR <sup>TM</sup> Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Los datos sin procesar se recopilaron utilizando el aparato ECL Imager.

25 Los resultados indican que la línea celular parental SiMa, así como la línea celular clonal H10 mostraban una buena captación de la endopeptidasa redirigida Noc/A (tabla 4). Además, estos resultados revelan que muchas líneas celulares exhibieron captación de la endopeptidasa redirigida Dyn/A (tabla 4). Tres líneas celulares clonales (1E11, AF4 y DC4) mostraron buena captación de la endopeptidasa redirigida Dyn/A, once líneas celulares clonales (1E3, 2 D 2, 2D6 3D8, 5C10, 5F3, BB10, BF8, CG8, CG10 y DE7) exhibían captación moderada de endopeptidasa redirigida Dyn/A; y (3B8, 2B9, CE6, YB8, 4C8, 2F5, YF5, DD10, AC9, CD6) mostraban captación mínima de la endopeptidasa redirigida Dyn/A. Algunas de estas líneas celulares candidatas se ensayaron en un ensayo de respuesta a la dosis completa con la correspondiente endopeptidasa redirigida.

ES 2 770 033 T3

Tabla 4. Cribado de Dosis única de líneas celulares candidatas utilizando endopeptidasa redirigida Noc/A y Dyn/A		
Línea celular	Captación de Noc/A 30 nM	Captación de Dyn/A 80 nM
AGN P33	+++	NT
A10	-	NT
D11	-	NT
H1	-	-
H10	+++	-
1D4	NT	-
2E4	NT	-
3D5	NT	-
3G10	NT	-
4D3	NT	-
BB3	NT	-
CC11	NT	-
DF5	NT	-
YB7	NT	-
BE3	NT	-
4B5	NT	-
2B9	NT	+
2F5	NT	+
3B8	NT	+
4C8	NT	+
AC9	NT	+
CD6	NT	+
CE6	NT	+
DD10	NT	+
YB8	NT	+
YF5	NT	+
1E3	NT	++
2D2	NT	++
2D6	NT	++
3D8	NT	++
5C10	NT	++
5F3	NT	++
BF8	NT	++
BB10	NT	++
CG8	NT	++
CG10	NT	++
DE7	NT	++
1E11	NT	+++
AF4	NT	+++
DC4	NT	+++

NT: No probado  
 -: sin captación +: captación mínima; ++: captación moderada, +++: buena captación

2. Cribado de respuesta a dosis completa de líneas celulares candidatas.

5 Las líneas celulares establecidas señaladas anteriormente, se evaluaron posteriormente utilizando una respuesta a la dosis completa de la endopeptidasa redirigida apropiada. Se sembraron células de las diferentes líneas celulares en placas de 96 pocillos y se expusieron a diferentes concentraciones de Noc/A (0,014 nM, 0,4 nM, 1,23 nM, 3,7 nM, 11,1 nM, 33,3 nM y 100 nM) o de Dyn/A (0,017 nM, 0,05 nM, 0,15 nM, 0,45 nM, 1,4 nM, 4,1 nM, 12 nM, 37 nM, 111 nM, 333 nM y 1000 nM) durante 24 horas. El medio que contenía endopeptidasa redirigida se retiró a continuación y se reemplazó por medio completo fresco. Las placas se incubaron 24 horas en CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C para permitir que la escisión de SNAP-25. Las células se lisaron en el tampón de lisis (tabla 5) y las placas se centrifugaron para retirar los restos. Los lisados se utilizaron en un ensayo de transferencia de Western o en un ELISA en sándwich.

15 Para el análisis de transferencia de Western, las muestras fueron analizadas para detectar la presencia tanto del SNAP-25 intacto como del producto de escisión SNAP-25 tal como se describe en el ejemplo I.

20 Para el ELISA en sándwich, placas de ELISA recubiertas con anticuerpo monoclonal 2E2A6 fueron bloqueadas con 150 µl de tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de retirar el tampón de bloqueo, se añadieron 25 µl de lisado celular a cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante 2 horas. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se añadieron 25 µl de anticuerpo de detección pAb anti-SNAP25 marcado con SULFO-TAG NHS-Éster 5 µg/ml en reactivo de bloqueo al 2% en PBS-T a la parte inferior de los pocillos. Las placas se sellaron y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora, seguida de tres lavados con PBS-T. Una vez completados los lavados, se añadieron 150 µl de 1 x tampón de lectura por pocillo y la placa se leyó en el lector de imágenes SI6000 para determinar la sensibilidad de cada una de las líneas celulares ensayadas y el valor de CE<sub>50</sub> se calculó para cada línea celular. Los valores para la endopeptidasa redirigida Noc/A se resumen en la tabla 5. La respuesta a la dosis completa de endopeptidasa redirigida Dyn/A se realizó solamente en PC12 y clon AF4. En ambos casos el ensayo no alcanzó una asíntota superior y un no pudo calcularse un CE<sub>50</sub>. La dosis más baja que produce una señal para el clon AF4 era de 12 nM para ambas líneas celulares.

Tabla 5. Cribado de dosis completa de líneas celulares candidatas utilizando Noc/A y Dyn/A redirigidas				
Línea celular	Descripción	Fuente	Captación CE <sub>50</sub> de Noc/A	Captación CE <sub>50</sub> de Dyn/A
AGN P33	Neuroblastoma humano	-	5-10 nM	NT
BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2268	NT	NT
N18TG2	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 103	NT	NT
N18	Neuroblastoma de ratón	ECACC 88112301	> 100 nM	NT
ND3	Neuroblastoma de ratón / Híbrido DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090901	NDA	NT
CD7/23	Neuroblastoma de ratón / Híbrido DRG de rata primario	ECACC 92090903	> 100 nM	NT
ND8	Neuroblastoma de ratón / Híbrido DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090904	NDA	NT
ND15	Neuroblastoma de ratón / Híbrido DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090907	> 100 nM	NT
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-131	30 nM	NT
NG108-15	Híbrido de glioma de rata neuroblastoma ratón	ECACC 88112302	NT	NT

PC12	Feocromocitoma rata	ATCC CRL-1721	NT	> 1000 nM
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266	NT	NT
SiMa	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 164	30 nM	NT
Clon siMa AF4	Neuroblastoma humano	-	NT	> 300 nM
Clon siMa H1	Neuroblastoma humano	-	> 100 nM	NT
Clon siMa H10	Neuroblastoma humano	-	20 nM	NT
SK-N-SER 2-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2271	NT	NT
SK-N-DZ	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2149	0.5-2 nM	NT
SK-N-F1	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2142	> 100 nM	NT
SK-N-SH	Neuroblastoma humano	ECACC 86012802	> 100 nM	NT
NT no ensayado. NDA: Ninguna cantidad detectable de SNAP-25 se detectó en esta línea celular.				

Utilizando un enfoque similar, pueden cribarse líneas celulares clonales compuestas por células que tienen receptores cognados para otras endopeptidasas redirigidas y evaluarse para captación de endopeptidasa redirigida

### 5 Ejemplo III

#### Evaluación de condiciones de crecimiento en captación de endopeptidasa redirigida en líneas celulares candidatas

10 El ejemplo siguiente ilustra cómo determinar las condiciones de cultivo, crecimiento y diferenciación, para las líneas celulares establecidas que maximizan la captación de endopeptidasa redirigida.

#### *1. Efectos de la diferenciación celular y factores tróficos sobre captación de endopeptidasa redirigida de líneas celulares candidatas.*

15 Para determinar si la diferenciación celular o la presencia de factores tróficos en los medios de cultivo mejoraba la captación de endopeptidasa redirigida, se ensayaron a líneas celulares que exhibían buena captación de Noc/A con diferentes composiciones de medios. Una densidad adecuada de células de un cultivo madre de la línea celular SiMa P > 30 que estaba siendo ensayada se colocó en los pocillos de las placas de cultivo tisular de 96 pocillos que  
 20 contenían 100 µl de un medio libre de suero que contenía RPMI1640, Penicilina-estreptomicina al 1%, L-glutamina 2 mM, suplementado con B27 y N2 o 100 µl de un medio libre de suero que contenía RPMI1640, penicilina-estreptomicina al 1%, L-glutamina 2 mM suplementado con B27, N2 y NGF (Factor de crecimiento nervioso, 100 ng/ml). Estas células se incubaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que las células se

diferenciaban, según la evaluación de los criterios morfológicos estándar y de rutina, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente de 1 a 2 días) como control, una densidad adecuada de las células de un cultivo de la línea celular que está siendo ensayada se colocó en los pocillos de las placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían 100 µl de medio de cultivo adecuado (tabla 1) sin o con NGF (100 ng/ml). Estas células indiferenciadas de control fueron cultivadas en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que las células llegan a la densidad deseada (aproximadamente de 18 a 24 horas). Los medios de ambos y cultivos de control diferenciado e indiferenciado se aspiraron de cada pocillo y se reemplazaron por medios frescos que contenían 0 (muestra no tratada) o diferentes concentraciones de Noc/A (0,14, 0,4, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3 y 100 nM). Después de un tratamiento de 24 horas, las células fueron lavadas y se incubaron durante 24 horas en medio libre de endopeptidasa redirigida con el fin de aumentar la cantidad de SNAP25<sub>197</sub> producido. Las Células producidas se lavaron y recogieron para el ensayo ELISA en sándwich ECL, tal como se describe en el ejemplo II.

También se ensayaron los efectos de factores tróficos en la línea celular SK-N-DZ. Células de SK-N-DZ se sembraron en una placa de 96 pocillos recubierta con poli-D-lisina a 25.000 células por pocillo en ocho diferentes medios SM (tabla 6) durante 72 horas. Las células fueron tratadas en los mismos ocho medios con Noc/A a dosis de 0,03 nM, 3 nM y 30 nM. Después de unas 24 horas de tratamiento, las células fueron lavadas y se incubaron durante 24 horas en medio libre de endopeptidasa redirigida con el fin de aumentar la cantidad de producto de escisión de SNAP-25<sub>197</sub> producido. Las células se lavaron y se recogieron a continuación para el ensayo de la transferencia de Western tal como se describe en el ejemplo I.

La diferencia no tuvo ningún efecto sobre la captación de Noc/A en la línea celular SiMa > P30 aunque parecía mejorar la captación en la línea celular SK-N-DZ. El medio basal tenía un efecto significativo sobre la captación de Noc/A en la línea celular SK-N-DZ con RPMI1640 que comprendía factores tróficos N2 y B27 siendo la mejor combinación. La presencia de NGF en el medio no parece mejorar la captación en las dos líneas celulares ensayadas.

Tabla 6. Efectos de factores tróficos y de diferenciación celular sobre la captación de Noc/A de líneas celulares candidatas.

Indiferenciado	Diferenciado	Captación de CE50 NOC/A	
		AGN P33	SK-N-DZ
DMEM, 10% FBS	-	NT	> 30 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27	-	NT	3 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27, NGF	-	NT	3 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27, RA	-	NT	> 30 nM
RPMI1640, 10% FBS	-	NT	10 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27	-	7,2 nM	1 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27, NGF	-	9,1 nM	1 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27, RA	-	NT	10 nM
-	RPMI1640, N2, B27	10,2 nM	1 nM
-	RPMI1640, N2, B27, NGF	9,8 nM	0,6 nM

NGF: Factor de crecimiento nervioso, RA ácido retinoico  
 NT: no ensayado

Utilizando un enfoque similar, se pueden evaluar las condiciones de crecimiento y diferenciación de líneas celulares clonales que comprenden células que tienen receptores cognados para otras endopeptidasas redirigidas.

Ejemplo IV

Desarrollo de líneas celulares establecidas que expresan receptores exógenos de endopeptidasa redirigida

El ejemplo siguiente ilustra cómo preparar una línea celular establecida que expresa un receptor exógeno para endopeptidasa redirigida.

1. *Transfección del receptor diana en células que comprenden una línea celular candidata.*

La endopeptidasa redirigida Noc/A comprende el dominio de dirección a nociceptina que es el ligando natural del Receptor similar a opioideo 1 (ORL-1). Para obtener un constructo de expresión que comprende un marco de lectura abierto para un ORL-1, el constructo de expresión pReceiver-M02/ORL-1 se obtuvo de GeneCopoeia (GeneCopoeia, Germantown, MD).

Como alternativa, se puede sintetizar una molécula polinucleotídica basada en una secuencia de aminoácidos de ORL - 1 (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 25 o SEQ ID NO 26) empleando los procedimientos estándar (BlueHeron © Biotechnology, Bothell, WA). Oligonucleótidos de 20 a 50 bases de longitud se sintetizan mediante síntesis en fosoramidita estándar. Estos oligonucleótidos se hibridarán en dupletes de cadena doble que se enlazan entre sí para ensamblar la molécula polinucleotídica de longitud completa. Esta molécula polinucleotídica se clonará utilizando métodos de biología molecular estándar en un vector pUCBHB1 en el sitio SmaI para generar pUCBHB1/ORL-1. La molécula polinucleotídica sintetizada es verificada por secuenciación utilizando Big Dye Terminator™ Chemistry 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Si se desea, una molécula polinucleotídica de expresión optimizada basada en una secuencia de aminoácidos de ORL - 1 (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 26) puede ser sintetizada para mejorar la expresión en una cepa de Escherichia coli. La molécula polinucleotídica que codifica ORL - 1 puede modificarse para 1) contener codones sinónimos típicamente presentes en moléculas polinucleotídicas nativas de una cepa de Escherichia coli, 2) contener un contenido de G + C que coincida de la manera más estrecha al contenido de G + C promedio de moléculas polinucleotídicas nativas que se encuentran en una cepa de Escherichia coli, 3) reducir las regiones poliminonucleotídicas dentro de la molécula polinucleotídica; o 4) eliminar sitios regulatorios o estructurales internos encontrados dentro de la molécula polinucleotídica, véase, por ejemplo, Lance E. Steward y col., *Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type A*, publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0057575 (06 de marzo de 2008); y Lance E. Steward y col., *Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type E*, publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0138893 (12 de junio de 2008). Una vez completada la optimización de la secuencia, oligonucleótidos de 20 a 50 bases de longitud se sintetizan mediante síntesis con fosoramidita estándar. Estos oligonucleótidos se hibridación en dupletes de cadena doble que se enlazan entre sí para ensamblar la molécula polinucleotídica de longitud completa. Esta molécula polinucleotídica es clonada utilizando métodos de biología molecular estándar en un vector de pUCBHB1 en el sitio de SmaI para generar pUCBHB1/ORL-1. La molécula polinucleotídica sintetizada es verificada por secuenciación del ADN. Si así se desean, puede realizarse la optimización de la expresión de un organismo diferente, tal como: por ejemplo, una cepa de levadura, una línea celular de insecto o una línea celular de mamífero, véase, por ejemplo, Steward, publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0057575, *supra*, (2008); y Steward, publicación de patente de E.E.U.U. 2008/0138893, *supra*, (2008). Las moléculas polinucleotídicas ejemplares que codifican un ORL - 1 incluyen la SEQ ID NO: 61 y la SEQ ID NO: 62.

Para construir un constructo de expresión que codifica un ORL-1, una construcción pUCBHB1/ORL-1 será digerida con endonucleasas de restricción que 1) escindieron la molécula polinucleotídica que codifica del marco de lectura abierto de ORL-1; y 2) permitieron que esta molécula polinucleotídica se uniera de forma operativa a un vector pcDNA3 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). Este inserto se subclonó mediante un procedimiento de T4 ADN ligasa en un vector pcDNA3 que será digerido con endonucleasas de restricción apropiadas para producir pcDNA3/ORL-1. La mezcla de ligamiento se transformará en células de E. coli BL21(DE3) electrocompetentes (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD) utilizando un método de electroporación y las células se sembrarán en placas de agar de Luria Bertani al 1,5% (pH 7,0) que contenían 50 µg/ml de ampicilina y se sembrarán en una incubadora a 37°C para crecimiento durante una noche. Las bacterias que contienen las construcciones de expresión se identificarán como colonias resistentes a ampicilina. Las construcciones candidato se aislarán utilizando un procedimiento de minipreparación de plásmido por lisis alcalina y serán analizadas mediante mapeo de digestión con endonucleasa de restricción para determinar la presencia y la orientación del inserto. Esta estrategia de clonación produjo un constructo de expresión pcDNA3 que comprende la molécula polinucleotídica que codifica un ORL-1.

La endopeptidasa redirigida Dyn/A comprende el dominio de dirección a dinorfina que es el ligando natural del receptor opioideo κ (KOR). Para obtener un constructo de expresión que comprende un marco de lectura abierto para un ORL-1, el constructo de expresión pReceiver-M02/KOR-1 fue obtenida de GeneCopoeia (GeneCopoeia, Germantown, MD). Como alternativa, pueden sintetizarse construcciones de expresión que codifican KOR y subclonarse utilizando un enfoque similar al descrito para producir el constructo de expresión pcDNA3.1/KOR. Secuencias de aminoácidos de KOR ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 29 y la SEQ ID NO: 30; Moléculas polinucleotídicas ejemplares que codifican un KOR incluyen la SEQ ID NO: 65 y la SEQ ID NO: 66.

Pueden utilizarse estrategias de clonación similares para preparar construcciones de expresión que codifican otros receptores de endopeptidasa redirigida, tales como: por ejemplo, pcDNA3.1/DOR o pcDNA3.1/MOR, pcDNA3.1/receptor de galanina 1, pcDNA3.1/ receptor de galanina 2 o pcDNA3.1/receptor de galanina 3. Las secuencias de aminoácidos de DOR ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28; las secuencias de aminoácidos de MOR ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 31 las secuencias de aminoácidos del receptor de galanina 1 ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 136, la SEQ ID NO: 137 y la SEQ ID NO: 138; las secuencias de aminoácidos del receptor de galanina 2 ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 139; y las secuencias de aminoácidos del receptor de galanina 3 ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 140. moléculas polinucleotídicas ejemplares que

codifican un DOR incluyen la SEQ ID NO: 63 y la SEQ ID NO: 64; moléculas polinucleotídicas ejemplares que codifican un MOR incluyen la SEQ ID NO: 67; moléculas polinucleotídicas ejemplares que codifican un receptor de galanina 1 incluyen la SEQ ID NO: 141, la SEQ ID NO: 142 y la SEQ ID NO: 143; moléculas polinucleotídicas ejemplares que codifican un receptor de galanina 2 incluyen la SEQ ID NO: 144; y moléculas polinucleotídicas ejemplar que codifican un receptor de galanina 3 incluyen la SEQ ID NO: 145.

Para introducir una constructo de expresión que codifica un receptor de endopeptidasa redirigida, líneas celulares fueron transfectadas con una constructo de expresión que codifica un receptor de endopeptidasa redirigida. Para transfectar una línea celular con un receptor opioideo o similar a opioideo, las células de una línea celular candidata fueron sembradas a una densidad de  $1 \times 10^7$  células en un matraz recubierto de T<sub>175</sub> Colágeno IV y se cultivaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que las células llegan a la densidad deseada. Se prepara una solución de transfección de 4,2 ml añadiendo 4 ml de medio de suero reducido OPTI-MEM que contenía 200 µl de LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos a 4 ml de medio de suero reducido OPTI-MEM que contenía 20 µg de un pReceiver-M02/ORL-1 o 20 µg de pReceiver-M02/KOR-1. Esta transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. El medio fue reemplazado por 8 ml de medio fresco libre de suero y libre de antibióticos y la solución de transfección se añadió a las células. A continuación, las células se incubaron en un incubador a 37°C en dióxido de carbono al 5% durante aproximadamente 16-18 horas. El medio de transfección fue reemplazado por medio de cultivo fresco y las células se incubaron una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5%. Después de 24 horas, los medios de cultivo fueron reemplazados por medio de cultivo fresco que contenía el antibiótico G418 a 1 mg/ml en el medio de cultivo (medio de selección) y las células se incubaron durante 7 días. El medio de selección fue cambiado cada semana para un total de 4 semanas (alrededor del 90% células murieron y fueron retiradas durante los cambios semanales del medio).

Las líneas celulares candidatas transfectadas con el receptor ORL-1 incluían las líneas celulares SiMa > P30, ND15, CD7, NG108-T15 y SK-N-DZ. Las líneas celulares candidatas transfectadas con el receptor KOR-1 incluían las líneas celulares SiMa, SiMa > P30, ND15, CD7, NG108-T15 y SK-N-DZ. Las células transfectadas NG108-T15 no sobrevivieron a la selección en G418.

**2. Cribado de dosis única y respuesta a la dosis de líneas celulares transfectadas estables utilizando moléculas de endopeptidasa redirigida.**

Las células de las líneas celulares candidatas transfectadas y seleccionadas en la sección anterior se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina o colágeno IV a  $1 \times 10^5$  células/pocillo en medio RPMI1640 que contenía suplementos N2 y B27 y NGF (50-100 ng/ml) durante  $20 \pm 4$  horas antes del tratamiento con el compuesto. Entonces, las células transfectadas de forma estable con el receptor ORL - 1 fueron tratadas con endopeptidasa redirigida Noc/A a 30 nM en el mismo medio durante  $24 \pm 2$  horas, excepto para la línea celular SK-N-DZ que fue tratada a 10 nM. Las células se lisaron en 120 µl de tampón de lisis y 20 µl del lisado se mezclaron con 2 x tampón SDS para el ensayo de transferencia de Western que se realizó como se ha detallado en el ejemplo I. Todas las líneas celulares mostraban un aumento de la captación del compuesto de Noc/A redirigida cuando se transfectaban con el receptor ORL-1 (Tabla 7).

Línea celular	Descripción	% de SNAP25 escindido a 30 nM	
		No transfectadas	Transfectadas
AGN P33	Neuroblastoma humano	20%	40%
SK-N-DZ	Neuroblastoma humano	25% @ 10 nM	40% @ 10 nM
NDT	Neuroblastoma de ratón e híbrido de células DRG de rata	10%	42%
ND15	Neuroblastoma de ratón e híbrido de células DRG de rata	8%	20%
NG108-T15	Neuroblastoma ratón/híbrido de glioma de rata	Ninguna célula sobrevive	Ninguna célula sobrevive

Las células de las líneas celulares candidato transfectadas y seleccionadas en la sección anterior se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina o colágeno IV a  $1 \times 10^5$  células/pocillo en medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% y suplementos N2 y B27 durante  $20 \pm 4$  horas antes del tratamiento con el compuesto. Las células transfectadas de forma estable con el receptor KOR-1 fueron tratadas con la endopeptidasa redirigida Dyn/A a 100 nM en el mismo medio durante  $24 \pm 2$  horas. Las células se lisaron en 120 µl de tampón de lisis y 20 µl del lisado se mezclaron con 2 x tampón SDS para el ensayo de transferencia de Western que fue realizado tal como se detalla en el ejemplo I. Todas las líneas celulares muestran aumento de la captación del compuesto de Dyn/A



redirigida cuando se transfectaban con el receptor humano KOR-1.

3. *Selección de líneas celulares clonales transfectadas de forma estable que exhiben alta sensibilidad por dilución sucesiva*

5 El ejemplo siguiente muestra cómo identificar las células clonales de una línea celular establecida transfectada de forma estable que son susceptibles a la acción de endopeptidasa redirigida o tienen capacidad de captación de endopeptidasa redirigida.

10 Para la clonación de célula única de las células seleccionadas descrita anteriormente, se empleó el método de clonación de línea celular de dilución limitada. Las células se tripsinizaron, se contaron, se diluyeron para conseguir 0,5-1 células / 100 µl y se sembraron en medio de selección en cinco placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina a 100 µl por pocillo. Las células se incubaron durante más de dos semanas hasta que se formaron colonias en el fondo del pocillo. Las colonias positivas procedentes de células individuales fueron marcadas. Se tomaron fotos de clones derivados de una sola célula con una cámara de microscopio. Las células de pocillos con clones individuales se cultivaron durante una semana adicional y se transfirieron a placas de 24 pocillos aproximadamente 4 semanas después de que empezara la clonación.

20 Para la selección de clones, el parámetro principal utilizado para cribar para clones positivos fue la mayor cantidad de escisión de SNAP-25 obtenida después de tratamiento con Noc/A o Dyn/A medida utilizando el análisis de transferencia de Western con el anticuerpo que reconoce SNAP-25 tanto intacto como escindido. Clones que sobreexpresan ORL-1 fueron ensayados con endopeptidasa redirigida Noc/A 10 nM y 30 nM durante una noche tan pronto como suficientes células estuvieron disponibles (tabla 8). Los clones que sobreexpresan KOR-1 fueron ensayados con endopeptidasa redirigida Dyn /A 100 nM durante una noche (tabla 9). Además, los clones que sobreexpresan KOR-1 fueron ensayados en el ensayo de unión a dinorfina tal como se ha descrito en el ejemplo I.

Tabla 8. Cribado de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con ORL-1 utilizando endopeptidasa redirigida Noc/A

Línea celular	Número de clones	Captación de Noc/A 10 nM	Captación de Noc/A 30 nM	Segundo cribado a 1 nM (% escindido)
AGN P33	1	+	+	28%
AGN P33	2	++	+++	50%
AGN P33	3	-	+	NT
AGN P33	4	ND	ND	NT
AGN P33	5	-	+	31%
AGN P33	6	++	+++	60%
AGN P33	7	+	+	14%
AGN P33	8	+	+	NT
AGN P33	9	+	+	38%
AGN P33	10	+	++	29%
AGN P33	11	+	+	NT
AGN P33	12	+	+	27%
ND7	1 C11	NT	++	NT
ND7	2F3	NT	-	NT
ND7	1D 10	NT	-	NT
ND7	1F9	NT	-	NT
ND7	1 G10	NT	-	NT
ND7	2D 8	NT	-	NT
ND7	2E2	NT	-	NT
ND7	4B7	NT	+++	NT
ND7	3 C11	NT	-	NT

ES 2 770 033 T3

ND7	3C 3	NT	+	NT
ND7	3E8	NT	-	NT
ND7	3E11	NT	-	NT
NDT	2G 3	NT	-	NT
ND7	4 D5	NT	+	NT
ND7	4D 8	NT	+	NT
NDT	4 C8	NT	-	NT
NDT	4C 9	NT	+++	NT
ND7	4E8	NT	+	NT
ND7	2E6	NT	++	NT
ND7	4F4	NT	+++	NT
ND7	5D 6	NT	-	NT
ND7	5 G3	NT	-	NT
ND7	4 D5	NT	++	NT
ND15	1C 10	NT	+	NT
ND15	1F10	NT	++	NT
ND15	2 D8	NT	++	NT
ND15	2E11	NT	-	NT
ND15	2F4	NT	++	NT
ND15	2F10	NT	++	NT
ND15	2F11	NT	-	NT
ND15	3C 4	NT	+	NT
ND15	3 C7	NT	++	NT
ND15	3E8	NT	+++	NT
ND15	4 C8	NT	+	NT
ND15	4 D8	NT	+	NT
SK-N-DZ	#2	-	-	NT
SK-N-DZ	#4	-	-	NT
SK-N-DZ	#5	+++	++	NT
SK-N-DZ	#6	NT	++	NT
SK-N-DZ	#7	+	NT	NT
SK-N-DZ	#8	-	NT	NT
SK-N-DZ	#9	+	NT	NT
SK-N-DZ	#10	-	NT	NT
SK-N-DZ	#11	+	+++	NT
SK-N-DZ	#12	-	NT	NT
SK-N-DZ	#14	++	NT	NT
SK-N-DZ	#16	-	NT	NT
SK-N-DZ	#17	+	+++	NT
SK-N-DZ	#19	+	+++	NT
SK-N-DZ	#20	-	NT	NT

ES 2 770 033 T3

SK-N-DZ	#23	NT	++	NT
SK-N-DZ	#25	-	NT	NT
SK-N-DZ	#26	-	++	NT
SK-N-DZ	#27	+	NT	NT
SK-N-DZ	#28	++	+	NT
SK-N-DZ	#30	++	NT	NT
SK-N-DZ	#31	-	NT	NT
SK-N-DZ	#32	++	++	NT
SK-N-DZ	#33	+	NT	NT
SK-N-DZ	#34	+++	ND	NT
SK-N-DZ	#35	+	++	NT
SK-N-DZ	#36	-	NT	NT
SK-N-DZ	#37	+++	++	NT
SK-N-DZ	#42	-	NT	NT
SK-N-DZ	#43	+	++	NT

ND: No determinado; NT no ensayado.  
 -: ninguna captación, +: captación mínima; ++: captación moderada; +++: buena captación

Tabla 9. Cribado de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con KOR-1 utilizando endopeptidasa redirigida Dyn/A

Línea celular	Número de clones	Captación de Dyn/A 100 nM	Unión a Dyn 100 nM	Seleccionado para futuros ensayos
SiMa	2	-	-	No
SiMa	6	+	+	No
SiMa	8	+	+	No
SiMa	12	+++	++	Sí
SiMa	14	++	++	No
SiMa	20	+	++	No
SiMa	25	++	++	No
AGN P33	1	+++	+	Sí
AGN P33	3	++	+	No
AGN P33	5	++	+	Sí
AGN P33	6	++	+	No
AGN P33	7	+++	+	Sí
AGN P33	8	++	+	Sí
AGN P33	9	+++	+	Sí
AGN P33	10	+++	+	Sí
AGN P33	11	++	+	No
AGN P33	12	+++	+	Sí
AGN P33	14	+	+	No
AGN P33	16	++	+	No
AGN P33	17	+++	+	Sí

ES 2 770 033 T3

AGN P33	21	+	++	No
ND7	A1	+	+	No
ND7	A2	-	-	No
ND7	A3	-	-	No
ND7	A4	-	-	No
ND7	A5	-	-	No
ND7	A6	-	-	No
ND7	A7	-	-	No
ND7	A8	-	-	No
ND7	A9	-	-	No
ND7	A10	-	-	No
ND7	A11	-	-	No
ND7	A12	+++	+++	Sí
ND7	B1	-	-	No
ND7	B2	-	-	No
ND7	B3	-	-	No
ND7	B4	-	-	No
ND7	B5	+	+	Sí
ND7	B6	-	-	No
ND7	B7	-	-	No
ND7	B8	-	-	No
ND7	B9	-	-	No
ND7	B10	-	-	No
ND7	B11	-	-	No
ND7	B12	-	-	No
ND7	C1	-	-	No
ND7	C2	-	-	No
ND7	C3	-	-	No
ND7	C4	-	-	No
ND7	C5	-	-	No
ND7	C6	+	+	No
ND7	C7	-	-	No
ND7	C8	-	-	No
ND7	C9	-	-	No
ND7	C10	-	-	No
ND7	C11	-	-	No
ND7	C12	-	-	No
ND7	D1	-	-	No
ND7	D2	-	-	No

ES 2 770 033 T3

ND7	D3	-	-	No
ND7	D4	-	-	No
ND7	D5	-	-	No
ND7	D6	++	++	Sí
ND7	D7	++	++	Sí
ND7	D8	-	-	No
ND7	D9	-	-	No
ND7	D10	-	-	No
ND7	D11	-	-	No
ND7	D12	-	-	No
ND7	E1	-	-	No
ND7	E2	-	-	No
ND7	E3	-	-	No
ND7	E4	-	-	No
ND7	E5	-	-	No
ND7	E6	-	-	No
ND7	E7	-	-	No
ND7	E8	-	-	No
ND7	E9	-	-	No
ND7	E10	-	-	No
ND7	E11	-	-	No
ND7	E12	++	++	Sí
ND7	F1	-	-	No
ND7	F2	-	-	No
ND7	F3	-	-	No
ND7	F4	-	-	No
ND15	A1	-	-	No
ND15	A2	-	-	No
ND15	A3	+	-	No
ND15	A4	+	-	No
ND15	A5	-	-	No
ND15	A6	++	-	No
ND15	A7	++	-	No
ND15	A8	++	-	No
ND15	A9	+	-	No
ND15	A10	+	-	No
ND15	A11	-	-	No
ND15	A12	-	-	No
ND15	B1	-	-	No

ND15	B2	++	-	No
ND15	B3	-	-	No
ND15	B4	-	-	No
ND15	B5	+++	-	Sí
ND15	B6	+	-	No
ND15	B7	-	-	No
ND15	B8	-	-	No
ND15	B9	-	-	No
ND15	B10	-	-	No
ND15	B11	-	-	No
ND15	B12	-	-	No
ND15	C1	-	-	No
ND15	C2	+++	+	Sí
ND15	C3	-	-	No
ND15	C4	-	-	No
ND15	C5	+	NT	No
ND15	C6	+++	NT	Sí
SK-N-DZ	#11	NT	NT	ND

ND: No determinado; NT no ensayado.  
 -: ninguna captación; +: captación mínima; ++: captación moderada; +++: buena captación

4. Cribado de respuesta a la dosis de líneas celulares clonales transfectadas de forma estable utilizando endopeptidasa redirigida.

5 Líneas celulares clonales transfectadas de forma estable de la sección 3 que muestran una buena captación de la endopeptidasa redirigida Noc/A se ensayaron en experimentos de respuesta a la dosis completa para determinar la sensibilidad y eficacia hacia la endopeptidasa redirigida Noc/A. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas de poli-D-lisina o colágeno IV a  $1 \times 10^5$  células/pocillo en medio RPMI1640 que contenía suplementos N2 y B27, y NGF (50-100 ng/ml) durante  $20 \pm 4$  horas antes del tratamiento con compuesto. Las células de la línea celular parental AGN P33 y las líneas celulares clonales ND7 fueron tratadas con 0,014 nM, 0,4 nM, 1,23 nM, 3,7 nM, 11,1 nM, 33,3 nM y 100 nM de Noc/A en el mismo medio durante 24 horas más 24 horas de incubación en medio libre de endopeptidasa redirigida para permitir la escisión de SNAP-25. Las células de la línea celular AGN P33 parental también se trataron con 0, 0,03 nM, 0,08 nM, 0,24 nM, 0,74 nM, 2,22 nM, 6,67 nM y 20 nM de Noc/A en el mismo medio durante 24 horas más 24 horas de incubación en medio libre de endopeptidasa redirigida para permitir la escisión de SNAP-25. Se retiró el medio y se lavaron las células y se lisaron para el ensayo ELISA en sándwich con ECL tal como se detalla en el Ejemplo II. Los datos de la AGN P33 parental y las líneas celulares clonales transfectadas de manera estable con el receptor ORL - 1 se resumen en la tabla 10. Clones # 2 y # 6 demostraron mayor sensibilidad y eficacia hacia la endopeptidasa redirigida Noc/A que la línea celular parental. Además, el aumento de la sensibilidad de las nuevas líneas celulares clonales permite la utilización de menores concentraciones para la respuesta a la dosis, lo que confirma que las nuevas líneas celulares clonales son más sensibles.

Tabla 10. Tabla resumen de la relación señal a ruido (S/N) y los valores de  $CE_{50}$  de los tres clones más clones sensibles que sobreexpresan ORL-1 en la línea celular de fondo AGN P33.

	Parental	Clon 2	Clon 6	Clon 8
Relación S/N 0,03 nM/BK		41	26	1,8
Relación S/N 20 nM/BK		259	522	33,1

Relación S/N 0,14 nM/BK				
Relación S/N 100 nM/BK				
CE <sub>50</sub> (nM)	6,8± 1,1	0,6± 0,1	0,7±0,07	0,3 ± 0,2

5 Los datos de la ND7 parental y las líneas celulares clonales transfectadas de forma estable con el receptor ORL-1 se resumen en la tabla 11. Todos los clones ensayados demostraron mayor sensibilidad y eficacia hacia la endopeptidasa redirigida Noc/A que la línea celular parental ND7. Los clones 4B7, 1E6 y 11 1 fueron los más sensibles con valores de CE<sub>50</sub> menores de 10 pM.

Tabla 11. Tabla resumen de la relación señal a ruido (S/N) y los valores de CE <sub>50</sub> de los seis clones más sensibles que sobreexpresan ORL-1 en la línea celular de fondo ND7.							
	Parental	1C11	4B7	4 9	5FU	1E6	3E9
Relación S/N 0,14 nM/BK	1.7	9.3	11.1	5.3	3.6	5.8	5.1
Relación S/N 100 nM/BK	53	217	243	126	169	123	121
CE <sub>50</sub> (nM)	> 50	8,6 ± 2	5,7 ± 0,5	33 ± 11	24 ± 5	6,7 ± 1	> 30 nM

10 La tabla 12 resume los resultados obtenidos con la generación y ensayo de líneas celulares clonales que sobreexpresan el receptor ORL-1 en diferentes fondos celulares.

Tabla 12: Resumen de líneas celulares clonales que sobreexpresan el receptor humano ORL-1 ensayadas con Noc/A			
Línea celular de fondo	Especie	Líneas celulares estables ensayadas con dosis completa de Noc/A	CE <sub>50</sub> (nM)
AGN P33	Neuroblastoma humano	Tres	0,6-2,5
ND7	Neuroblastoma de rata y híbrido de DRG	Seis	3,7-8
SK-N-DZ	Neuroblastoma humano	Ninguna (siete clones estables seleccionados para estudios posteriores)	N/A

Ejemplo V

15 Desarrollo de líneas celulares clonales a partir de una línea celular SK-N-DZ Parental.

El ejemplo siguiente ilustra cómo identificar las células clonales de una línea celular establecida parental que son susceptibles a inhibición por endopeptidasa redirigida de exocitosis o tienen capacidad de captación de endopeptidasa redirigida.

20 1. *Aislamiento de líneas celulares clonales.*

25 Durante la caracterización de la línea celular SK-N-DZ, se descubrió que las células que comprenden esta línea celular establecida comprendían como mínimo cinco diferentes fenotipos celulares. Para determinar si alguno de estos tipos celulares fenotípicamente distintos era responsable de la susceptibilidad de esta línea celular a la inhibición de exocitosis por endopeptidasa redirigida, se realizaron dos cribados diferentes de dilución limitada para obtener un aislados de colonias individuales para cada tipo de célula fenotípicamente distinto.

Una adecuada densidad de las células de un cultivo madre de SK-N-DZ fueron cultivadas en DMEM, suero fetal bovino al 10% (termoinactivado), aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, 100

U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, contenida en un matraz recubierto de T175 colágeno IV. Después del segundo pase, las células se trataron con tripsina para producir una suspensión de células y se determinó la concentración celular. Aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  células de esta suspensión celular se transfirieron a un tubo de 50 ml y las células se disociaron en células individuales mediante expulsión vigorosa repetida a través de una aguja de calibre 18,5 utilizando una jeringa de 10 ml. Las células de esta suspensión de células individuales disociadas se diluyeron luego a una concentración de  $0,2 \times 10^6$  células/ml mediante la adición de 15 ml de medio de cultivo fresco y 2,5 µl de esta dilución se añadieron a 50 ml de medio de cultivo fresco para obtener una concentración de 10 células/ml. De esta reserva de dilución final, 100 µl de medio de cultivo se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos recubierta de colágeno IV y las células se cultivaron sin alterar en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% durante cuatro semanas. Cuatro placas de 96 pocillos se prepararon para análisis. Después de cuatro semanas, cada pocillo se examinó al microscopio para identificar colonias individuales en crecimiento, y para cada colonia identificada se añadieron 100 µl de medio de cultivo fresco a cada pocillo y las células se cultivaron inalteradas en una incubador a 37°C en dióxido de carbono al 5% durante dos semanas. Después de dos semanas adicionales de crecimiento, las colonias individuales crecientes se trataron con tripsina y se trasladaron a una nueva placa de 96 pocillos para un crecimiento continuo. Una vez que las colonias crecieron a aproximadamente 1.000 células, en base a la inspección visual, las células se trataron con tripsina y cada suspensión celular se transfirió a un pocillo de una placa de 24 pocillos recubierta con colágeno IV. Las células se cultivan en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% con medio de cultivo fresco que era reemplazado cada 2 - 3 días, si fuera necesario. Las células se cultivaron hasta que el cultivo alcanzaba aproximadamente el 60% de confluencia o superior, momento en el que las células se trataban con tripsina y suspensión celular se transfirió a un matraz de 25 cm<sup>2</sup> recubierto con Colágeno IV, en base a la confluencia de las células en la placa de 24 pocillos. Las células se cultivan en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% con medio de cultivo fresco que era reemplazado cada 2 - 3 días, si era necesario. Una vez que las células en el matraz alcanzaban una confluencia del 70-80%, se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido hasta que las líneas celulares clonales se analizaron para determinar su susceptibilidad a la inhibición de la exocitosis por Noc/A. De los 384 aislados de colonia inicialmente preparados de ambos cribados, se seleccionaron 24 líneas celulares clonales en base a viabilidad y criterios de crecimiento y se expandieron para procedimientos de cribado posteriores. De esas, se identificaron 12 líneas celulares de crecimiento rápido.

## 2. *Cribado primario para la susceptibilidad a la actividad endopeptidasa redirigida de las células de una línea celular clonal utilizando una endopeptidasa redirigida.*

Para determinar si las células de una línea celular clonal eran susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida Noc/A, se realizó un cribado primario utilizando un método basado en inmunología para determinar la actividad endopeptidasa.

Trece clones de SK-N-DZ (#3, #4, #5, #8, #9, #10, #13, #15, #16, #17, #18, #22 y #23) además de las células parentales de SK-N-DZ se sembraron en una placa de 96 pocillos (número de células por pocillo desconocido) en EMEM, FBS al 10%, 1 x B27 y 1 x N2 y se incubaron durante una noche. Las células se trataron con Noc/A 1 nM durante 24 horas. Las células se lisaron con 100 µl de tampón de lisis durante 20 minutos y se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos. Se añadieron cincuenta microlitros de 2 x tampón de muestra SDS a 50 µl de lisado celular y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Diez microlitros de muestra de proteína se cargaron por pista en geles NuPage al 12% y se realizó un ensayo de transferencia de Western tal como se describe en el ejemplo I. La evaluación del SNAP-25 total y el SNAP-25 escindido demostró que los clones #3, #8, #15 y #22 eran como mínimo tan buenos como las células parentales para la absorción de Noc/A. El tratamiento de respuesta a la dosis completa y el análisis con el ensayo ELISA en sándwich con ECL se realizó después de las células se incrementaron a escala.

## 3. *Cribado de respuesta secundario de líneas celulares clonales utilizando una molécula de endopeptidasa redirigida.*

Para determinar si las células de una línea celular clonal eran susceptibles a actividad endopeptidasa redirigida Noc/A, se realizó un cribado secundario utilizando un método basado en inmunología para determinar la actividad endopeptidasa.

Para comparar adicionalmente estas líneas celulares SK-N-DZ clonadas, se llevó a cabo el ensayo ELISA en sándwich ECL. Cinco clones (#3, #9, #15, #16, #22) además de las células parentales SK-N-DZ se sembraron en una placa de 96 pocillos recubierta de Poli-D-lisina por línea celular a 25.000 células por pocillo en RPMI 1640, con FBS al 10%, medios 1 x B27 y N2 x 1 (sin NGF) durante el fin de semana. Las células se trataron con Noc/A a dosis de 0 a 20 nM (0, 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67, 20 nM) durante 24 horas. El SNAP-25<sub>197</sub> escindido se cuantificó en el ensayo ELISA con ECL tal como se ha detallado en el ejemplo I.

La tabla 13 muestra los valores de CE<sup>50</sup> y de señal a ruido para los cinco clones y su línea celular parental. Tres clones llamados #3, #9 y #15 generaban menores valores de CE<sub>50</sub> (< 1 nM) y el clon #16 y #22 generaban valores de CE<sub>50</sub> similares en comparación con la línea celular parental (~ 2 nM). Sin embargo, las señales totales de



SNAP25 escindido eran superiores en los clones #3, #22, y las células parentales. Los clones #9, #16 y #15 tenían señales totales inferiores en comparación con el resto de las líneas celulares

Tabla 13. Tabla resumen de la relación señal a ruido (S/N) y valores de CE<sub>50</sub> de los cinco clones obtenidos de células SK-N-DZ por clonación a dilución limitada.

	Parental	3	9	19	16	22
Relación S/N 0,03 nM/BK	2	3	2	2	2	3
Relación S/N 20 nM/BK	19	27	12	8	14	20
CE <sub>50</sub> (nM)	2,6 ± 1,5	0,8 ± 0,07	0,7 ± 0,04	0,6 ± 0,1	2,2 ± 0,8	1,9 ± 0,6

5 Las condiciones para el tratamiento con Noc/A en clones SK-N-DZ se optimizaron y se ejecutó un ensayo comparando los clones #3, #15 y #22 y la línea celular parental heterogénea SK-N-DZ. La tabla 14 muestra el resultado de la comparación y demostró que la optimización del ensayo ha mejorado enormemente la señal a ruido para el ensayo. Los clones #3 y #22 fueron seleccionados para desarrollo de ensayo adicional, dado que poseen eficacia y sensibilidad excelentes

10 Tabla 14. Tabla resumen de la relación señal a ruido (S/N) y valores de CE<sub>50</sub> de los tres clones obtenidos de células SK - N-DZ utilizando condiciones optimizadas.

	Parental	3	15	22
Relación S/N 0,03 nM/BK	15	8	5	10
Relación S/N 20 nM/BK	107	89	33	60
CE <sub>50</sub> (nM)	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,09

Ejemplo V

Caracterización y comparación de líneas celulares clonales para captación de endopeptidasa redirigida

15 El ejemplo siguiente ilustra cómo caracterizar y comparar las líneas celulares clonales originadas de una línea celular establecida que comprende una población heterogénea o mediante transfección del receptor diana y posterior clonación de la línea celular.

20 Para evaluar la especificidad o selectividad de la captación de endopeptidasa redirigida, se realizaron ensayos de captación no específica utilizando una endopeptidasa redirigida que carecía del dominio de dirección. Para endopeptidasa redirigida a opioides, las células de la línea celular AGN P33, clon #6 (que comprende células transformadas de forma estable una constructo de expresión que codifica un receptor ORL-1) y las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3 y #22 (que comprende las células que expresan el receptor endógeno ORL-1) se sembraron a 25 150.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos recubierta de poli-D-lisina en medio RPMI 1640 libre de suero que contenía suplementos N2 y B27 y NGF (50 ng/ml) y se incubaron durante 20 ± 4 horas a 37°C en una incubadora en CO<sub>2</sub> al 5% antes del tratamiento con el compuesto. Las células se trataron con 8 dosis de Noc/A que van de 0-20 nM o 0-40 nM y/u ocho dosis de hormona LH<sub>N</sub>/A oscilan entre 0 y 400 nM o 0 y 40 nM en el mismo medio durante 22 horas. El medio se retiró y las células se lavaron, se lisaron y se centrifugaron para eliminar los restos en preparación para un ensayo ELISA en sándwich. Una placa de ELISA recubierta con anticuerpo monoclonal 2E2A6 se bloqueó con 150 µl de tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de que el tampón fuera retirado, se añadieron 30 µl de lisado celular a cada pocillo y la placa se incubó a 4°C durante 2 horas. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se añadieron 30 µl de anticuerpos policlonales de detección α-SNAP25 marcados con SULFO-TAG NHS-Éster a 5 µg/ml en reactivo de bloqueo al 2% en PBS-T a la esquina inferior de los pocillos. La placa se selló y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de tres lavados con PBS-T. Después de que los lavados se completaron, se añadieron 150 µl de 1 x tampón de lectura por pocillo y la placa se leyó en el lector SI6000 Image. Los resultados que comparan la captación de Noc/A en relación con el control negativo LH<sub>N</sub>/A se muestran en la tabla 15 y la tabla 16. Estos resultados indican que hubo buena separación entre la captación de Noc/A y LH<sub>N</sub>/A en ambas líneas celulares demostrando captación específica de 35 Noc/A.

40 Tabla 15. Captación inespecífica para SK-N-DZ, clon #3. Resumen de cuatro experimentos independientes

nM	% de captación inespecífica	SEM (error estándar de la media)
0	2	0,5
1	6	0,5
2	8	0,5
5	10	1
15	19	0,9
44	33	1,5
133	65	2,4
400	93	2,3

Tabla 16. Captación inespecífica para células de hORL-1 #6. Resumen de tres experimentos independientes

nM	% de captación inespecífica	SEM (error estándar de la media)
0	1	0,2
1	2	0,2
2	3	0,6
5	3	0,3
15	8	1,3
44	12	1,9
133	22	3,0
400	32	3,0

5 La tabla 17 resumen los resultados de la caracterización y comparación de las tres líneas celulares. Las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3 y #22 poseen una sensibilidad idéntica a la eDRG primaria y una excelente señal a ruido para desarrollar un análisis robusto para endopeptidasa redirigida Noc/A. La línea celular clonal de AGN P33 #6 también es un excelente candidato con baja captación inespecífica y sensibilidad adecuada.

Tabla 17.

Parámetro	SK-N-DZ clon 3	SK-N-DZ clon 22	AGN P33 clon 6	eDRG
Especie de línea celular	Humano clonal	Humano clonal	Humano clonal	primaria de rata
Expresión del receptor celular	ORL1 humano	ORL1 humano	ORL1 humano	ORL1 de rata
	endógeno	endógeno	transfectadas	endógeno
Intervalo dinámico	respuesta a la dosis 0,03 a 20 nM	respuesta a la dosis 0,03 a 20 nM	respuesta a la dosis de 0,04 a 40 nM	respuesta a la dosis de 0,17 a 20 nM
Sensibilidad (CE <sub>50</sub> )	CE <sub>50</sub> = 0,75±0,1 (N = 10)	CE <sub>50</sub> = 0,8 ±0,2 (N = 9)	CE <sub>50</sub> = 2,4 ± 0,2 (N = 21)	CE <sub>50</sub> = 0,8 ± 0,15 (N = 6)
ULOQ	20 nM	20 nM	20 nM	10-20 nM
S/N ULOQ / fondo	98 ± 15 (N = 10)	86 ± 17 (N = 9)	385 ± 32 (N = 19)	-300
S/N LLOQ / fondo	12 ± 2 (N = 11)	10 ± 2 (N = 9)	29 ± 7 (N = 18)	N/A
Especificidad frente a LH <sub>N</sub> /A	≥ 2 log (N = 4)	≥ 2 log (N = 4)	≥ 2 log (N = 3)	N/A

Expresión de SNAP-25	Endógeno	Endógeno	Endógeno	Endógeno
Competencia con var. Nociceptina	Competencia completa (n = 4)	Competencia completa (n = 4)	Competencia parcial (n = 4)	N/A
Inhibición por Ab Antinociceptina	Competencia completa (n = 4)	Competencia completa (n = 4)	Competencia completa (n = 4)	N/A
Inhibición por Ab Anti-868	Competencia parcial (N = 3)	Competencia parcial (N = 3)	Competencia parcial (N = 3)	N/A

Para evaluar la sensibilidad de la captación de endopeptidasa redirigida, se realizaron ensayos de unión de saturación a ligando. La interacción de la mayoría de los ligandos con sus sitios de unión puede caracterizarse en términos de afinidad de unión (directrices de ensayo NIH). En general, alta afinidad de unión implica un mayor tiempo de residencia para el ligando en su sitio de unión del receptor que en el caso de baja afinidad de unión. La constante de disociación se utiliza comúnmente para describir el afinidad entre un ligando (L) (tal como un fármaco) y una proteína (P) es decir, lo firmemente que un ligando se une a una determinada proteína. Un experimento de unión de saturación en equilibrio mide la unión total e inespecífica (NSB) a diferentes concentraciones de radioligando. La constante de disociación en equilibrio o afinidad del radioligando,  $K_d$ , y el número máximo de sitios de unión del receptor,  $B_{max}$ , puede calcularse a partir de la unión específica (total - NSB) mediante el análisis de regresión no lineal. La  $K_d$  para la unión específica puede calcularse utilizando un análisis de regresión no lineal hiperbólico de unión a un sitio (es decir GraphPad Prism) como se muestra en la ecuación de abajo, donde  $B_{max}$  es el número máximo de sitios de unión (pmol/mg, o pmol/células o sitios/células) y  $K_d$  (nM, pM, etc.) es la concentración del radioligando requerida para alcanzar la mitad de la unión máxima:

$$Unido = \frac{B_{max} \times [L]}{[L] + K_d}$$

Para endopeptidasa redirigida a opiodes, las células de la línea celular clonal AGN P33, clon #6 (que comprende células transformadas de forma estable con una constructo de expresión que codifica un receptor ORL-1), la línea celular parental SK-N-DZ y las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3, #15 y #22 (que comprenden las células que expresan el receptor endógeno ORL-1) se sembraron a 200.000 células por pocillo en placa de 48 pocillos recubierta con Poli-D-lisina en medio RPMI 1640 libre de suero que contenía suplementos 1 x N2 y 1 x B27 y se incubaron durante la noche a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%. El medio se retiró y se añadieron células y 150 µl de tampón de unión Tris a los pocillos utilizados para evaluar la unión total y se añadieron 100 µl tampón de unión Tris a los pocillos utilizados para evaluar la unión no específica. Aproximadamente 50 µl de 4 x concentración final de nociceptina fría (2,5 mM a líneas celulares SK-N-DZ y 1 µM a la línea celular clonal AGN P33 #6) se añadieron a los pocillos de unión inespecífica y 50 ml de 4 x concentraciones finales de <sup>3</sup>H-nociceptina (0 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,2 nM, 0,4 nM, 0,8 nM, 1,6 nM, 3,1 nM, 6,3 nM, 12,5 nM, 25 nM y 50 nM a las líneas celulares SK-N-DZ y 0, 0,01 nM, 0,02 nM, 0,039 nM, 0,078 nM, 0,156 nM, 0,313 nM, 0,625 nM, 1,25 nM, 2,5 nM, 5,0 nM y 10 nM a la línea celular clonal de AGN P33 #6) se añadieron a los pocillos de unión total y los pocillos de unión inespecífica a un volumen final de 200 µl. Después de la incubación a 37°C durante 30 minutos, los pocillos se lavaron dos veces en 0,5 ml de tampón de lavado frío. Las células se desnaturalizaron a continuación en 200 µl de NaOH 2 N y se transfirieron a frascos de centelleo de 20 ml que contenían 5 ml de líquido de centelleo. Se utilizaron datos sin procesar para trazar las gráficas de respuesta a la dosis y calcular la  $K_d$  para cada muestra. Los datos sin procesar obtenidos se transfirieron a SigmaPlot v10.0 y se utilizó un ajuste Saturación de un sitio para definir las curvas de respuesta a la dosis en la categoría de ecuación de Unión al ligando. Se regeneraron informes gráficos y contenían los siguientes parámetros:  $R^2$  (coeficiente de correlación),  $B_{max}$  y  $K_d \pm SEM$  (coeficiente  $\pm$  error estándar). Se obtuvieron gráficos de unión total, unión específica y unión inespecífica en el ensayo realizado en células de las líneas celulares clonales SK-N-DZ, #3, #15 y #22, y la línea celular clonal AGN P33 #6. Las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3 y #22 producen una unión dependiente de la concentración y saturable de <sup>3</sup>H-nociceptina. En las mismas condiciones experimentales, la línea celular clonal SK-N-DZ #15 produjo una respuesta dependiente de la dosis de <sup>3</sup>H-nociceptina, pero no se saturaba con la dosis más alta de 50 nM. En comparación con las líneas celulares SK-N-DZ que expresan ORL-1 endógeno, las células de la línea celular clonal AGN P33 #6 tuvieron significativamente mayor afinidad de unión a <sup>3</sup>H-nociceptina (la dosis más alta era de 10 nM frente a 50 nM en SK-N-DZ) con baja unión sin especificidad.

Las curvas de unión de saturación de líneas celulares clonales SK-N-DZ #3, #22, #15 y la línea celular clonal AGN P33 #6 se utilizaron para estimar los valores de  $K_d$  y  $B_{max}$  de tres experimentos de unión independientes por línea celular realizados en tres días diferentes. El orden de rango de estas cuatro líneas celulares es: línea celular clonal AGN P33 #6 ( $K_d = 1,86$  nM y  $B_{max} = 4,6$  fmol/célula) > línea celular clonal SK-N-DZ #3 ( $K_d = 14$  nM y  $B_{max} = 0,6$  fmol/célula)  $\geq$  línea celular clonal SK-N-DZ #22 ( $K_d = 17$  nM y  $B_{max} = 0,6$  fmol/célula) >> línea celular clonal SK-N-

DZ #15 ( $K_d > 50$  nM). Para obtener una respuesta a la dosis saturada para la línea celular clonal de SK-N-DZ #15, es necesario utilizar un mayor intervalo de dosis de 3H-nociceptina. La tabla 16 resume los datos relativos a la caracterización de los sitios de unión a nociceptina de la membrana plasmática específicos en tres líneas celulares clonales SK-N-DZ, #3, #15 y #22 y la línea celular clonal AGN P33 #6. Los datos mostraban lo siguiente 1) un sitio de alta afinidad con muy baja unión inespecífica ( $K_d$  1,8 nM, y  $B_{max}$  2,9 fmol por célula) en la línea celular clonal AGN P33 #6, 2) la unión a nociceptina puede realizarse en las células nativas SK-N-DZ que expresan el receptor endógeno, 3) la línea celular clonal AGN P33 #6 tenía aproximadamente 10 veces mayor afinidad por nociceptina que las líneas celulares SK-N-DZ, 4) como se ve en el ensayo de potencia basado en células, las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3 y #22 ( $K_d$  14-17 nM,  $B_{max}$  0,6 fmol por célula) tenían más sitios receptores por célula que la línea celular clonal SK-N-DZ #15 (no saturable en el mismo intervalo de dosis)

Tabla 18. Resumen de ensayo de unión de saturación a  $^3H$ -nociceptina para cuatro principales líneas celulares (n = 3 experimentos independientes)

Líneas celulares	$K_d$ (nM $\pm$ SD)	$B_{max}$ (fmol/celular)
SK-N-DZ #3	14 $\pm$ 1,6	0,59
SK-N-DZ #15	> 50	ND
SK-N-DZ #22	16,7 $\pm$ 1,1	0,58
Línea celular clonal de AGN P33 #6	1.86 $\pm$ 0,1	2,89

Para evaluar la sensibilidad de captación de endopeptidasa redirigida, la cantidad de receptor de endopeptidasa redirigida expresada a nivel de ARNm se evaluó mediante RT-PCR. La cantidad de receptor expresado en las células es un aspecto importante de la caracterización de la línea celular utilizada para el ensayo y se relaciona con la sensibilidad a endopeptidasas redirigidas. La cantidad de receptor de endopeptidasa redirigida expresado también puede ser una herramienta para la detección de otras posibles líneas celulares y eliminar líneas celulares que no expresan el receptor diana. Un método de medición de la expresión del receptor es cuantificar la cantidad de ARNm del receptor de endopeptidasa redirigida utilizando PCR en tiempo real (RT-PCR).

Para endopeptidasa redirigida a opiodes, se aisló ARN de las células de una línea celular SiMa parental no transfectada, las células de la línea celular clonal de AGN P33 #6, las células de la línea de la célula parental SK-N-DZ y células de las líneas celulares SK-N-DZ #3 y #22 cultivadas en medios libres de suero o en medios con el suero. El ARNm se convirtió en ADNc y el ORL-1 se amplificó y se midió en tiempo real para determinar la cantidad relativa presente en cada línea celular utilizando los siguientes cebadores de oligonucleótidos para ORL-1 5'-CACTCGGCTGGTGCTGGTGG-3' directo (SEQ ID NO: 148) y 5'-AATGGCCACGGCAGTCTCGC-3' inverso (SEQ ID NO: 149). El ADN se cuantifica mediante la utilización de SYBR  $\text{\textcircled{R}}$  verde que es fluorescente en relación con la cantidad de ADN de cadena doble (producto de PCR) presente en la reacción. La representación gráfica de la cantidad de fluorescencia frente al número de ciclos da una curva logística para cada reacción. Cuanto más rápido una reacción alcanza la fase lineal de la curva más ADNc del receptor ORL-1 hay en la reacción. Una reacción de control RT donde no se añade ninguna enzima puede utilizarse para determinar si existe contaminación ya que si no hay ninguna enzima de RT presente en esta reacción, no se producirán ADNc. Un producto de PCR no puede producirse utilizando una plantilla de ARN, así que si aparece una curva de PCR en la reacción -RT, la única posibilidad es contaminación del ADN genómico. En las reacciones -RT, no aparece gráficos de PCR, confirmando que hubo contaminación mínima del ADN genómico. (datos no mostrados). La tabla 18 enumera las líneas celulares con su valor de CT. el CT es el número de ciclos de PCR necesarios para que esa reacción de PCR correspondiente produjera una señal por encima de un umbral establecido. la cantidad de ARNm del receptor ORL -1 en una línea celular puede ser comparada con otra mirando sus valores CT correspondientes. Según los valores de CT, las células de la línea celular clonal AGN P33 #6 tenían también mucho más ARNm de ORL-1 que las células de la línea celular parental SiMa en medios libres de suero (CT promedio 28,6 frente a 3,17) y en medios con suero (CT promedio 26,1 frente a 16,5), También parece que hay una diferencia mínima en el ARNm obtenido de células en el pase 6 frente al pase 16 en la línea celular clonal AGN P33 #6. También, hay diferencias mínimas en los valores de CT y representaciones gráficas la línea celular parental SK-N-DZ frente a la línea celular clonal #3 y #22. Esta conclusión es cierta en las células cultivadas en medios con suero y medios libres de suero y refleja la similitud de estas líneas celulares observadas en el ensayo de potencia basado en células para Noc/A.

Tabla 19. Valores promedio de CT para la expresión de ORL-1 en líneas celulares

Medio	Línea celular	Promedio de CT
Medio libre de suero	SiMa p26 Parental	28,6

	SiMa hORL-1 clon #6 p6	17,3
	SiMa hORL-1 clon #6 p16	17,3
Medio completo	SiMa p26 Parental	26,1
	SiMa hORL-1 clon #6 p6	16,4
	SiMa hORL-1 clon #6 p16	16,6
Medio libre de suero	SK-N-DZ	26,3
	SK-N-DZ clon #3	25,9
	SK-N-DZ clon #22	26,6
Medio completo	SK-N-DZ	26,2
	SK-N-DZ clon #3	25,8
	SK-N-DZ clon #22	26,4

#### Ejemplo VII

Desarrollo de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 que se unen selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo libre en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A

El ejemplo siguiente ilustra cómo preparar anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

#### 1. *Generación de anticuerpos monoclonales $\alpha$ -SNAP-25.*

Para desarrollar anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, el péptido de 13 residuos CDSNKTRIDEANQ<sub>COOH</sub> (SEQ ID NO: 38) fue diseñado como un antígeno del producto de escisión de SNAP-25. Este péptido comprende una región enlazadora flexible y un residuo de cisteína N-terminal para conjugación a KLH y los aminoácidos 186-197 del SNAP-25 humano (SEQ ID NO: 5) con una glutamina C-terminal carboxilada (SEQ ID NO: 38). La generación de anticuerpos monoclonales para secuencias peptídicas únicas, bien seleccionadas proporciona control sobre la especificidad del epítipo, permitiendo la identificación de una determinada subpoblación de proteína entre una reserva de isoformas estrechamente relacionados. Búsquedas con Blast revelaron que este péptido tiene elevada homología solamente con SNAP-25 y casi ninguna posible reactividad cruzada con otras proteínas en las células neuronales. La secuencia fue analizada también cuidadosamente utilizando algoritmos informáticos para determinar el índice de hidropatía, la probabilidad de superficie de la proteína, las regiones de flexibilidad y estructura secundaria favorable, seguido por la orientación correcta y presentación de la secuencia del péptido elegido. El péptido fue sintetizado y conjugado a hemocianina de lapa californiana (KLH) para aumentar la inmunogenia. Seis ratones Balb/c fueron inmunizados con este péptido, y después de tres inmunizaciones en ocho semanas, a los ratones se les extrajo sangre para ensayos. Se permitió que la sangre se coagule incubando a 4°C durante 60 minutos. La sangre coagulada se centrifugó a 10.000 x g a 4°C durante 10 minutos para que sedimentaran los restos celulares. La muestra de suero resultante se dispensó en alícuotas de 50 ml y se almacenó a -20°C hasta que fue necesaria.

Una estrategia similar basada en otros antígenos de SNAP-25 desvelados en la presente memoria descriptiva se utiliza para desarrollar anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Por ejemplo, el antígeno de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 45 puede conjugarse con KLH en vez del antígeno de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 38. Como otro ejemplo, los aminoácidos 186-197 SNAP-25 humano del antígeno de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 38 puede reemplazarse por la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43 o la SEQ ID NO: 44.

## 2. Cribado para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales $\alpha$ -SNAP-25.

Para determinar la presencia de un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, se realizaron un ELISA comparativo y ensayo de escisión basado en células utilizando el suero extraído del ratón. Para ELISA comparativo, se construyeron dos proteínas de fusión: BirA-HisTag @-SNAP-25<sub>134-197</sub> de la SEQ ID NO: 48 y BirA-HisTag@-SNAP-25<sub>134-206</sub> de la SEQ ID NO: 49. BirA-HisTag @-SNAP-25<sub>134-197</sub> comprendía un péptido natural-biotinilado de 16 aminoácidos BirA de la SEQ ID NO: 50 enlazado en el extremo amino a un péptido de SNAP-25 compuesto por los aminoácidos 134 - 197 de la SEQ ID NO: 5. BirA-HisTag @-SNAP-25<sub>134-206</sub> comprendía un péptido natural-biotinilado de 16 aminoácidos BirA de la SEQ ID NO: 50 enlazado en el extremo amino a un péptido de SNAP-25 compuesto por los aminoácidos 134 - 206 de la SEQ ID NO: 5. Estos dos sustratos se suspendieron en 1 x PBS a una concentración de 10  $\mu$ g/ml de BirA-HisTag @-SNAP-25<sub>134-197</sub> y BirA-HisTag @-SNAP-25<sub>134-206</sub>. BirA-HisTag @-SNAP-25<sub>134-197</sub> y BirA-HisTag @-SNAP-25<sub>134-206</sub> se recubrieron sobre placas separadas añadiendo aproximadamente 100  $\mu$ l de la solución de sustrato apropiada e incubando las placas a temperatura ambiente durante una hora. Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante una hora en BSA al 0,5% en 1 x TBS que contenía una dilución de 1:10 a 1:100 de un suero que contiene anticuerpo derivado de uno de los seis ratones inmunizados (ratón 1, ratón 2, ratón 3, ratón 4, ratón 5 y ratón 6). Las placas sondeadas con anticuerpo primario se lavaron cuatro veces durante 5 minutos cada vez en 200  $\mu$ l de TBS, TWEEN-20 @ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante 1 hora en 1 x TBS que contenía una dilución 1:10.000 de anticuerpo IgG de ratón policlonal de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) como un anticuerpo secundario. Las placas sondeadas con anticuerpo secundario se lavaron cuatro veces en 200  $\mu$ l de TBS, TWEEN - 20 @ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). La detección cromógena de los productos de SNAP-25 marcados se visualizó por detección cromógena utilizando el kit de sustrato TMB ImmunoPure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). El desarrollo de un color amarillo en las placas recubiertas con BirA-HisTag @-SNAP-25<sub>134-197</sub>, pero no en las placas recubiertas con BirA-HisTag @-SNAP-25<sub>134-206</sub>, indicó que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 reconocía preferentemente el producto de escisión de SNAP-25<sub>197</sub>. El resultado indica que de los seis ratones utilizados para la inmunización, tres ratones (ratón 2, ratón de 3 y ratón 4) tienen títulos más altos y más especificidad hacia un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

Estos resultados fueron confirmados mediante un ensayo de actividad de cadena ligera ELISA. Se prepararon placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina unidas a reactivo (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) mediante la adición de aproximadamente 100  $\mu$ l de la siguiente solución de sustrato: las filas A - C se recubrieron con 100  $\mu$ l de BirA-HisTag @-SNAP-25<sub>134-197</sub> a doce concentraciones diferentes; las filas D - H se recubrieron con 100  $\mu$ l de BirA-HisTag @-SNAP-25<sub>134-206</sub> a 10  $\mu$ g/ml. Las placas se lavaron aspirando la solución de sustrato y aclarando cada pocillo tres veces con 200  $\mu$ l de TBS, TWEEN-20 @ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Las diluciones de BoNT/A se redujeron previamente a 37°C durante 20 minutos en BoNT/A. Tampón de incubación (HEPES 50 mM, pH 7,4, suero fetal bovino al 1%, ZnCl<sub>2</sub> 10  $\mu$ M, ditiotriol 10 mM) y 100 ml de la BoNT/A reducida previamente se añadieron a las placas recubiertas de sustrato y se incubaron a 37°C durante 90 minutos. Las placas tratadas con BoNT/A se lavaron aspirando el tampón de incubación BoNT/A y aclarando cada placa tres veces con 200  $\mu$ l de TBS, TWEEN-20 @ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante una hora en BSA al 0,5% en 1 x TBS que contenía una dilución 1:10 a 1:100 del suero que contenía anticuerpo que está siendo ensayado. Las placas sondeadas con anticuerpo primario se lavaron cuatro veces durante 5 minutos cada vez en 200  $\mu$ l de TBS, TWEEN-20 @ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante 1 hora en 1 x TBS que contenía una dilución 1:10.000 de anticuerpo policlonal IgG de cabra anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) como un anticuerpo secundario. Las placas sondeadas con anticuerpo secundario se lavaron cuatro veces en 200  $\mu$ l de TBS, TWEEN - 20 @ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). La detección cromógena de los productos etiquetados de SNAP-25 se visualizó mediante detección cromógena utilizando el kit de sustrato TMB ImmunoPure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). El desarrollo de un color amarillo, que correlaciona con la presencia del producto de escisión de SNAP-25<sub>197</sub> se detectó en las muestras tratadas con BoNT/A, pero no en los controles no tratados, utilizando suero que contiene anticuerpos derivado de los seis ratones inmunizados (ratón 1, ratón 2, ratón 3, ratón 4, ratón 5 y ratón 6). Por lo tanto, el análisis comparativo de ELISA indicó que de los ratones utilizados para la inmunización, tres ratones (ratón 2, ratón de 3 y ratón 4) tenían títulos más altos y más especificidad hacia un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

Para ensayo de escisión basado en células, una adecuada densidad de células PC12 se sembraron en placas de cultivo tisular de 60 mm<sup>2</sup> que contenían 3 ml de un medio de suero adecuado (tabla 1). Las células se cultivaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que las células alcanzaron la densidad adecuada. Se preparó una solución de transfección de 500  $\mu$ l añadiendo 250  $\mu$ l de medio de suero reducido OPTI-MEM que contenía 15  $\mu$ l de LipofectAmine 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos a 250  $\mu$ l medio de suero reducido OPTI-MEM que contenía 10  $\mu$ g de un constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (SEQ ID NO: 51). La constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC comprende de un vector de expresión pQBI-25 (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA) cuyos elementos promotores están enlazados

funcionalmente a un polinucleótido que codifica la cadena ligera de GFP-BoNT/A de la SEQ ID NO: 52. Esta mezcla de transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. El medio fue reemplazado por medio sin suplemento fresco y los 500 µl de solución de transfección se añadieron a las células. A continuación, las células se incubaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% durante aproximadamente de 6 a 18 horas. Las células se lavaron y se recogieron tal como se describe en el ejemplo II. Para detectar la presencia del producto escindido SNAP-25<sub>197</sub>, una alícuota de cada muestra cosechada se analizó mediante transferencia de Western, tal como se describe en el ejemplo II, excepto que el anticuerpo primario utilizado fue una dilución 1:1.000 de suero que contiene anticuerpos y el anticuerpo secundario utilizado era un 1:20.000 de αIgG de ratón con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Una sola banda correspondiente a al producto de escisión de SNAP-25<sub>197</sub> fue detectada en las muestras tratadas con BoNT/A, pero no en los controles no tratados, utilizando suero que contiene anticuerpos derivados de tres ratones (ratón 2, ratón 3 y ratón 4). Por lo tanto, el ensayo de escisión basado en células indicó que de los ratones utilizados para la inmunización, tres ratones (ratón 2, ratón 3 y ratón 4) tenían títulos más altos y más especificidad hacia un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

### 3. Producción de hibridomas.

Para hacer que los hibridomas produzcan anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, el bazo del ratón 2 se recogió tres días después de una inmunización de refuerzo final y las células esplénicas se fusionaron con células de mieloma P3 - X 63 Ag8.653 utilizando protocolos de hibridoma estándar. Estas células se sembraron en cinco placas de 96 pocillos y se seleccionaron híbridos utilizando medio HAT. En un plazo de 8 a 14 días después de la fusión, el primer cribado de los aproximadamente 480 clones parentales se llevó a cabo mediante ELISA comparativo con los péptidos BirA-HisTag @-SNAP-25<sub>134-197</sub> y BirA-HisTag @-SNAP-25<sub>134-206</sub> recubriendo a dos placas diferentes. El ELISA comparativo proporciona un método rápido de cribado para identificar hibridomas que producen anticuerpos específicos para el SNAP-25<sub>197</sub> escindido. Los 18 mejores clones se sometieron a cribado adicional utilizando el ensayo de escisión basado en células descrito anteriormente e inmunotinción de células transfectadas LC/A. (Tabla 20).

Clon	ELISA comparativa				Ensayo basado en células	
	DO SNAP-25 <sub>197</sub>	DO SNAP-25 <sub>206</sub>	Relación <sub>197/206</sub>	Relación <sub>206/197</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>
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 acondicionados producidos por estos clones comprendían anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 con una especificidad de unión preferencial que tenía una relación<sup>197/206</sup> de como mínimo 4:1 para el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup> en relación con el sustrato no escindido SNAP-25<sup>206</sup> sustrato y detecta el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup> utilizando el ensayo de escisión basado en células y la inmunotinción de células PC12 transfectadas con GFP-LC/A. Los clones similares 2C9, 2F11, 3G2, 4D1 y 4G6 se clonaron adicionalmente mediante dilución limitante porque los medios acondicionados producidos por estos clones comprendían anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 con una especificidad de unión preferencial que tenía una relación<sup>206/197</sup> de como mínimo 1,5:1 para el sustrato no escindido SNAP-25<sup>206</sup> en relación con el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup> y detecta el sustrato no escindido SNAP-25<sup>206</sup> utilizando el ensayo de escisión basado en células. Estos clones derivados de una única célula se cribaron nuevamente utilizando ELISA comparativa, escisión basada en células e inmunotinción para confirmar su afinidad y especificidad, y los anticuerpos se isotiparon empleando los procedimientos estándar. Se produjeron ascitis a partir de 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 más.

#### 4. Evaluación de especificidad de unión de anticuerpos monoclonales $\alpha$ -SNAP-25.

Para evaluar la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, ascitis de los clones 1D3B8, 1G10A12, 2C9B10, 2E2A6, 2F11B6, 3C1A5 y 3C3E2 se utilizaron para detectar el producto de escisión de SNAP-25 utilizando el ensayo de actividad de la célula, inmunocitoquímica e inmunoprecipitación.

Para el ensayo de actividad basado en células, la especificidad de unión se determinó mediante el análisis de la capacidad de ascitis que contenía anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 para detectar el sustrato no escindido SNAP-25<sup>206</sup> sustrato y el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup> mediante análisis de transferencia de Western. Una adecuada densidad de células PC12 se sembraron en placas de cultivo tisular de 60 mm<sup>2</sup> que contenían 3 ml de medio de suero apropiado, se cultivaron en una incubador a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que se alcanzó una densidad celular apropiada y se transfectaron con una solución de transfección que carecía de la constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células no transfectadas) o una solución de transfección que contenía la constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células transfectadas) tal como se describió anteriormente. Las células se lavaron y se recogieron tal como se ha descrito en el ejemplo I. Para detectar la presencia de tanto el sustrato no escindido SNAP-25<sup>206</sup> como del producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup>, una alícuota de cada muestra recogida se analizó mediante transferencia de Western tal como se describe en el ejemplo I, salvo que el anticuerpo primario utilizado era una dilución 1:100 de la ascitis que contenía el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 y el anticuerpo secundario utilizado fue una 1:20.000 de IgG  $\alpha$ -ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Además, se analizaron tres anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 de ratón disponibles en el mercado. SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que el fabricante indica que detecta tanto el sustrato no escindido SNAP-25<sup>206</sup> como el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup>, se utilizó en una dilución 15.000 según las recomendaciones del fabricante. MC-6050 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que el fabricante indica que detecta tanto el sustrato no escindido SNAP-25<sup>206</sup> como el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup>, se utiliza en una dilución 1:100 según las recomendaciones del fabricante. MC - 6053 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 que el fabricante indica que detecta sólo el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup>, se utiliza en una dilución 1:100 según las recomendaciones del fabricante.

La tabla 21 indica las ascitis que contiene anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 que detectaba solamente el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup>. El ensayo de escisión basado en células indicaba que las ascitis producidas a partir de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 sintetizan un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 que tiene especificidad de unión alta para el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup> lo que permite el reconocimiento selectivo de este producto de escisión en relación con el sustrato no escindido SNAP-25<sup>206</sup>. El anticuerpo comercial SMI-81 detectaba el sustrato no escindido SNAP-25<sup>206</sup>, pero sólo reconocía pobremente el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup> (tabla 21). Sorprendentemente, el anticuerpo comercial MC-6050 detectaba sólo el sustrato no escindido SNAP-25<sup>206</sup> y no conseguía reconocer el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup> (tabla 21). Aún más sorprendente, el anticuerpo comercial MC-6050 detectaba sólo el sustrato no escindido SNAP-25<sup>206</sup> y no conseguía reconocer el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup>, a pesar de que el fabricante anuncia que este anticuerpo detecta selectivamente el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup> (tabla 21). Por lo tanto, este análisis indica que aunque 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 exhiben adecuada selectividad para el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup>, 1G10A12 y 2F11B6 no lo hacen. Además, los anticuerpos comerciales SMI-81, MC-6050 y MC-6053 son todos inadecuados para los métodos basados en inmunología desvelados en la presente solicitud porque no todos lograron detectar con selectividad el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup>.

Para el análisis inmunocitoquímico, la especificidad de unión se determinó mediante el análisis de la capacidad de ascitis que contiene anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 para detectar el sustrato no escindido SNAP-25<sup>206</sup> sustrato y el producto de escisión de SNAP-25<sup>197</sup> mediante inmunotinción. Véase por ejemplo, Ester Fernandez - Salas y col.,



*Plasma Membrane Localization Signals in the Light Chain of Botulinum Neurotoxin*, Proc. Natl. Acad. y col., Estados Unidos (9) 101: 3208-3213 (2004). Una adecuada densidad de células PC12 se sembraron, cultivaron y transfectoron con una solución de transfección que carecía de la constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células no transfectadas) o una solución de transfección que contenía la constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células transfectadas) tal como se describió anteriormente. Las células se lavaron en 1 x PBS y se fijaron en 5 ml de PAF a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células fijadas se lavaron en solución salina tamponada con fosfato, se incubaron en 5 ml de Triton® X - 100 al 0,5% (polietilenglicol octilfenol éter) en 1 x PBS, se lavaron en 1 x PBS y se permeabilizaron en 5 ml de metanol a -20°C durante 6 minutos. Las células permeabilizadas se bloquearon en 5 ml de glicina 100 mM a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavaron en 1 x PBS y se bloquearon en 5 ml de BSA al 0,5% en 1x PBS a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células bloqueadas se lavaron en 1 x PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas en BSA al 0,5% en 1 x PBS con una dilución 1:10 de una ascitis de una línea celular de hibridoma clonal ensayada. Las células sondeadas con anticuerpo primario se lavaron tres veces durante 5 minutos cada vez en 1 x PBS. Las células lavadas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en 1 x PBS con una dilución 1:200 de inmunoglobulina G anti-ratón de policlonal, anticuerpo de cadenas pesadas y ligeras (IgG, H + L) conjugado a ALEXA® FLUOR 568 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) como un anticuerpo secundario. Las células sondeadas con anticuerpo secundario se lavaron tres veces durante 5 minutos cada vez en 1 x PBS. Las células lavadas se prepararon para el examen microscópico mediante montaje en medio de montaje VECTASHIELD® (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se taparon con un cubreobjetos. Se obtuvieron imágenes de detección de señal con un microscopio confocal Leica utilizando la configuración adecuada del láser. La tabla 21 indica que la ascitis que contenía anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 detecta específicamente el producto de escisión de SNAP-25<sub>197</sub>. El análisis inmunocitoquímico indicaba que las ascitis producidas a partir de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 sintetizan un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 que tiene especificidad de unión alta para el producto de escisión de SNAP-25<sub>197</sub> que permite el reconocimiento preferencial de este producto de escisión en relación con el sustrato no escindido SNAP-25<sub>206</sub>.

Para el análisis de la inmunoprecipitación, la especificidad de unión se determinó mediante el análisis de la capacidad de la proteína A (columnas HiTrap™ Protein A HP, GE Healthcare, Amersham, Piscataway, NJ), anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 purificadas para precipitar el sustrato no escindido SNAP-25<sub>206</sub> sustrato y el producto de escisión SNAP-25<sub>197</sub>. Véase por ejemplo, Capítulo 8 de Storing and Purifying Antibodies, págs. 309 - 311, Harlow & Lane, *supra*, 1998a. Una adecuada densidad de células PC12 se sembraron, cultivaron y transfectoron con una solución de transfección que contenía una constructo de expresión pQBI-25/GFP (células de control; SEQ ID NO: 53) o una solución de transfección que contenía la constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células experimentales) tal como se describió anteriormente. La construcción de la expresión pQBI-25/GFP comprende un vector de expresión cuyos elementos promotores funcionalmente están enlazados a un polinucleótido que codifica GFP de la SEQ ID NO: 54. Después de una incubación durante una noche, las células se lavaron aspirando el medio de cultivo y aclarando cada pocillo con 200  $\mu$ l de 1 x PBS. Para cosechar las células, el PBS se aspiró, las células se lisaron mediante la adición de un tampón de lisis e inmunoprecipitación que comprende HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM EGDT 1 nM, glicerol al 10%, Triton® X - 100 al 1% (polietilenglicol octilfenol éter) y 1 x cóctel inhibidor de proteasa COMPLETE™ (Roche Applied Biosciences, Indianápolis, IN) e incubando a 4°C durante una hora. Las células sometidas a lisis se centrifugaron a 3.000 x g a 4°C durante 10 minutos para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se diluyó a una concentración de proteína de aproximadamente 1 mg/ml. Aproximadamente 5  $\mu$ g de anticuerpo monoclonal purificado se añadieron a 0,5 ml del sobrenadante diluido y se incubaron a 4°C durante dos horas. Después de la incubación del anticuerpo primario, aproximadamente 50  $\mu$ l de Proteína G inmovilizada (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) se añadieron al sobrenadante diluido y se incubaron a 4°C durante una hora. El sobrenadante incubado se lavó tres veces durante 30 minutos cada vez añadiendo 0,5 ml de tampón de lisis e inmunoprecipitación, centrifugando a 300 x g a 4°C durante un minuto para que sedimente la proteína G inmovilizada y decantar el sobrenadante. Después del lavado, el sedimento se resuspendió en 30  $\mu$ l de 1 x Tampón de carga SDS y la muestra se calentó a 95°C durante 5 minutos. Para detectar la presencia tanto del sustrato no escindido SNAP-25<sub>206</sub> como del producto de escisión SNAP-25<sub>197</sub>, una alícuota de cada muestra recogida se analizó mediante transferencia de Western tal como se ha descrito en el ejemplo I, excepto que el anticuerpo primario utilizado fue una dilución 1:1.000 del suero de anticuerpo policlonal  $\alpha$ -SNAP-25 (véase el ejemplo V) y el anticuerpo secundario utilizado fue una 1:20.000 de  $\alpha$ -IgG de conejo con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). La tabla 21 indica las ascitis que contienen  $\alpha$ -SNAP-25 que específicamente arrastraron hacia abajo al producto de escisión de SNAP-25<sub>197</sub> mediante análisis de la inmunoprecipitación. El análisis de la inmunoprecipitación indicaba que las ascitis producidas a partir de los clones 2E2A6 y 3C1A5 sintetizan un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 que tiene especificidad de unión alta para el producto de escisión de SNAP-25<sub>197</sub> que permite el reconocimiento preferencial de este producto de escisión en relación con el sustrato no escindido SNAP-25<sub>206</sub>.

Tabla 21. Análisis de ascitis clonales que contienen anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25

Clon	Ensayo basado en células	Inmunocitoquímica	Inmunoprecipitación
------	--------------------------	-------------------	---------------------

	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>
1D3B8	++	-	++	-	No ensayado	No ensayado
1G10A12	++	++	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
2C9B10	++	-	++	-	No ensayado	No ensayado
2E2A6	++	-	++	-	++	-
2F11B6	+	+	+	+	No ensayado	No ensayado
3C1A5	++	-	++	-	++	-
3C3E2	+	-	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
MC-6050	-	+	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
MC-6053	-	+	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
SMI-81	-/+	++	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado

5. Evaluación de la afinidad de unión de los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25.

5 Para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 que muestra especificidad de unión alta para cualquiera del producto de escisión de SNAP-25<sub>197</sub> o el sustrato no escindido SNAP-25<sub>206</sub>, se realizaron ensayos de afinidad de unión en un instrumento BIAcore 3000 utilizando chips sensores de carboximetil dextrano (CM5) (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Las series se llevaron a cabo a 25°C con tampón HBS-EP compuesto por HEPES 10 mM (pH 7,4), cloruro de sodio 15 mM, EDTA 3 mM, surfactante P20 al 0,005% (v/v) con un caudal de 10  $\mu$ l/min. los péptidos de SNAP-25 que comprendía los aminoácidos 134 - 197 de la SEQ ID NO: 5 (SNAP-25<sub>134-197</sub>) o los aminoácidos 134 - 206 de la SEQ ID NO: 5 (SNAP-25<sub>134-206</sub>) se unieron covalentemente a la superficie de los chips sensores de CM5 utilizando acoplamiento de amina estándar. En resumen, los chips de CM5 se activaron por una inyección de 7 minutos de una mezcla de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida 0,2 M y N-hidroxisuccinimida 0,05 M; los péptidos de SNAP-25 se inyectaron a continuación en acetato de sodio 10 mM (pH 4,0) durante 20 minutos a un caudal de 10  $\mu$ l/min; y ésteres de succinimida sin reaccionar se bloquearon mediante una inyección 7 minutos de clorhidrato de etanolamina 1 M, pH 8,5. La cantidad inmovilizada de SNAP-25<sub>134-197</sub> o SNAP-25<sub>134-206</sub> en el chip se reflejaba en un aumento de 100 - 150 en unidades de respuesta (aproximadamente 0,10 - 0,15 ng/mm<sup>2</sup>). Muestras de anticuerpo que comprendían ascitis o anticuerpos monoclonales purificados producidos a partir de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2, así como, anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 disponibles en el mercado se hicieron pasar sobre la superficie de los chips CM5 permitiendo un tiempo de asociación de 10 minutos y un tiempo de disociación de 20 minutos. Las superficies se regeneraron entre las series en mediante 1 inyección de un minuto de glicina-HCl 10 mM (pH 2,5) con un caudal de 15  $\mu$ l/min. Las curvas de Sensorgram se ajustaron a un modelo de unión cinética de 1: 1 con el software BIAevaluation 3.0.

25 Los resultados indican que tanto 2E2A6 como 3C1A5 eran altamente específicos para el producto de escisión de SNAP-25<sub>197</sub> respecto al sustrato no escindido SNAP-25 (tabla 22). En comparación con las afinidades de unión de MC-6050 y MC-6053, 1D3B6 tenía una constante de disociación en equilibrio aproximadamente 10 veces mayor para el producto de escisión de SNAP-25 en relación con estos anticuerpos comerciales (tabla 22). Curiosamente, 2E2A6 tenía solamente una constante de disociación en equilibrio ligeramente menor para el producto de escisión de SNAP-25 en relación con estos anticuerpos comerciales (0,405 nM frente a 0,497 y 0,508)(tabla 22). Ninguno de estos anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 comerciales reconoció selectivamente el producto de escisión de SNAP-25 escote (tabla 20), una constante de disociación en equilibrio inferior a 0,5 nM parece, en parte, fundamental para lograr dicha selectividad. Asimismo, en comparación con las afinidades de unión de MC-6050 y MC-6053, 2E2A6 tenía una aproximadamente como mínimo una vez más lenta constante de velocidad de disociación/disociación ( $6,74 \times 10^{-5}$  frente a  $8,82 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  y  $1,18 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) (tabla 22). Esto sugiere además que una constante de velocidad de disociación/disociación inferior a  $8,82 \times 10^{-4}$  parece, en parte, fundamental para lograr la unión selectiva para el producto de escisión de SNAP-25. Este resultado es consistente con 1 D3B8, que tenía una constante de velocidad de disociación/disociación de  $5,78 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  (tabla 22).

Parámetro SPR	1D3B8		2E2A6	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>a</sup>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>b</sup>
Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,06 x 10 <sup>6</sup>	-	1,70 x 10 <sup>6</sup> (1,66 x 10 <sup>5</sup> )	-

KD (s <sup>-1</sup> )	5,78 x 10 <sup>-5</sup>	-	1.53 x 10 <sup>-4</sup> (6,74 x 10 <sup>-5</sup> )	- (-)
KD (nM)	0,050	-	0,090 (0,405)	- (-)
Parámetro SPR	3C1A5		2C9B10	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>c</sup>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>d</sup>
Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,17 105	-	1,15 x 10 <sup>4</sup>	-
KD (s <sup>-1</sup> )	2,88 x 10 <sup>-4</sup>	-	3,11 x 10 <sup>-4</sup>	-
KD (nM)	1,33	-	27.1	-
Parámetro SPR	MC-6050		MC-6053	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>
Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,78 X 10 <sup>6</sup>	3,06 X 10 <sup>2</sup>	2.32 X 10 <sup>6</sup>	1,06 X 10 <sup>2</sup>
KD (s <sup>-1</sup> )	8,82 X 10 <sup>-4</sup>	6,07 X 10 <sup>-3</sup>	1.18 X 10 <sup>-3</sup>	2.56 X 10 <sup>-5</sup>
KD (nM)	0,497	19.800	0508	240
<p><sup>a</sup> No se observó ninguna unión enlace cuando hasta 125 nM de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 1D3B8 se hicieron pasar sobre la superficie del chip sensor CM5 después de un tiempo de asociación de 10 minutos.</p> <p><sup>b</sup> No se observó ninguna unión cuando hasta 10 μM de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 2E2A6 se hicieron pasar sobre la superficie del chip sensor CM5 después de un tiempo de asociación de 10 minutos.</p> <p><sup>c</sup> No se observó ninguna unión cuando hasta 100 nM de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 3C1A5 se hicieron pasar sobre la superficie del chip sensor CM5 después de un tiempo de asociación de 10 minutos.</p> <p><sup>d</sup> No se observó ninguna unión cuando hasta 100 nM de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 2C9B10 se hicieron pasar sobre la superficie del chip sensor CM5 después de un tiempo de asociación de 10 minutos.</p>				

Para comparar los seis diferentes anticuerpos, la velocidad de asociación (ka) y velocidad de disociación (kd) para cada uno se normalizaron utilizando un programa del software de evaluación 4.1 BIA. Para la comparación de las velocidades de asociación, los datos se recortaron en primer lugar individualmente mediante la eliminación de la parte regeneración y los picos de inyección y a continuación se normalizaron a una escala de 0 a 100. Para la comparación de la velocidad de disociación, los datos se normalizaron hasta el punto de parada/máximo de la inyección. Este análisis mostró que 2C9B10 tenía una velocidad de asociación mucho más lenta que los otros anticuerpos (figura 7A), y que MC-6053 tiene una velocidad de disociación mucho más rápida (disociación) que los otros anticuerpos (figura 7B). La rápida velocidad de disociación de MC-6053 indica que este anticuerpo no funcionará bien en los métodos desvelados en la presente memoria descriptiva porque este anticuerpo tendrá dificultades para mantenerse unido al antígeno del sustrato durante las etapas de lavado.

#### 6. Secuenciación del epítipo de los 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 en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, la molécula polinucleotídica que codifica las cadenas pesada variable (V<sub>H</sub>) y ligera variable (V<sub>L</sub>) del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producido por los hibridomas 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 se secuenciaron. El ARNm se extrajo y se purificó a partir de cada hibridoma mediante protocolos estándar y se transcribió a la inversa a ADNc utilizando un cebador oligo dT anti-sentido o un cebador anti-sentido específico de genes (IgG 1 CH murina y kappa CL). Cebadores de dominio constante humanos y murinos específicos se utilizaron para amplificar el ADNc mediante PCR después de la producción de ADNc para determinar el isotipo del anticuerpo. Se utilizaron cebadores V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> degenerados para amplificar los dominios variables de ADNc. Para la 5'RACE, una cola de dCTP homopolimérica se añadió en el extremo 3' del ADNc. Las cadenas pesadas y ligeras se amplificaron a continuación con un cebador sentido oligo dG y un cebador antisentido (CH/KC) específico de genes. Los productos de PCR incluyen la secuencia del péptido señal, dominios variables y dominios constantes hasta el cebador anti-sentido. Los productos de PCR se purificaron en gel para eliminar pequeños fragmentos y se clonaron en un vector romo o TA para secuenciación. Cinco clones independientes para cada cadena se secuenciaron y se determinaron alineamientos de las cadenas V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> y secuencias de consenso. Los métodos utilizados para determinar las secuencias de aminoácidos de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se describen por ejemplo en, Roger A. Sabbadini, y col., *Novel Bioactive lipid Derivatives and Methods of Making and Using Same*, Publicación de patente de E.E.U.U. 2007/0281320; y Peter Amersdorfer, y col., *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. Además, están disponibles servicios comerciales para secuenciar las cadenas variable pesada (V<sub>H</sub>) y

variable ligera ( $V_L$ ) de un anticuerpo e identificar las regiones CDR, véase, por ejemplo Fusion Antibodies Ltd., Irlanda del norte. En un caso, para la región 3C1A5  $V_L$  también se determinó la secuencia de aminoácidos separando los anticuerpos purificados por afinidad mediante electroforesis de alta resolución 2DE y a continuación sometiendo a la proteína a análisis de huella de fragmentación de péptidos utilizando nanoLC-MSMS de alta resolución después de la digestión proteolítica.

La secuencia del polinucleótido que comprende las cadenas  $V_H$  y  $V_L$  del anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25, incluyendo un anticuerpo según la invención según lo definido por las reivindicaciones, producido por los hibridomas desvelados en la presente memoria descriptiva es la siguiente: 1D3B8  $V_H$  (SEQ ID NO: 71), 2C9B10  $V_H$  (SEQ ID NO: 73), 2E2A6  $V_H$  (SEQ ID NO: 75), 3C1A5  $V_H$  (SEQ ID NO: 77), 3C3E2  $V_H$  variante 1 (SEQ ID NO: 79), 3C3E2  $V_H$  variante 2 (SEQ ID NO: 81), 3C3E2  $V_H$  variante 3 (SEQ ID NO: 132), 1 D3B8  $V_L$  (SEQ ID NO: 83), 2C9B10  $V_L$  (SEQ ID NO: 85), 2E2A6  $V_L$  (SEQ ID NO: 87), 3C1A5  $V_L$  (SEQ ID NO: 89) y V 3C3E2 $L$  (SEQ ID NO: 91). La secuencia de aminoácidos que comprende las cadenas  $V_H$  y  $V_L$  del anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 producida por los hibridomas desvelados en la presente memoria descriptiva es la siguiente: 1D3B8  $V_H$  (SEQ ID NO: 72), 2C9B10  $V_H$  (SEQ ID NO: 74), 2E2A6  $V_H$  (SEQ ID NO: 76), 3C1A5  $V_H$  (SEQ ID NO: 78), 3C3E2  $V_H$  variante 1 (SEQ ID NO: 80), 3C3E2  $V_H$  variante 2 (SEQ ID NO: 82); 3C3E2  $V_H$  variante 2 (SEQ ID NO: 133), 1 D3B8  $V_L$  (SEQ ID NO: 84), 2C9B10  $V_L$  (SEQ ID NO: 86), 2E2A6  $V_L$  (SEQ ID NO: 88), 3C1A5  $V_L$  (SEQ ID NO: 90) y 3C3E2  $V_L$  (SEQ ID NO: 92). Las secuencias de aminoácidos que comprenden los dominios CDR  $V_H$  y  $V_L$  del anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 producidas por los hibridomas 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 se dan en la tabla 23.

Tabla 23. Secuencias de CDR de los dominios $V_H$ y $V_L$ de los anticuerpos monoclonales $\alpha$ -SNAP-25			
CDR	Secuencia	Identificado en	SEQ ID NO:
$V_H$ CDR 1	TFTDHSIH	2E2A6 2C9B10 3C1A5	93
$V_H$ CDR 1	TFTNYVIH	3C3E2	94
$V_H$ CDR 1	IFTDHALH	1D3B8	95
$V_H$ CDR 2	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
$V_H$ CDR 2	YLFPGNGNFEYNEKFKG	2C9B10 3C1A5	97
$V_H$ CDR 2	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C3E2	98
$V_H$ CDR 2	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
$V_H$ CDR 3	KRMGY	2E2A6 3C1A5	100
$V_H$ CDR 3	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101
$V_H$ CDR 3	ARMDY	3C3E2var1	102
$V_H$ CDR 3	ARMGY	3C3E2var2	134
$V_H$ CDR 3	ARHLANTYYYFDY	3C3E2var3	135
$V_L$ CDR 1	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
$V_L$ CDR 1	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
$V_L$ CDR 1	KSSQSLLYTNGKTYLT	2E2A6	105
$V_L$ CDR 1	KSSQSLLNTNGKTYLT	3C1A5	106
$V_L$ CDR 1	RASQNIGNYLH	3C3E2	107
$V_L$ CDR 2	KVSNRFS	1D3B8	108
$V_L$ CDR 2	NAKSLAE	2C9B10	109
$V_L$ CDR 2	LVSELDS	2E2A6	110
$V_L$ CDR 2	LVSKLDS	3C1A5	111

V <sub>L</sub> CDR 2	YASQSIG	3C3E2	112
V <sub>L</sub> CDR 3	FQGSHVPPT	1D3B8	113
V <sub>L</sub> CDR 3	QHHYGTPYT	2C9B10	114
V <sub>L</sub> CDR 3	LQSAHFPFT	2E2A6	115
V <sub>L</sub> CDR 3	LQSSHFPFT	3C1A5	116
V <sub>L</sub> CDR 3	QQSDTWPLT	3C3E2	117

Los ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos que comprenden variantes del dominio V<sub>H</sub> CDR del anticuerpo monoclonal  $\alpha$ SNAP-25 producidas por los hibridomas desvelados en la presente memoria descriptiva incluyen V<sub>H</sub> CDR1 variante SEQ ID NO: 118 para 1D3B8; V<sub>H</sub> CDR1 variante SEQ ID NO: 119 para 2C9B10, 2E2A6 y 3C1A5 V<sub>H</sub>; V<sub>H</sub> CDR1 variante SEQ ID NO: 120 para 3C1A5 V<sub>H</sub> y 3C3E2 variante 3; V<sub>H</sub> CDR2 variante SEQ ID NO: 121 para 1D3B8 y 2E2A6; V<sub>H</sub> CDR2 variante SEQ ID NO: 122 para 2C9B10 y 3C1A5 V<sub>H</sub>; V<sub>H</sub> CDR2 variante SEQ ID NO: 123 para 3C1A5 V<sub>H</sub> y 3C3E2 variante 3; V<sub>H</sub> CDR3 variante MDY para 1 D3B8 y 2C9B10; V<sub>H</sub> CDR3 variante MGY para 2E2A6 y 3C1A5 V<sub>H</sub>; y V<sub>H</sub> CDR3 variante SEQ ID NO: 124 para 3C1A5 V<sub>H</sub> y 3C3E2 variante 3. Los ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos que comprenden variantes del dominio V<sub>L</sub> CDR del anticuerpo monoclonal  $\alpha$ SNAP-25 producidas por los hibridomas desvelados en la presente memoria descriptiva incluyen V<sub>L</sub> CDR1 variante SEQ ID NO: 125 para 1 D3B8; V<sub>L</sub> CDR1 variante SEQ ID NO: 126 para 2C9B10; V<sub>L</sub> CDR1 variante SEQ ID NO: 127 para 2E2A6; V<sub>L</sub> CDR1 variante SEQ ID NO: 128 para 3C1A5; V<sub>L</sub> CDR1 variante SEQ ID NO: 129 para 3C3E2; V<sub>L</sub> CDR2 variante KVS para 1D3B8; V<sub>L</sub> CDR2 variante NAK para 2C9B10; V<sub>L</sub> CDR2 variante LVS para 2E2A6; V<sub>L</sub> CDR2 variante YAT para 3C1A5; y V<sub>L</sub> CDR2 variante YAS para 3C3E2.

#### Ejemplo comparativo VIII

#### Desarrollo de anticuerpos policlonales $\alpha$ -SNAP-25 que se unen selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo libre en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A

El ejemplo siguiente ilustra cómo preparar anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un epítipo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

Para desarrollar los anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> de la enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, el péptido de 10 residuos CGGGRIDEANQ (SEQ ID NO: 46) se diseñó como un antígeno del producto de escisión de SNAP-25. Este péptido que comprendía un residuo de cisteína N-terminal para conjugación a KLH, un espaciador flexible G-espaciador (GGG) enlazado a los aminoácidos 191-197 de SNAP-25 humano (SEQ ID NO: 5) y tiene una glutamina C-terminal carboxilada. Las búsquedas mediante Blast revelaron que este péptido tiene elevada homología solamente con SNAP-25 y casi ninguna posible reactividad cruzada con otras proteínas en las células neuronales. La secuencia se analizó también cuidadosamente utilizando algoritmos informáticos para determinar el índice de hidropatía, la probabilidad de superficie de la proteína, las regiones de flexibilidad y estructura secundaria favorable, seguido por la orientación correcta y presentación de la secuencia del péptido elegido. El péptido se sintetizó y se conjugó con Hemocianina de lapa californiana (KLH) para aumentar la inmunogenia. Antes de que los animales fueran vacunados, conejos sin exposición previa se cribaron primero contra lisados celulares de líneas celulares candidatas en una transferencia de Western con el fin de identificar a los animales que no tenían inmunorreactividad a las proteínas presentes en los lisados celulares. Dos conejos preseleccionados se inmunizaron con este péptido, y después de tres inmunizaciones en aproximadamente ocho semanas, se tomaron muestras de sangre de los conejos para ensayos. Se permitió a la sangre coagular incubando a 4°C durante 60 minutos. La sangre coagulada se centrifugó a 10.000 x g a 4°C durante 10 minutos para que sedimenten los restos celulares. La muestra de suero resultante se dispensó en alícuotas de 50  $\mu$ l y se almacenó a -20°C hasta que fuera necesaria.

Una estrategia similar basada en otros antígenos de SNAP-25 desvelados en la presente memoria descriptiva se utiliza para desarrollar anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Por ejemplo, el antígeno de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 47 puede conjugarse con KLH en lugar del antígeno de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 46. Como otro ejemplo, los aminoácidos 191-197 SNAP-25 humano del antígeno de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 38 pueden reemplazarse por la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43 o la SEQ ID NO: 44.

#### 2. *Detección de la presencia de anticuerpos policlonales $\alpha$ -SNAP-25.*

Para determinar la presencia de anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un

antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, se realizaron ensayos de ELISA comparativa y de escisión basados en células utilizando el suero de conejo extraído tal como se ha descrito en el ejemplo III. El suero de los conejos contenía anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A. Los anticuerpos policlonales de conejo  $\alpha$ -SNAP-25 se designaron con NTP 22 y de NTP 23.

### 3. Purificación de anticuerpos policlonales $\alpha$ -SNAP-25.

Para purificar los anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 que pueden unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, anticuerpos NTP 22 y NTP 23 de suero de conejo se purificaron utilizando columnas de afinidad que contenían el antígeno de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 46.

### 4. Evaluación de especificidad de unión de los anticuerpos policlonales $\alpha$ -SNAP-25.

Para evaluar la especificidad de unión de un anticuerpo policlonal  $\alpha$ -SNAP-25 que puede unirse selectivamente a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A, anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 NTP 22 y NTP 23 purificados se utilizaron para detectar el producto de escisión utilizando el análisis de actividad basado en células, inmunocitoquímica en inmunoprecipitación tal como se describe en el ejemplo III. El ensayo de escisión basado en células, el análisis de inmunocitoquímica y el análisis de inmunoprecipitación todos indicaban que los anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 NTP 22 y NTP 23 no reaccionan de forma cruzada con SNAP-25 no escindido. Por lo tanto ambos NTP 22 y NTP 23 tienen especificidad de unión alta para el producto de escisión de SNAP-25<sub>197</sub> lo que permite el reconocimiento preferencial de este producto de escisión en relación con el sustrato no escindido SNAP-25<sub>206</sub>. Los afinidad por los antígenos puede determinarse utilizando SPR en BiAcCore tal como se describe en el ejemplo III.

## Ejemplo IX

### Preparación de componentes y condiciones ELISA en sándwich

El ejemplo siguiente ilustra cómo identificar y preparar los componentes y las condiciones necesarias para llevar a cabo un ELISA el sándwich útil para la realización de los métodos basados en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida mediante la detección de un producto de escisión de SNAP-25 utilizando un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 específico para un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A.

#### 1. Preparación de lisados celulares de las células tratadas con endopeptidasa redirigida.

Para obtener un lisado celular tratado con endopeptidasa redirigida para su análisis, una densidad adecuada de las células de un cultivo madre de Neuro-2a fue sembrada 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, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM. Estas células se incubaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que las células se diferenciaron, según lo determinado mediante criterios morfológicos estándar y de rutina, tales como detención del crecimiento y extensión de neurita (aproximadamente de 2 a 3 días). Como un control, una densidad adecuada de las células de un cultivo madre de Neuro-2a se sembró en un matraz T175 que contenía 50 ml de medio de cultivo adecuado (tabla 1). Estas células indiferenciadas de control se cultivaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% hasta que se alcanzó un 50% de confluencia (aproximadamente 18 horas). El medio de ambos cultivos diferenciado y de control indiferenciado se aspiró de cada pocillo y se sustituyó por medio fresco que contenía 0 (muestra no tratada) o 10 nM de endopeptidasa redirigida. Después de una incubación durante una noche, las células se lavaron y las células se recogieron mediante lisis en tampón de lisis recién prepararon Triton X-100 (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1%) a 4°C durante 30 minutos con agitación constante. Las células lisadas se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C para eliminar los restos utilizando una centrifuga de sobremesa. Se midieron las concentraciones de proteína de lisados celulares mediante análisis de Bradford.

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

Para identificar un par apropiado de anticuerpo de captura- anticuerpo de detección se realizó un análisis ELISA en sándwich con ECL en 26 diferentes combinaciones de pares de anticuerpos de captura y de detección, que comprendían once diferentes anticuerpos de captura  $\alpha$ -SNAP-25 y siete diferentes anticuerpos de detección  $\alpha$ -SNAP-25 (tabla 12). Los anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 utilizados fueron los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 de ratón 2E2A6 y 3C1A5 desvelados en la presente memoria descriptiva, los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 de ratón SMI-81, MC-6050 y MC-6053 desvelados en la presente memoria descriptiva, el anticuerpo policlonal de conejo  $\alpha$ -SNAP-25 NTP 23 desvelado en la presente memoria descriptiva, el anticuerpo policlonal de conejo  $\alpha$ -

SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO), anticuerpos policlonales de conejo  $\alpha$ -SNAP-25 H-50 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa CruzCA), anticuerpos policlonales de cabra  $\alpha$ -SNAP-25 C-18 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), anticuerpos policlonales de cabra  $\alpha$ -SNAP-25 N-19 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) y anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 de ratón SP12 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

5 Para preparar la solución de anticuerpo de captura, los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 contenidos en las ascitis de líneas celulares de hibridoma 2E2A6 y 3C1A5, así como los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -SNAP-25 MC-6050 y MC-6053 se purificaron utilizando un protocolo estándar de purificación de proteína A. Todos los demás anticuerpos  $\alpha$ -SNAP-25 se adquirieron como anticuerpos purificados.

10 Para preparar la solución de detección de anticuerpos, el anticuerpo apropiado  $\alpha$ -SNAP-25 se conjugó a reactivo de marcado rutenio (II)-tris-bipiridin-(4-metilsulfonato) NHS éster (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) según las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). La reacción de conjugación se realizó añadiendo 30  $\mu$ l de solución madre MSD SULFO - TAG™ reconstituida en agua destilada a 200  $\mu$ l de 2 mg/ml de anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 e incubando la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas en la oscuridad. Los anticuerpos marcados se purificaron utilizando un protocolo de columna centrífuga estándar y la concentración de proteína se determinó utilizando un análisis de la proteína colorimétrico estándar. Se midió la absorbancia del conjugado de anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 /MSD SULFO - TAG™ a 455 nm con un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. La solución de detección de anticuerpos se almacenó a 4°C hasta que fuera necesaria.

25 Para preparar el soporte en fase sólida que comprende el anticuerpo específico para un producto de escisión de SNAP-25, aproximadamente 5  $\mu$ l de la solución apropiada de anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 (20  $\mu$ g/ml de 1 x PBS) se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos MSD de unión elevada y a la solución se le permite secarse al aire en una cabina de seguridad biológica durante 2-3 horas con para que el líquido se evapore de la solución. Los pocillos con anticuerpo de captura unido se bloquearon a continuación añadiendo 150  $\mu$ l de tampón de bloqueo que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y de suero de cabra al 10% (VWR, West Chester, PA) a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas bloqueadas se sellaron y almacenaron a 4°C hasta que fuera necesaria.

30 Para detectar la presencia de un producto de escisión de SNAP-25 escindido mediante análisis ELISA en sándwich con ECL, el tampón de bloqueo de las placas almacenadas se aspiró de los pocillos, 25  $\mu$ l de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida, tal como se describió anteriormente, se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante una noche. Los pocillos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y aclarando cada pocillo tres veces con 200  $\mu$ l de 1 x PBS, TWEEN-20® al 0.1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después del lavado, se añadieron 25  $\mu$ l de solución de anticuerpo de detección de 5  $\mu$ g/ml que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en 1 x PBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)) a cada pocillo, la placa se selló y la placa sellada se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Después de la incubación del anticuerpo de detección, los pocillos se lavaron tres veces con 200  $\mu$ l de 1 x PBS .TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después de lavar, se añadieron 150  $\mu$ l de 1 x tampón de lectura (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y las placas se leyeron utilizando un lector de imágenes SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Se calculó una relación dividiendo la señal obtenida a la dosis de 10 nM para cada par de anticuerpos por la señal obtenida en la dosis de 0 nM para cada par de anticuerpo (tabla 24). Estos resultados indicaron que entre las veintiséis diferentes combinaciones de pares de anticuerpos probados, sólo tres pares de anticuerpo tenían relaciones señal a ruido por encima de 10:1 para la dosis más alta ensayada: el par no. 1 (mAb 2E2A6 de ratón y pAb S9684 de conejo), par N° 4 (mAb 3C1A5 de ratón y pAb S9684 de conejo) y par N° 18 (pAb S9684 de conejo y mAb 2E2A6 de ratón). Al par de anticuerpos 1 fue elegido para el ulterior desarrollo de ensayo.

Par de anticuerpos no.	Anticuerpo de Captura	Anticuerpo de Detección	Detección del producto de escisión SNAP-25	Detección del sustrato no escindido SNAP-25	Relación señal/ruido (10 nM/0 nM)
1	mAb 2E2A6 de ratón	pAb S9684 de conejo	Sí	No	26,6:1
2	mAb 2E2A6 de ratón	pAb N-19 de cabra	Sí	No	7,3:1
3	mAb 2E2A6 de ratón	PAb H-50 de conejo	Sí	No	0,9:1

ES 2 770 033 T3

4	mAb 3C1A5 de ratón	PAb S9684 de conejo	Sí	No	12,1:1
5	mAb 3C1A5 de ratón	pAb N-19 de cabra	Sí	No	1,9:1
6	mAb 3C1A5 de ratón	PAb H-50 de conejo	Sí	No	0,9:1
7	pAb C-18 de cabra	pAb S9684 de conejo	No	No	0,8:1
8	pAb C-18 de cabra	pAb N-19 de cabra	No	No	0,9:1
9	pAb C-18 de cabra	pAb H-50 de conejo	No	No	0,9:1
10	pAb H-50 de conejo	mAb 2E2A6 de ratón	Sí	No	0,9:1
11	pAb H-50 de conejo	pAb C-18 de cabra	No	No	1,0:1
12	pAb N-19 de cabra	mAb 2E2A6 de ratón	Sí	No	0,9:1
13	pAb N-19 de cabra	pAb C-18 de cabra	No	No	1,1:1
14	pAb NTP 23 de conejo	pAb N-19 de cabra	Sí	No	1,2:1
15	pAb NTP 23 de conejo	pAb C-18 de cabra	No	No	1,1:1
16	pAb NTP 23 de conejo	pAb SP12 de ratón	Sí	No	1,3:1
17	pAb NTP 23 de conejo	pAb H-50 de conejo	Sí	No	1,1:1
18	pAb S9684 de conejo	mAb 2E2A6 de ratón	Sí	No	21,3:1
19	pAb S9684 de conejo	pAb C-18 de cabra	No	No	0,7:1



20	pAb S9684 de conejo	mAb SMI-81 de ratón	Sí	Sí	1,2:1
21	mAb SMI-81 de ratón	pAb S9684 de conejo	Sí	Sí	1,1:1
22	mAb SMI-81 de ratón	pAb N-19 de cabra	Sí	Sí	1,0:1
23	mAb SMI-81 de ratón	pAb C-18 de cabra	No	No	0,8:1
24	pAb SP12 de ratón	pAb C-18 de cabra	No	No	1,0:1
25	mAb MC-6050 de ratón	pAb S9684 de conejo	Sí	Sí	5,0:1
26	mAb MC-6053 de ratón	pAb S9684 de conejo	Sí	Sí	7,1:1

#### Ejemplo X

#### 5 Método de detección de endopeptidasa redirigida basado en inmunología que tiene una actividad enzimática de cadena ligera de BoNT/A utilizando ELISA en sándwich con ECL

10 El siguiente ejemplo ilustra los métodos basados en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida mediante la detección de un producto de escisión de SNAP-25 utilizando un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 específico para un producto de escisión de SNAP-25 con un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A mediante ELISA en sándwich con ECL.

15 Para preparar un lisado a partir de células tratadas con endopeptidasa redirigida que tienen tener actividad enzimática de cadena ligera de BoNT/A, una densidad adecuada de las células de una línea celular establecida se sembró en los pocillos de las placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían 100  $\mu$ l de los medios adecuados. Estas células se incubaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% durante 24 horas. Los medios de las células se aspiraron de cada pocillo y se sustituyeron por medios frescos que contenían 0 (muestra no tratada) o una de las dosis se determinadas a partir de un experimento de respuesta a la dosis para esa endopeptidasa redirigida. Después de la incubación de 24 horas, las células se lavaron y se recogieron.

20 Para preparar la solución de anticuerpo de captura  $\alpha$ -SNAP-25, se purificó el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 contenido en las ascitis de la celular línea de hibridoma 2E2A6 utilizando un protocolo estándar de purificación de la proteína A. Para preparar la solución de anticuerpo de detección  $\alpha$ -SNAP-25, anticuerpo policlonal de conejo  $\alpha$ -SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) se conjugó al reactivo de marcado rutenio (II)-tris-bipiridin-(4-metilsulfonato) NHS éster (Meso Scale Discovery Gaithersburg, MD) según las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). La reacción de conjugación, purificación de anticuerpo marcado  $\alpha$ -SNAP-25, determinación de la concentración y almacenamiento fueron tal como se describen en el ejemplo VI.

30 Para preparar el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo que es específico para un producto de escisión SNAP-25, aproximadamente 5  $\mu$ l de solución de anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 2E2A6 (20  $\mu$ g/ml en 1 x PBS) se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos MSD de unión alta y a la solución se le permite secarse al aire en una cabina de seguridad biológica durante 2-3 horas con el fin de que el líquido se evaporará de la solución. Los pocillos unidos al anticuerpo de captura se bloquearon y se utilizaron directamente para detectar actividad endopeptidasa redirigida.

35 Para detectar que la presencia de un producto de SNAP-25 escindido mediante análisis ELISA en sándwich con ECL, el tampón de bloqueo de las placas almacenadas se aspiró de los pozos, se añadieron 25  $\mu$ l de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida a cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante una noche. Los

pocillos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y aclarando cada pocillo tres veces con 200  $\mu$ l de 1x PBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después del lavado, se añadieron 25  $\mu$ l de solución de 5  $\mu$ g/ml de anticuerpo de detección que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en 1 x PBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)) a cada pocillo, la placa se selló y la placa sellada se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Después de la incubación del anticuerpo de detección, los pocillos se lavaron tres veces con 200  $\mu$ l de 1 x PBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después de lavar 150 ml de 1 x tampón de lectura (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) se añadieron a cada pocillo y las placas se leyeron utilizando un lector de imágenes SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Los datos recogidos se analizaron y la CE<sub>50</sub> se calculó tal como se indica en el ejemplo VI. Para endopeptidasas redirigidas a opioides, estos resultados indican que de promedio 1,0 nM de Noc/A a la CE<sub>50</sub> se detectaba (un intervalo de aproximadamente 0,3 nM a aproximadamente 2,0 nM) con una relación señal a ruido para la asíntota inferior de aproximadamente 15:1 aproximadamente 20:1 y una relación cociente señal a ruido de la asíntota superior de aproximadamente 180:1 aproximadamente 300:1.

#### Ejemplo XI

#### Método de detección basado en inmunología de actividad endopeptidasa redirigida utilizando ELISA en sándwich con CL

El siguiente ejemplo ilustra los métodos basados en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida mediante la detección de un producto de escisión de SNAP-25 utilizando un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 específico para un SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A por ELISA en sándwich con CL.

Lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida y la solución del anticuerpo de captura  $\alpha$ -SNAP-25 se prepararán tal como se describió en el ejemplo VII.

Para preparar la solución de anticuerpo de detección  $\alpha$ -SNAP-25, el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) se conjugará con peroxidasa de rábano (HRP) según las instrucciones del fabricante (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). La reacción de conjugación se realizará añadiendo a 500  $\mu$ l de 1 mg/ml de anticuerpos policlonales  $\alpha$ -SNAP-25 a un frasco que contenía peroxidasa activada liofilizada, mezclando los componentes, y a continuación añadiendo 10  $\mu$ l de cianoborohidruro de sodio. Esta mezcla de reacción se incubará a temperatura ambiente durante 1 hora en una campana de humos. Después de inactivar la reacción, los anticuerpos marcados serán purificados mediante un protocolo de columna centrífuga estándar y la concentración de proteína se determinará mediante un ensayo de proteína colorimétrico estándar. La absorbancia del conjugado de anticuerpo policlonal de SNAP-25/HRP se medirá en 455 nm con un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. La solución de anticuerpo de detección  $\alpha$ -SNAP-25 se almacenará a 4°C hasta que fuera necesaria.

Para preparar el soporte de fase sólida que comprendía el anticuerpo de captura  $\alpha$ -SNAP-25 que es específico para el producto de escisión SNAP-25, aproximadamente 100  $\mu$ l de solución de anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 2E2A6 (1  $\mu$ g/ml de 1 x PBS) se añadirán a cada pocillo de una placa de 96 pocillos Greiner blanca y las placas se incubarán a 4°C durante una noche, y a continuación se descartará cualquier solución de anticuerpos en exceso. Luego se bloquearán los pocillos unidos a anticuerpo de captura mediante la adición de 150  $\mu$ l de tampón de bloqueo que comprende reactivo de bloqueo de Amersham al 2% (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y de suero de cabra al 10% (VWR, West Chester, PA) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se descartará el tampón de bloqueo y las placas se transfirieron en seco sobre toallas de papel mediante inversión y golpeando ligeramente. Los pocillos unidos a anticuerpo de captura serán bloqueados a continuación y se utilizarán directamente para detectar actividad endopeptidasa redirigida.

Para detectar la presencia de un producto de escisión de SNAP-25 mediante un análisis ELISA en sándwich con CL, 50  $\mu$ l de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida se añadirán a cada pocillo, la placa se sellará, y la placa sellada se incubará en un agitador giratorio a 500 rpm a 4°C durante de 2 a 4 horas a una noche. Los pocillos de la placa se lavarán tres veces aspirando el lisado celular y aclarando cada pocillo tres veces con 200  $\mu$ l de 1x PBS, TWEEN-20® al 0,05% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después del lavado, se añadirán 100  $\mu$ l de solución 1  $\mu$ g/ml de anticuerpo policlonal  $\alpha$ -SNAP-25/anticuerpo de detección HRP que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en 1x PBS, TWEEN-20® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)) a cada pocillo, la placa se sellará, y la placa sellada se incubará en un agitador giratorio a 650 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación del anticuerpo de la detección, los pocillos se lavarán tres veces con 200  $\mu$ l de 1x PBS, TWEEN-20® al 0,05% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después de lavar, se añadirán 100 ml de mezcla SuperSignal ELISA Pico 1:1 (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) a cada pocillo y las placas se leerán utilizando un luminómetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 395 nm. Se analizarán los datos recogidos y la CE<sub>50</sub> se calculará tal como se describe en el ejemplo VI.

Ejemplo XIIMétodo de detección basado en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida utilizando ELISA en sándwich con ECL múltiple

El siguiente ejemplo ilustra los métodos basados en inmunología múltiples de detección de actividad endopeptidasa redirigida mediante la detección de un producto de escisión de SNAP-25 mediante un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 específico para un producto de escisión de SNAP-25 y un segundo par de anticuerpo para una proteína diferente.

Un ensayo de potencia de endopeptidasa redirigida puede realizarse utilizando un ELISA en sándwich con ECL múltiple. Dicho ensayo se describe en la solicitud de patente correspondiente de Ester Fernandez-Salas, y col., *Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, Solicitud de patente de los E.E.U.U. Nº de serie: 12/403.531 y puede ser utilizado con las líneas celulares y endopeptidasas redirigidas y las correspondientes líneas celulares desveladas en la presente memoria descriptiva.

Ejemplo XIIIMétodo de detección basado en inmunología de detección de actividad endopeptidasa redirigida utilizando ELISA en sándwich EC múltiple

El siguiente ejemplo ilustra métodos basados en inmunología múltiples de detección de actividad endopeptidasa redirigida mediante la detección de un producto de escisión de SNAP-25 mediante un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SNAP-25 específico para un producto de escisión de SNAP-25 y un segundo par de anticuerpo para una proteína diferente.

Un ensayo de potencia de endopeptidasa redirigida puede realizarse utilizando un ELISA en sándwich EC múltiple. Dicho ensayo se describe en la solicitud de patente correspondiente de Ester Fernandez-Salas, y col., *Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, Solicitud de patente de los E.E.U.U. Nº de serie: 12/403.531 y puede ser utilizado con las líneas celulares y endopeptidasas redirigidas y las correspondientes líneas celulares desveladas en la presente memoria descriptiva.

Ejemplo XIVMétodo basado en inmunología para detectar cantidades nanomolares de endopeptidasas redirigidas

El ejemplo siguiente ilustra cómo realizar métodos de detección de cantidades nanomolares de actividad endopeptidasa redirigida basados en inmunología.

1. Método basado en inmunología de detección de endopeptidasas redirigidas mediante ELISA en sándwich con ECL.

Para preparar un lisado de células tratadas con una endopeptidasa redirigida, aproximadamente de 50.000 a 150.000 células de una línea celular establecida adecuada para el análisis se sembraron en los pocillos de las placas de cultivo tisular de 96 pocillos con poli-D-lisina que contenían 100  $\mu$ l de los medios adecuados (véanse los ejemplos I y II). Estas células se incubaron en una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% durante 24 horas. El medio de las células se aspiró de cada pocillo y se sustituyó por medio fresco que contenían 0 (muestra no tratada) y la respuesta a la dosis apropiada tal como se describe para cada endopeptidasa redirigida en esta solicitud. Después de una incubación de 24 horas, las células se lavaron y se recogieron o incubaron durante otros dos días sin endopeptidasa redirigida antes de recogerlas. Para recoger las células, el medio se aspiró, se lavó con 1 x PBS y se lisaron añadiendo 30  $\mu$ l de tampón de lisis que comprendía HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1% a cada pocillo y la placa se incubó en un agitador giratorio a 500 rpm durante 30 minutos a 4°C. La placa se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C para que sedimenten los restos celulares y el sobrenadante se trasladó a una placa de 96 pocillos recubierta de anticuerpos de captura para realizar la etapa de detección.

La solución de anticuerpo de captura  $\alpha$ -SNAP-25, la solución de anticuerpo de detección  $\alpha$ -SNAP-25 y el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura que es específico para un producto de escisión de SNAP-25 se prepararon tal como se describe en el ejemplo VII.

Para detectar que la presencia de un producto de SNAP-25 escindido por análisis ELISA en sándwich con ECL, el tampón de bloqueo de las placas almacenadas se aspiró, 25-30  $\mu$ l de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante 2 horas o 24 horas. Los pocillos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y aclarando cada pocillo tres veces con 200  $\mu$ l de 1x PBS, TWEEN-20 @ al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después del lavado, se

añadieron 25 µL de solución a 5 µg/ml de anticuerpo de detección  $\alpha$ -SNAP-25 que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en 1x PBS, TWEEN-20 ® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)) a cada pocillo. La placa se selló y la placa sellada se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Después de la incubación del anticuerpo de detección  $\alpha$ -SNAP-25, los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl de 1x PBS, TWEEN-20 ® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después del lavado, las placas se procesaron, se analizaron los datos recogidos y la  $CE_{50}$  se calcularon tal como se indica en el ejemplo VI. Estos resultados indicaban que, de promedio, 1,0 nM de Noc/A a la  $CE_{50}$  se detectaron cuando se utilizan la línea celular clonal SK-N-DZ #3 (un intervalo de aproximadamente 0,3 nM a aproximadamente 2,0 nM) con una relación señal a ruido para la asíntota superior de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 300:1. Además, de promedio 3,7 nM de Noc/A a la  $CE_{50}$  se detectaron cuando se utilizan células de la línea celular clonal AGN P33 #6 (un intervalo de aproximadamente 2,0 nM a aproximadamente 5,5 nM) con una relación señal a ruido para la asíntota superior de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 500. Para las células SK12 que son específicas para la endopeptidasa redirigida que contiene un ligando dinorfina A, de promedio 8,4 nM de Dyn/A a la  $CE_{50}$  se detectaron cuando se utilizan las células SK12 (un intervalo de aproximadamente 4,5 nM a aproximadamente 10,0 nM) con una relación señal a ruido para la asíntota superior de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 20:1. Además, de promedio 8,8 nM de TVEMP-galanina a la  $CE_{50}$  se detectaron cuando se utilizan células de la línea celular clonal Neuro-2a #7 (un intervalo de aproximadamente 5,0 nM a aproximadamente 15,5 nM) con una relación señal a ruido para la asíntota superior de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 200:1. Este método también puede realizarse de manera múltiple, tal como se describe en el ejemplo IX.

## 2. Método basado en inmunología de detección de endopeptidasas redirigidas utilizando ELISA en sándwich con CL.

Lisado de células tratadas con una endopeptidasa redirigida y la solución del anticuerpo de captura  $\alpha$ -SNAP-25 se preparará tal como se describe en el ejemplo VII. La solución de anticuerpo de detección  $\alpha$ -SNAP-25 y el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura que es específico para un producto escindido de SNAP-25 se preparará tal como se describe en el ejemplo comparativo VIII.

Para detectar la presencia de un producto de SNAP-25 escindido mediante análisis ELISA en sándwich con CL, se añadirán 100 µl de un lisado de células tratadas con una endopeptidasa redirigida a cada pocillo, la placa se sellará y la placa sellada se incubará en un agitador giratorio a 500 rpm a 4°C durante 2 horas o 24 horas. Los pocillos de la placa se lavarán tres veces aspirando el lisado celular y aclarando cada pocillo tres veces con 200 µl de 1x PBS, TWEEN-20 ® al 0,05% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después del lavado, se añadirán 100 µl de solución al 1 µg/ml de anticuerpo policlonal  $\alpha$ -SNAP-25 / anticuerpo de detección HRP que comprendía reactivo de bloqueo de Amersham al 2% en 1x PBS, TWEEN-20 ® al 0,1% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)) a cada pocillo, la placa se sellará, y la placa sellada se incubará en un agitador giratorio a 650 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación del anticuerpo de detección, los pocillos se lavarán tres veces con 200 µl de 1x PBS, TWEEN-20 ® al 0,05% (monolaurato de sorbitán polioxietileno (20)). Después de lavar, se añadirán 100 µl de mezcla SuperSignal ELISA Pico 1:1 (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) a cada pocillo y las placas se leerán utilizando un luminómetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 395 nm. Se analizarán los datos recogidos y la  $CE_{50}$  se calculará tal como se describe en el ejemplo VI. Este método también puede realizarse de manera múltiple, tal como se describe en el ejemplo IX.

### Ejemplo XV

#### Método basado en inmunología para detectar anticuerpos neutralizantes $\alpha$ -endopeptidasa redirigida

El ejemplo siguiente ilustra cómo llevar a cabo un método basado en inmunología que puede detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ - Noc/A.

Noc/A, actualmente está siendo evaluada para el tratamiento de afecciones dolorosas, algunas de ellas crónicas. Con el tratamiento de larga duración repetido de Noc/A, un paciente puede desarrollar anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -Noc/A para la endopeptidasa redirigida que conducen a inmunorresistencia. Los anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -Noc/A inhibirán la actividad endopeptidasa redirigida deteniendo la captación de endopeptidasa redirigida en células neuronales y otras diana uniéndose al ligando de dirección o el dominio de translocación ( $H_N$ ) de la endopeptidasa redirigida. No se establece ningún ensayo para determinar la presencia de los anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -Noc/A en sangre del paciente. Sería más rentable y consumiría menos tiempo si pudiera desarrollarse un ensayo basado en células para detectar anticuerpos neutralizantes en los pacientes tratados con endopeptidasas redirigidas.

Para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -Noc/A, pueden utilizarse los métodos basados en inmunología de determinación de actividad endopeptidasa redirigida desvelados en la presente memoria descriptiva. Una forma es determinar la cantidad de producto de escisión de SNAP-25 presente después del tratamiento con diversas concentraciones de Noc/A utilizando un método de detección de transferencia de Western, la otra forma era utilizar un método de detección de ELISA en sándwich con ECL.

Para preparar una muestra que comprende anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ - Noc/A, se aisló suero de la sangre de un mono inmunizado con Noc/A y los anticuerpos se purificaron por afinidad. También se inmunizaron conejos con el

péptido variante nociceptina, el ligando objetivo presente en la molécula de Noc/A, su suero recogido y los anticuerpos purificados por afinidad (policlonales anticuerpos anti-nociceptina).

5 Para preparar un lisado a partir de células tratadas con una muestra que comprendía células de Noc/A, células de línea celular clonal SK-N-DZ #3 de la célula y células de la línea celular clonal AGN P33 #6 se sembraron en placas de 96 pocillos de poli-D-lisina durante 16-18 horas. PAB anti-nociceptina a 0-3  $\mu\text{g/ml}$  se diluyó en RPMI SFM (con suplementos de NGF, B27 y N2) que contenía 1 nM de Noc/A y la mezcla se incubó previamente a temperatura ambiente durante 1 hora. a continuación las soluciones se añadieron a las células y se incubaron durante 24 h antes de realizar el ensayo de ELISA con ECL. Este anticuerpo variante anti-nociceptina bloqueaba totalmente la captación de Noc/A 1 nM a 1  $\mu\text{g/ml}$  (>90% de inhibición) en ambas líneas celulares. El anticuerpo policlonal anti-Noc/A de mono también ensayó estas líneas celulares. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos con poli-D-lisina a 100.000 células por pocillo durante 24 horas en medio de cultivo RPMI suplementado con N2, B27 y NGF. Los anticuerpos policlonales anti-Noc/A a 0-20  $\mu\text{g/ml}$  se diluyeron en medio que contenía 1 nM de Noc/A y la mezcla se incubó previamente a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación la mezcla se añadió a las células y se incubó durante 24 h antes de realizar el ensayo de ELISA con ECL. Se observó hasta el 60% a las concentraciones más altas de 6-20  $\mu\text{g/ml}$  de pAb anti-Noc/A en la línea celular SK-N-DZ y aproximadamente del 30% en la línea celular clonal AGN P33 línea celular #6. Esto puede deberse a que los anticuerpos policlonales anti-Noc/A no son específicos para el sitio de unión y contienen otros anticuerpos que se unen a otras partes de la molécula produciendo solamente un bloqueo parcial a las concentraciones ensayadas. Pueden ser necesarias concentraciones más altas, para conseguir el bloqueo completo.

Para detectar la presencia de un producto escindido de SNAP-25 mediante análisis de transferencia de Western, el medio se aspirará de cada pozo, las células se suspenderán en 50  $\mu\text{l}$  de tampón de carga de SDS-PAGE y a continuación se calentarán a 95°C durante 5 minutos. Una alícuota de cada muestra recogida se analizará por transferencia de Western tal como se ha descrito en el ejemplo I, excepto que las muestras recogidas se separarán por SDS-PAGE utilizando geles Criterion al 12% 26 por pocillo (Bio - Rad Laboratories, Hercules, CA) y el suero de anticuerpo policlonal de conejo  $\alpha$ -SNAP25<sub>197</sub> se utilizará como el anticuerpo primario (véase el ejemplo V). Los resultados revelarán la menor concentración de endopeptidasa redirigida que producirá una banda detectable de producto de escisión de SNAP-25 en la transferencia de Western.

Para detectar la presencia de un producto de SNAP-25 escindido mediante ELISA en sándwich con ECL, el medio se retiró de cada pocillo y las células se sometieron a lisis tal como se describe en el ejemplo VI. La solución de anticuerpo de captura  $\alpha$ -SNAP-25, la solución de anticuerpo de detección  $\alpha$ -SNAP-25 y el soporte de fase sólida  $\alpha$ -SNAP-25 se prepararon tal como se describe en el ejemplo comparativo VIII. Los sobrenadantes se transfirieron al soporte de fase sólida  $\alpha$ -SNAP-25 y un se realizó un ensayo ELISA en sándwich con ECL tal como se detalla en el ejemplo VI. Los datos recogidos se analizaron y la  $CE_{50}$  se calculó según lo descrito en el ejemplo VI, excepto que la  $CE_{50}$  es la dilución de suero necesaria para inhibir la actividad de la endopeptidasa redirigida a  $\frac{1}{2}$  su máximo y la relación de la señal máxima ( $\text{Señal}_{\text{Max}}$ ) con respecto a la señal mínima ( $\text{Señal}_{\text{Min}}$ ) se obtuvo dividiendo la señal de producto de escisión de SNAP-25 obtenida con la dilución más alta de anticuerpo por la señal obtenida con la menor dilución de anticuerpo.

Los resultados indican que pudo detectarse la presencia de anticuerpos neutralizantes  $\alpha$ -Noc/A en el suero de mono y la presencia de anticuerpos variantes  $\alpha$ -nociceptina. La actividad de la molécula Noc/A incubada en anticuerpos purificados por afinidad del animal inmunizado disminuía a medida que disminuía la dilución de anticuerpos. El mismo ensayo se realizará con la Dyn/A y los compuestos TVEMP-galanina utilizando las líneas celulares específicas para cada compuesto a ensayar.

#### Ejemplo XV

##### Desarrollo de un ensayo basado en células una endopeptidasa redirigida a galanina

El ejemplo siguiente ilustra cómo identificar las líneas celulares establecidas que poseen la capacidad de captación de endopeptidasa redirigida necesaria para el desarrollo de un ensayo de potencia basado en células.

##### 1. Crecimiento del cultivo madre de líneas celulares candidatas.

Para cultivar las líneas celulares, una densidad adecuada de las células de la línea celular que está siendo ensayada se sembraron en un matraz de cultivo tisular de 162  $\text{cm}^2$  contenía 30 ml de medio de cultivo adecuado (véase la tabla 25) y se cultivaron una incubadora a 37°C en dióxido de carbono al 5% o al 10% hasta las células alcanzaron la densidad deseada.

Tabla 25. Tabla resumen de todas las líneas celulares y sus respectivos medios.		
Tipo de la célula; Descripción; fuente	Medio completo (CM) todos de Invitrogen (a menos que se especifique lo contrario)	Medio libre de suero (SFM) todos de Invitrogen, (a menos que se especifique lo contrario)
SiMa (línea celular de neuroblastoma humano, DSMZ # 164 ACC, Braunschweig, Alemania) SiMa H1 (línea celular clonada de células SiMa)	RPMI 1640 (90%) Suero fetal bovino (SFB, 10%) AANE (0,1 mM), HEPES (10 mM), Piruvato de sodio (1 mM) penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml),	RPMI 1640 (90%) AANE (0,1 mM), HEPES (10 mM), Piruvato de sodio (1 mM) (100 U/ml) de penicilina estreptomycin (100 µg/ml) suplemento N2 (1 x) Suplemento B27 (1 x)
Neuro-2a (neuroblastoma de ratón: (ATCC #CCI131, Manassas, VA,))	MEM de Earle (90%) Suero fetal bovino 10%) AANE (0,1 mM), HEPES (10 mM), Piruvato de sodio (1 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml)	EMEM (90%) AANE (0,1 mM), HEPES (10 mM), Piruvato de sodio (1 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml)
PC-12 feocromocitoma de rata (ATCC # CRL-1721)	RPMI 1640 (90%) FBS Dializado (5%) Suero de caballo (10%) HEPES (10 mM) Piruvato de sodio (1 mM) D-glucosa (0,5%, Sigma) penicilina (100 U/ml); Suplemento N2 (1 x) estreptomycin (100 µg/ml)	Medios de diferenciación: RPMI 1640 (90%) HEPES (10 mM) Piruvato de sodio (1 mM) D-glucosa (0,5%, Sigma) penicilina (100 U/ml); Estreptomycin (100 µg/ml) Suplemento N2 (1 x) Albúmina de suero bovino (0,2% p/v) NGF (50 ng/ml, Promega)
Carcinoma embrionario de ratón P19 (ATCC #CRL-1825)	Alfa MEM (90%) Suero bovino (7,5%) FBS (2,5%) Penicilina (100 U/ml); Estreptomycin (100 µg/ml)	Alfa MEM (90%) FBS (2,5%) Penicilina (100 U/ml); Estreptomycin (100 µg/ml)
AANE: aminoácidos no esenciales, MEM: medio esencial mínimo. DMEM: MEM de Dulbecco. EMEM MEM de Earle. Tenga en cuenta que las células de PC-12 se diferenciaron en medio de diferenciación y no en SFM.		

## 2. Cribado de líneas celulares comerciales para la sensibilidad a los compuestos galanina TVEMP-galanina

- 5 Las líneas celulares comerciales se cribaron por su sensibilidad a compuestos de TVEMP-galanina según lo medio mediante la escisión de SNAP25 después del tratamiento con los correspondientes compuestos. Se utilizaron diversos compuestos de TVEMP-galanina para la investigación y los ensayos. Las células PC-12, Neuro-2a, SiMa y P19 se sembraron en medio libres de suero durante tres días o en CM durante un día. Estas células diferenciadas y sin exposición previa se trataron durante 18 horas con el lote A TVEMP-galanina, a concentraciones de 0 y 75 nM.
- 10 El lote A de TVEMP-galanina mostraba una actividad en células tanto PC-12 como Neuro-2<sup>a</sup> tal como se ve mediante la presencia incrementada de SNAP25 escindido y células Neuro-2a en estado diferenciado son más sensibles a los compuestos TVEMP con ligando galanina, que las células sin exposición previa. El orden de rango de la actividad de muestra que las células PC-12 tienen mayor actividad, seguida por Neuro-2a y finalmente las células de SiMa. Era necesario determinar si la captación era específica para estos compuestos redirigidos a galanina y por lo tanto, era importante ensayar las células con otros compuestos que no contienen el ligando de galanina. Noc/A es un compuesto redirigido que contiene un ligando variante de nociceptina y LH<sub>N</sub>/A (control negativo) un compuesto que carece de dominio de unión. La captación de LH<sub>N</sub>/A es inespecífica y debe tener una actividad significativamente menor que el compuesto de TVEMP-galanina si la línea celular posee captación
- 15

específica para el compuesto redirigido . El compuesto de Noc/A ha demostrado previamente tener captación específica en las células SiMa y se utilizará como punto de partida para ensayar las líneas celulares. Una línea celular favorable debe tener baja captación de la LH<sub>N</sub>/A y el compuesto de Noc/A y elevada captación del compuesto de TVEMP-galanina. La tabla 26 muestra los resultados de este experimento.

5

Tabla 26. Cribado de células PC-12, Neuro-2a y SiMa en diferentes condiciones utilizando TVEMP-galanina.					
		TVEMP-galanina. Lote A	TVEMP-galanina. Lote B	LH <sub>N</sub> /a	Noc/A
Concentración (mg/ml)		0,168	0,175	1,63	1,00
Valores de CE <sub>50</sub> (nM)	PC-12, sin exposición previa	73,4 ±10,7	105,6 ±16,0	> 200	72,9 ±26,9
	SiMa, sin exposición previa	138,6 ±43,9	133,8± 24,2	> 300	48,3 ±18,1
	Neuro-2a, sin exposición previa	122,4 ±15,7	116 ± 17,5	> 200	> 150
	SiMa, Dif O/N	> 400	> 150	> 400	16,1 ± 11,9
	Neuro-2a Dif 4D		34,5 ±7,5	39,7 ± 5,6	105,9 ± 44,3
	SiMa, Dif 4D	101,8 ±20,5	65,3 ± 7,8	> 150.	88,7 ±23,3 6

Ensayo de lotes A y B de TVEMP-galanina y controles LH<sub>N</sub>/A y Noc/A en diversas líneas celulares y condiciones de cultivo/diferenciación. Cuadro resumen que muestra detalles de cada compuesto ensayado más valores de CE<sub>50</sub>.

Los resultados muestran que el lote A de TVEMP-galanina y el lote B de TVEMP-galanina tenían gráficas o valores de CE<sub>50</sub> que eran similares a, o solamente 1-2 veces más activos que los controles negativos en las líneas celulares ensayadas. Este dato implica que las células nativas no son suficientemente sensibles y que estas células tendrán que ser transfectadas con los plásmidos que codifican proteínas receptoras de galanina o receptores GalR1 o GalR2.

10

### 3. Transfección estable de células PC-12, Neuro-2a y SiMa con GalR.

15

Un día antes de la transfección, las células se sembraron a densidades de 0,5 x 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 6 pocillos recubierta con IV (Cat #354554: BD Biosciences) (SiMa, PC-12) o una placa Costar de 6 pocillos (Cat # 3516: Corning) (Neuro-2a). Se realizaron transfecciones diluyendo 12 µl de Lipofectamine™ 2000 (Cat # 52758, Invitrogen) en 250 µl de medio de suero reducido Opti - MEM® I (Cat # 3195, Invitrogen) seguido de incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Cuatro microgramos de ADN del plásmido GalR se mezclaron con 0,4 µg del vector pAdVantage™ (1 mg/ml, Cat #E1711, Promega) en 250 µl de medio de suero reducido Opti - MEM® durante 5 minutos. Después de 5 minutos de incubación, el Lipofectamine™ 2000 diluido y el ADN de plásmidos diluido se mezclaron y se incubaron durante 20 min adicionales a temperatura ambiente, para la formación de complejos. Mientras tanto, las células se lavaron con OPTI-MEM® y se añadieron 0,5 ml de OPTI-MEM® a cada pocillo. Después de la incubación de 20 minutos, se añadieron cuidadosamente 0,5 ml que contienen los complejos de Lipofectamine™ 2000 diluido y ADN de plásmidos diluido a los pocillos que contenían las células en 0,5 ml de OPTI-MEM®. La placa se incubó a 37°C durante 5 horas, tras lo cual se añadió 1 ml de medio completo. Al día siguiente, el medio se sustituyó por medio de cultivo durante 48 horas. El día 4, después de que las células se recuperaron de la transfección, el medio de cultivo se sustituyó por medio de cultivo fresco que contenía Geneticin® (Cat #10131: Invitrogen) a 0,5 mg/ml (dilución 1:100) y se incubó durante 3 días adicionales . El día 7 después de la transfección, las células fueron transferidas a un matraz de colágeno IV de 75 cm (Cat # 35423: BD Biosciences) que contenía medio de cultivo y geneticin (0,5 mg/ml, dilución 1:100). En esta transferencia, aproximadamente el 90% de las células murieron y fueron retiradas durante el cambio de los medios. El medio de cultivo que contenía geneticin (0,5 mg/ml, dilución 1:100) se cambiaba cada dos días hasta el día 21.

20

25

30

35

Para la selección de células estables capaces de captar compuestos de TVEMP y galanina, los parámetros eran cribar en busca de clones que producen el mayor porcentaje de escisión de SNAP25 con tratamiento con TVEMP-galanina en el ELISA en sándwich con ECL utilizando placas recubiertas con 2E2A6 monoclonal para la captura y anticuerpo policlonal SNAP25 sulfomarcado (Sigma Cat # S9684) para la detección. Los valores de CE<sub>50</sub> en la tabla 27 muestran que el Lote D de TVEMP-galanina exhibe una captación como mínimo diez veces mayor que el control negativo en las células SiMa y Neuro-2a transfectadas con GalR1 y GalR2 y captación sólo 2-4 veces mayor en las

40

5 células PC-12 transfectadas. Dado que las células PC-12 transfectadas parecen tener menor sensibilidad y especificidad que las células SiMa y Neuro-2a, no se clonarán. Además, dado que el ligando 1-16mero de galanina en los compuestos TVEMP-galanina se une al receptor GALR1 con más afinidad que al GALR2, se clonarán solamente las células transfectadas con GALR1. La figura muestra también que los lotes C y D de TVEMP-galanina exhiben 9-10 veces mayor captación que tanto LH<sub>N</sub>/A y como el compuesto redirigido a nociceptina TVEMP-nociceptina en el GalR1 de Neuro-2a.

Tabla 27. Ensayo de poblaciones transfectadas de forma estable pero no clonales de SiMa, Neuro-2a y PC12 transfectadas con receptores GalR1 o GalR2

		TVEMP-galanina C	TVEMP-galanina D	LH <sub>N</sub> /a	TVEMP- nociceptina
Concentración (mg/ml)		1,260	0,303	1,46	1,00
Valores de CE <sub>50</sub> (nM)	SiMa GalR1		36,2 ± 8,6	> 300	
	SiMa GalR2		26,6 ± 6,7	> 300	
	PC-12 GalR1		64,1 ± 19,5	202,7	
	PC-12 GalR2		> 150	> 300	
	Neuro-2a GaOR1	32,2 ± 3,3	40,8 ± 6,0	> 300	> 300
	Neuro-2a GalR2	35,2 ± 3,1	46,0 ± 6,1	> 300	> 300

10 Las poblaciones no-clonales seleccionadas no son una buena población de células a utilizar con regularidad porque contienen una mezcla de células que expresan diferentes niveles del receptor y estas poblaciones pueden cambiar con el tiempo. Para obtener líneas celulares estables derivadas de células individuales, se inició un enfoque clonación dilucional. El día 21, las células transfectadas se tripsinizaron, se disociaron con aguja y se contaron. Las restantes líneas celulares transfectadas se congelaron para utilización futura. Las células se diluyeron sucesivamente a 10 células/ml en medio de cultivo que contenía geneticin (0,5 mg/ml, dilución 1:100). 2 x placas de 15 96 pocillos recubiertas de colágeno IV (SiMa, PC-12) o 2 placas Costar de 96 pocillos (Neuro-2a) se sembraron a 100 µl por pocillo para lograr una densidad de 1 célula por pocillo. Las placas se devolvieron a la incubadora y se dejaron intactas dos semanas para la formación de la colonia. Después de dos semanas (día 35), los pocillos se revisaron cuidadosamente para detectar la presencia de colonias individuales formadas en el fondo del pocillo (todo el pocillo se comprobó cuidadosamente para múltiples colonias). Cuando un pocillo se identificó con un grupo de 20 células individual, todo el pocillo fue analizado cuidadosamente para asegurarse de que un y sólo un grupo de células estaba presente. Se tomó una foto de ese grupo individual. Si hubiera alguna duda sobre los grupos adicionales, el pocillo no se seleccionaba. El día 36, los clones que se seleccionaron se separaron con TrypLE y se añadieron 0,5 ml de medio completo que contenía geneticin (0,5 mg/ml, dilución 1:100) fue agregado para detener la reacción de tripsina. Todo este volumen se transfirió a placas de 6 pocillos y se diluyó adicionalmente con 3,0 ml 25 adicionales de medio completo que contenía geneticin (0,5 mg/ml, dilución 1:100). A los clones se les permitió crecer hasta el 90% de confluencia, luego se tripsinizaron otra vez y se transfirieron a matraces con colágeno IV o Costar de 75 cm con 10,0 ml de medio completo que contenían geneticin (0,5 mg/ml, dilución 1:100). Una vez que las células eran confluentes al 90% de nuevo, las células se utilizaron para llenar tres crioviales para almacenamiento congelado o se utilizaron para la detección en el ensayo de ELISA de compuestos redirigidos a 30 galanina.

El compuesto de referencia TVEMP-galanina, lote C se utilizó para ensayar estos clones utilizando dos operadores que realizaron pruebas independientes. Los clones de SiMa GalR1 crecieron lentamente y no estaban disponibles para los ensayos en ese momento. Afortunadamente, los clones de Neuro-2a crecieron más rápido y pronto 35 suficientes cantidades de 8 de los 12 clones estaban disponibles para los ensayos. Estas células clonales Neuro-2a GalR1 se ensayaron con una gama de dosis completa de compuestos TVEMP-galanina (0-300 nM) y los resultados de nueve de estos clones se muestran a continuación. Los restantes cuatro clones crecieron muy lentamente y no fueron ensayados. Las células parentales seleccionadas pero no clonales se sembraron junto con los clones para utilizar como punto de referencia. Tabla 28 muestra la actividad de cada uno de los ocho clones junto a las células 40 Neuro-2a GalR1 no-clonales seleccionadas, cuando se ensayan con compuesto TVEMP-galanina. De los ocho clones ensayados, sólo los clones #4, 7 y 12 presentaron buena captación del compuesto TVEMP-galanina con valores de CE<sub>50</sub> aceptable. Los clones Neuro-2a GalR1 # 1, 3 y 10 no captaban los compuestos TVEMP-galanina,



mientras que los clones # 5, 11 y 13 junto con la población no-clonal generaban valores de CE<sub>50</sub> muy altos y no se realizaron más ensayos con estas células.

Tabla 28. Resultados del cribado de clones derivados de una única célula Neuro-2a GalR1 el lote C de TVEMP-galanina.

Placa	Tipo de la célula	CE <sub>50</sub> ± error estándar (nM)	
		Operador 1	Operador 2
1	N2A no clonal	82,1±9,6	92,0± 10,8
1	N2A GALR1 clon #1	>300	>300
1	N2A GALR1 clon #3	>300	>300
1	N2A GALR1 clon #4	39,7±3,4	39,4±6,6
2	N2A no-clonales	211,2± 167,7	116,0±26,8
2	N2A GALR1 clon #5	202,6±82,9	113,0± 18,1
2	N2A GALR1 clon #7	23,1±3,3	15,5± 1,8
2	N2A GALR1 clon #10	>300	>300
3	N2A GALR1 clon #7	20,3 ± 1,6	38,0±6,3
3	N2A GALR1 clon #11	270,0±243	247,0±101
3	N2A GALR1 clon #12	43,2±5,2	57,5± 14,3
3	N2A GALR1 clon #13	144,1 ±143	184,7±15,6

5 4. Caracterización de la expresión de GalR1 en las líneas celulares clonales

El cribado de los clones mostraba que sólo los clones # 4, 7 y 12 son más sensibles que las células no-clonales. ARN mensajero (ARNm) se extrajo de estos 3 clones, así como las células Neuro-2a no clonales parentales no transfectadas y transfectadas de forma estable para la caracterización por RT-PCR utilizando las condiciones de RT-PCR que se describen en el ejemplo V y los cebadores descritos en la tabla 29.

Tabla 29. Cebadores específicos de GALR1 y GALR2

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
GALR1 dir.	5' CCCCATCATGTCATCCACCT 3'	150
GALR1 Inv.	5' ATGGGGTTCACCGAGGAGTT 3'	151
GALR2 dir.	5' CATCGTGCGGTGCTTTT 3'	152
GALR2 Inv.	5' AGCGGGAAGCGACCAAAC 3'	153

Los resultados de la tabla 30 muestran que las células no clonales transfectadas y los clones tienen mucho mayores cantidades de ARNm de GALR1 que las células parentales. En el cribado de células con TVEMP-galanina, el clon #7 mostró ser el más sensible a TVEMP-galanina. El clon #7 también ha mostrado tener la mayor cantidad de ARNm de GALR1 según la tabla 30. Los valores de CT para Neuro-2a GalR1 clon 7 (Neuro-2a #7) eran los más bajos, seguido por el clon 4 y luego el clon 12. Las no clonales ensayadas en este momento proporcionaron un CT cercano al clon 12, sin embargo, estas células contienen una población cambiante de forma constante de las células que contienen concentraciones variables del receptor GalR1 y, por lo tanto no eran consideradas una buena población para el trabajo futuro. De los tres clones con bajos CE<sub>50</sub>, el clon de Neuro-2a GalR1 clon #12 (Neuro-2a # 12) creció el más rápido, seguido por Neuro-2a clon #7 y por último Neuro-2a clon #4. Además de su tasa de crecimiento lento, Neuro-2a clon # 4 no se ensayó más porque la sensibilidad de Neuro-2a clon #7 era mucho mejor que para el clon #4.

Tabla 30. Grandes diferencias en ARNm de GALR1 en células clonales Neuro-2a transfectadas frente a células no clonales y parentales transfectadas

Línea celular	Parental	No-clonal	Clon 4	Clon 7	Clon 12

CT promedio	32,0	21,7	20,8	19,3	21,6
Veces de cambio del ARNm	1,0	1269,5	2418,7	6793,8	1332,6

5. Comparación de la sensibilidad y especificidad de los clones #7 y #12 de Neuro-2a con compuestos TVEMP-galanina

5 Los dos clones se ensayaron uno junto a otro en un intento de identificar el más sensible y selectivo de los dos, de modo que pudieran recogerse datos de confianza del clon de mejor rendimiento. La tabla 31 muestra los resultados de estos dos clones cuando se trataron con TVEMP-galanina, lote C y LH<sub>N</sub>/A para la sensibilidad y selectividad respectivamente. Ambos clones exhiben altas relaciones de señal a ruido. El clon #7 de Neuro-2a tiene una CE<sub>50</sub> de 5,5 nM mientras que la CE<sub>50</sub> para el clon #12 de Neuro-2a es 68,4 nM. El clon #12 de Neuro-2a tiene que ser ensayado con un intervalo de dosis de 0-300 nM, mientras que el clon #7 de Neuro-2a puede ensayarse con un intervalo de dosis de 0-30 nM para provocar una meseta a la concentración más alta utilizada. Ambos clones muestran buena separación entre LH<sub>N</sub>/A y TVEMP-galanina, lote C, el clon #12 de Neuro-2a muestra algo de captación inespecífica a las altas concentraciones, mientras que clon #7 de Neuro-2a no lo hace. Tal como se ve en los resultados tabulados, el intervalo para ensayos con las células Neuro-2a #7 es diez veces menor que para las células Neuro-2a #12 dando como resultado en 10 veces menos compuesto utilizado para Neuro-2a # 7 que para Neuro-2a #12. El Neuro-2a #7 es 8 veces más selectivo que Neuro-2a clon #12 cuando se utilizó LH<sub>N</sub>/A como comparación. La relación señal a ruido es superior a 100 para ambos clones, sin embargo, una relación de 10 sería suficiente para desarrollar un análisis de potencia basado en células. La CE<sub>50</sub> para el clon Neuro-2a #7 es de 5,5 nM aproximadamente doce veces más baja que la de Neuro-2a #12, cuya CE<sub>50</sub> es 68,4 nM. El intervalo de dosis bajo para los ensayos, la selectividad de 24 veces respecto a LH<sub>N</sub>/A, la elevada relación señal a ruido, la excelente sensibilidad que da como resultado una baja CE<sub>50</sub> y la baja cantidad de proteína necesaria para cada ensayo, todos implican que el clon #7 de Neuro-2a sería el clon para continuar con el ensayo de potencia basado en células para su utilización en la determinación de las relaciones de potencia para compuestos de TVEMP-galanina.

25

	Neuro-2a #7	Neuro-2a #12
Intervalo	0-30 nM	0-300 nM
Selectividad	24 veces	3 veces
Relación señal/ruido	190	547
Porcentaje de la señal de LHN/A máxima respecto a la señal de TVEMP – Gal máxima	4,3%	37,6%
CE <sub>50</sub>	5,5 nM	68,4 nM
Proteína necesaria	~ 1 µg	~ 10 µg

Neuro-2a # 7 y #12 se trataron con TVEMP-galanina, lote C y LH<sub>N</sub>/A durante 16 horas en CM. La actividad se detectó utilizando ECL-ELISA.

Ejemplo XVI

30 Generación de líneas celulares clonales que sobreexpresan el receptor KOR-1 para la captación de endopeptidasa dirigida a dinorfina A

El ejemplo siguiente ilustra cómo caracterizar y comparar varias líneas celulares clonales originadas de una línea celular establecida transfectadas con el receptor diana y posterior clonación de la línea celular. Este ejemplo específico se refiere a la identificación y caracterización de líneas celulares clonales transfectadas con hKOR-1 que se describieron en primer lugar en el ejemplo III, tabla 9.

35 Cuatro de los clones de AGN P33-KOR (clones número 9 Tabla 8, 9, 10 y 12 en el ejemplo III) se seleccionaron y ensayaron con Dyn/A con una respuesta a la dosis completa de 0-150 nM. Al mismo tiempo, dos clones de SiMa-KOR (clones número 12 y 16 de la tabla 9 en el ejemplo III) seleccionados y ensayados con Dyn/A con una respuesta a la dosis completa de 0-150 nM. En este experimento, AGN P33-KOR clones 8, 9 y 12 produjeron una captación muy baja y por lo tanto fueron descartados; el AGN P33 - KOR clon 10 muestra buena captación y se obtuvo una CE<sub>50</sub> de 30,3 nM. Los dos clones de SiMa-KOR ensayados exhiben buena captación y se obtuvo una CE<sub>50</sub> de 26,6 nM para el clon 16 y se obtuvo una CE<sub>50</sub> de 11,8 nM para el clon 12. Estos tres clones se ensayaron a continuación para la sensibilidad y selectividad comparando la captación del compuesto Dyn/A diana con el control

negativo LHN/A que carece de un ligando diana y el control de Noc/A. La comparación de los tres clones y las células SiMa parentales utilizando una respuesta a la dosis completa de 0-150 nM se resume en la tabla 32.

Línea celular	CE <sub>50</sub> DYN/A (nM)	CE <sub>50</sub> LHN/A (nM)	CE <sub>50</sub> NOC/A (nM)
SiMa Parental	100	100	5,4
Clon AGN P33-KOR 10	9,7	> 150	9,4
SiMa-KOR clon 16	10,6	> 100	1,6
SiMa-KOR clon 12	4,65	> 150	19,7

5 Se produjo un marcado aumento en la captación de Dyn/A en los clones KOR-1 transfectados tratados con Dyn/A mientras que las células SiMa parentales mostraron una captación mínima del compuesto (la captación era similar a la del control negativo LHN/A). Hay algo de Noc/A en todas las líneas celulares incluyendo células SiMa parentales. Esto no es sorprendente, dado que la captación de Noc/A en las células SiMa se observó durante el desarrollo del ensayo para este compuesto redirigido. Además, la captación de Noc/A es la mejor en la línea celular AGN P33 que se derivaba específicamente para esta endopeptidasa redirigida. La diferencia entre la captación de Noc/A y la captación del compuesto Dyn/A es mayor en las células clonales de SiMa-KOR clon 12 (SK12). En todos los gráficos, la actividad del control negativo, LHN/A, es mínima, mostrando que, en ausencia del dominio de unión, no hay ninguna captación específica en estas líneas celulares y la más baja eran en las células SK12 mostrando que la captación del compuesto Dyn/A es altamente específica. a partir de estos resultados, el clon de SK12 se seleccionó para caracterización y optimización futuras.

Se realizaron estudios de optimización con las células SK12 para desarrollar un análisis robusto, específico y sensible. Se ensayaron varios parámetros incluyendo los medios de siembra en placa y densidades de siembra en placa, los medios de tratamiento y el tiempo de tratamiento. En la tabla 33 se ofrece un resumen de los datos obtenidos durante la optimización.

Medio utilizado		Tiempo de tratamiento	Células/pocillo				
siembra	tratamiento		25000	50000	75000	100000	150000
completa	completo	6 h + o/n	51,3	76	13,4	9,2	n/a
completa	completo	16 h	21,3	19,0	4,96	4,64	n/a
completa	completo	16 h	n/a	n/a	n/a	2,1	15,3
libre de suero	libre de suero	16 h	n/a	n/a	n/a	9,0	12,1
completa	libre de suero	16 h	n/a	10,3	5,4	8,97	8,38
completa	completa	16 h	n/a	7,7	4,86	13,72	11,26
libre de suero	libre de suero	16 h	n/a	11,2	8,5	8,4	9,2

La tabla B demuestra que las células sembradas a 100.000 células por pocillo en CM y tratadas con los compuestos en CM mostraban mayor variabilidad en los valores de CE<sub>50</sub> de un experimento al siguiente (4,6; 1,2 y 13,72 nM) mientras que las células sembradas a 100.000 células por pocillo en SFM y tratadas con compuestos diluidos en SFM proporcionan las mejores curvas y valores de CE<sub>50</sub> consistentes (9,0 y 8,4 nM). En el futuro, las células se sembrarían a 100.000 células por pocillo en SFM y se tratarían con compuestos en SFM también.

SK12 sembrada en placas de PDL a 100.000 células por pocillo en SFM durante 24 horas, seguida por el tratamiento en SFM durante 16 horas produjo el menor valor de CE<sub>50</sub> de 8,4 +/- 1,1 nM y una relación señal a ruido de 12. Ambos de estos valores serían aceptables para la utilización futura de esta célula en CBPA.

*Caracterización de células SK12 con el ensayo de unión de saturación*

El ensayo de unión de saturación utilizado aquí se describe con detalle en el ejemplo V. Se realizaron estudios de

5 unión de saturación utilizando el antagonista de KOR-1 <sup>3</sup>H-diprenorfina para evaluar la unión. En varios experimentos se midieron la unión total, específica y no específica. Una curva de unión de saturación de <sup>3</sup>H-diprenorfina con el receptor se generó a partir de dos experimentos independientes. Parece que aproximadamente el 25% de la unión es inespecífica y el 75% es unión específica de la molécula al receptor. La afinidad de la molécula por el receptor es adecuada a 6,5 nM. La Bmax indica que hay 23 fmol de receptores KOR-1 por célula en las células SK12.

10 Las realizaciones específicas desveladas en el presente documento pueden verse limitadas adicionalmente en las reivindicaciones utilizando las expresiones constituida/o por o constituida/o esencialmente por. Cuando se utiliza en las reivindicaciones, ya sea tal como se presentaron o añadida como enmienda, la expresión de transición "constituida/o por" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en las reivindicaciones. La expresión de transición "constituida/o esencialmente por" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificadas y aquellos que no afectan materialmente a la o las características básicas y novedosas. Las realizaciones de la invención reivindicadas de este modo se describen y se habilitan inherente o expresamente y en el presente documento.

15 Además, se han hecho numerosas referencias a las patentes y publicaciones impresas en toda esta memoria descriptiva.

20 Para concluir, debe entenderse que las realizaciones de la invención desveladas en el presente documento son ilustrativas de los principios de la presente invención. Otras modificaciones que pueden emplearse están dentro del alcance de la invención, pero están limitadas por el alcance de las reivindicaciones. Así, a modo de ejemplo, pero no de limitación, configuraciones alternativas de la invención presente pueden utilizarse de acuerdo con las enseñanzas en el presente documento, pero están limitadas por el alcance de las reivindicaciones. Por consiguiente, la presente invención no está limitada a eso precisamente tal como se muestra y se describe, pero está limitada al alcance de las reivindicaciones.

#### Lista de secuencias

30 <110> Wang, Joanne  
Zhu, Hong  
Hodges, D. Dianne  
Fernández-Salas, Ester

35 <120> Ensayos de actividad de endopeptidasa redirigida basada en inmunología

<130> 18496 (BOT)

<150> Documento US 61/160.217

40 <151> 13-03-2009

<160> 153

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

45

<210> 1

<211> 903

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Endopeptidasa redirigida

<400> 1

ES 2 770 033 T3

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

ES 2 770 033 T3

	275						280					285			
Tyr	Tyr	Asn	Lys	Phe	Lys	Asp	Ile	Ala	Ser	Thr	Leu	Asn	Lys	Ala	Lys
	290					295					300				
Ser	Ile	Val	Gly	Thr	Thr	Ala	Ser	Leu	Gln	Tyr	Met	Lys	Asn	Val	Phe
305					310					315					320
Lys	Glu	Lys	Tyr	Leu	Leu	Ser	Glu	Asp	Thr	Ser	Gly	Lys	Phe	Ser	Val
				325					330					335	
Asp	Lys	Leu	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Lys	Met	Leu	Thr	Glu	Ile	Tyr
			340					345					350		
Thr	Glu	Asp	Asn	Phe	Val	Lys	Phe	Phe	Lys	Val	Leu	Asn	Arg	Lys	Thr
		355					360					365			
Tyr	Leu	Asn	Phe	Asp	Lys	Ala	Val	Phe	Lys	Ile	Asn	Ile	Val	Pro	Lys
	370					375					380				
Val	Asn	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Asp	Gly	Phe	Asn	Leu	Arg	Asn	Thr	Asn	Leu
385					390					395					400
Ala	Ala	Asn	Phe	Asn	Gly	Gln	Asn	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Met	Asn	Phe
				405					410					415	
Thr	Lys	Leu	Lys	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Phe	Glu	Phe	Tyr	Lys	Leu	Leu
			420				425						430		
Cys	Val	Asp	Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys	Ser	Asp	Asp	Asp	Asp
	435					440						445			
Lys	Phe	Gly	Gly	Phe	Thr	Gly	Ala	Arg	Lys	Ser	Ala	Arg	Lys	Arg	Lys
	450					455				460					
Asn	Gln	Ala	Leu	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
465					470					475					480
Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Gln	Cys	Ile	Lys	Val	Asn	Asn	Trp
			485						490					495	
Asp	Leu	Phe	Phe	Ser	Pro	Ser	Glu	Asp	Asn	Phe	Thr	Asn	Asp	Leu	Asn
			500				505						510		
Lys	Gly	Glu	Glu	Ile	Thr	Ser	Asp	Thr	Asn	Ile	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu
	515						520					525			
Asn	Ile	Ser	Leu	Asp	Leu	Ile	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asn	Phe
	530					535					540				
Asp	Asn	Glu	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Ile	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile
545					550					555					560
Ile	Gly	Gln	Leu	Glu	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Glu	Arg	Phe	Pro	Asn	Gly
				565					570					575	
Lys	Lys	Tyr	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Thr	Met	Phe	His	Tyr	Leu	Arg	Ala
			580					585					590		
Gln	Glu	Phe	Glu	His	Gly	Lys	Ser	Arg	Ile	Ala	Leu	Thr	Asn	Ser	Val
		595					600						605		
Asn	Glu	Ala	Leu	Leu	Asn	Pro	Ser	Arg	Val	Tyr	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser
	610				615					620					
Asp	Tyr	Val	Lys	Lys	Val	Asn	Lys	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Met	Phe	Leu
625					630					635					640
Gly	Trp	Val	Glu	Gln	Leu	Val	Tyr	Asp	Phe	Thr	Asp	Glu	Thr	Ser	Glu
			645						650					655	
Val	Ser	Thr	Thr	Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Thr	Ile	Ile	Ile	Pro	Tyr
			660					665						670	
Ile	Gly	Pro	Ala	Leu	Asn	Ile	Gly	Asn	Met	Leu	Tyr	Lys	Asp	Asp	Phe
	675						680					685			
Val	Gly	Ala	Leu	Ile	Phe	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Ile
	690					695					700				
Pro	Glu	Ile	Ala	Ile	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Tyr
705					710					715					720
Ile	Ala	Asn	Lys	Val	Leu	Thr	Val	Gln	Thr	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu	Ser
			725						730					735	
Lys	Arg	Asn	Glu	Lys	Trp	Asp	Glu	Val	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Val	Thr	Asn
			740				745						750		
Trp	Leu	Ala	Lys	Val	Asn	Thr	Gln	Ile	Asp	Leu	Ile	Arg	Lys	Lys	Met
	755						760					765			
Lys	Glu	Ala	Leu	Glu	Asn	Gln	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Ile	Ile	Asn
	770					775						780			

ES 2 770 033 T3

Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe  
 785 790 795 800  
 Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala  
 805 810 815  
 Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu  
 820 825 830  
 Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp  
 835 840 845  
 Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly  
 850 855 860  
 Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr  
 865 870 875 880  
 Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln  
 885 890 895  
 Arg Leu Leu Ser Thr Leu Asp  
 900

<210> 2  
 <211> 908  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Endopeptidasa redirigida

10 <400> 2  
 Met Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro  
 1 5 10 15  
 Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln  
 20 25 30  
 Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile  
 35 40 45  
 Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro  
 50 55 60  
 Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys  
 85 90 95  
 Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr  
 100 105 110  
 Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr  
 115 120 125  
 Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp  
 130 135 140  
 Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser  
 145 150 155 160  
 Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu  
 165 170 175  
 Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser  
 180 185 190  
 Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn  
 195 200 205  
 Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu  
 210 215 220  
 Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile  
 225 230 235 240  
 Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met  
 245 250 255  
 Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His  
 260 265 270  
 Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr  
 275 280 285

ES 2 770 033 T3

Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys  
 290 295 300  
 Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Tyr Met Lys Asn Val Phe  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val  
 325 330 335  
 Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr  
 340 345 350  
 Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr  
 355 360 365  
 Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys  
 370 375 380  
 Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu  
 385 390 395 400  
 Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe  
 405 410 415  
 Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu  
 420 425 430  
 Cys Val Asp Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Asp Asp Asp Asp  
 435 440 445  
 Lys Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Ile Arg Pro Lys Leu Lys Trp Asp  
 450 455 460  
 Asn Gln Ala Leu Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 465 470 475 480  
 Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp  
 485 490 495  
 Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn  
 500 505 510  
 Lys Gly Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu  
 515 520 525  
 Asn Ile Ser Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe  
 530 535 540  
 Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile  
 545 550 555 560  
 Ile Gly Gln Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly  
 565 570 575  
 Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala  
 580 585 590  
 Gln Glu Phe Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val  
 595 600 605  
 Asn Glu Ala Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser  
 610 615 620  
 Asp Tyr Val Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu  
 625 630 635 640  
 Gly Trp Val Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu  
 645 650 655  
 Val Ser Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr  
 660 665 670  
 Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe  
 675 680 685  
 Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile  
 690 695 700  
 Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr  
 705 710 715 720  
 Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser  
 725 730 735  
 Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn  
 740 745 750  
 Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met  
 755 760 765  
 Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn  
 770 775 780  
 Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe



ES 2 770 033 T3

```

785          790          795          800
Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala
      805          810          815
Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu
      820          825          830
Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp
      835          840          845
Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly
      850          855          860
Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr
      865          870          875          880
Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln
      885          890          895
Arg Leu Leu Ser Thr Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
      900          905

```

<210> 3  
 <211> 906  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Endopeptidasa redirigida

10

```

<400> 3
Ile Ser Glu Phe Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr
 1          5          10          15
Lys Asp Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn
      20          25          30
Ala Gly Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile
      35          40          45
Trp Val Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp
      50          55          60
Leu Asn Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp
      65          70          75          80
Ser Thr Tyr Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly
      85          90          95
Val Thr Lys Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met
      100          105          110
Leu Leu Thr Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr
      115          120          125
Ile Asp Thr Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile
      130          135          140
Gln Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile
      145          150          155          160
Gly Pro Ser Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His
      165          170          175
Glu Val Leu Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile
      180          185          190
Arg Phe Ser Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val
      195          200          205
Asp Thr Asn Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala
      210          215          220
Val Thr Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly
      225          230          235          240
Ile Ala Ile Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr
      245          250          255
Tyr Glu Met Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe
      260          265          270
Gly Gly His Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe
      275          280          285
Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn

```

290 Lys Ala Lys Ser Ile Val 305 Asn Val Phe Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys 325 Phe Ser Val Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr 340 Glu Ile Tyr Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn 355 Arg Lys Thr Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile 370 Val Pro Lys Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn 385 Thr Asn Leu Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn 405 Met Asn Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr 420 Lys Leu Leu Cys Val Asp Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu 435 Ile Glu Gly Arg Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn 450 Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp 465 Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala 485 Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe 500 Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser 515 Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro 530 Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu 545 Arg Ala Gln Glu Phe Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn 565 Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe 580 Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met 595 Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr 610 Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile 625 Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp 645 Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu 660 Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val 675 Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala 690 Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val 705 Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys 725 Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile 740 Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile 755 Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn 770 Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser 785	295 Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys 310 Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys 330 Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr 345 Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn 360 Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile 375 Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn 390 Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn 410 Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr 425 Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu 440 Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn 455 Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp 470 Phe Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala 485 Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe 505 Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser 520 Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro 535 Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu 550 His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn 570 Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe 585 Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met 600 Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr 615 Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile 630 Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp 650 Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu 665 Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val 680 Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala 700 Tyr Lys Tyr Lys Tyr Ile Val 715 Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys 730 Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile 745 Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile 760 Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn 775 Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser 790 795 800
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ES 2 770 033 T3

Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp  
 805 810 815  
 Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn  
 820 825 830  
 Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn  
 835 840 845  
 Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp  
 850 855 860  
 Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr Leu Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 865 870 875 880  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Val Gly Arg Pro Glu  
 885 890 895  
 Trp Trp Met Asp Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly  
 900 905

<210> 4  
 <211> 919  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Endopeptidasa redirigida

<400> 4  
 Met Glu 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 Glu  
 50 55 60  
 Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu  
 85 90 95  
 Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val  
 100 105 110  
 Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys  
 115 120 125  
 Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr  
 130 135 140  
 Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile  
 145 150 155 160  
 Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr  
 165 170 175  
 Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe  
 180 185 190  
 Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu  
 195 200 205  
 Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu  
 210 215 220  
 Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn  
 225 230 235 240  
 Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu  
 245 250 255  
 Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys  
 260 265 270  
 Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn  
 275 280 285  
 Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val  
 290 295 300

ES 2 770 033 T3

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys  
 305 310 315 320  
 Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu  
 325 330 335  
 Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp  
 340 345 350  
 Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn  
 355 360 365  
 Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr  
 370 375 380  
 Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn  
 385 390 395 400  
 Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu  
 405 410 415  
 Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Asp  
 420 425 430  
 Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Asp Asp Asp Lys Tyr Gly  
 435 440 445  
 Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr Leu Phe  
 450 455 460  
 Lys Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu Ala Leu Ala  
 465 470 475 480  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala  
 485 490 495  
 Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser  
 500 505 510  
 Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile  
 515 520 525  
 Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp  
 530 535 540  
 Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu  
 545 550 555 560  
 Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu  
 565 570 575  
 Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu  
 580 585 590  
 Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His  
 595 600 605  
 Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu  
 610 615 620  
 Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys  
 625 630 635 640  
 Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln  
 645 650 655  
 Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp  
 660 665 670  
 Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu  
 675 680 685  
 Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile  
 690 695 700  
 Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile  
 705 710 715 720  
 Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val  
 725 730 735  
 Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys  
 740 745 750  
 Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val  
 755 760 765  
 Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu  
 770 775 780  
 Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln  
 785 790 795 800  
 Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu

ES 2 770 033 T3

				805					810					815			
Ser	Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Ile	Asn	Lys	Ala	Met	Ile	Asn	Ile	Asn		
			820					825					830				
Lys	Phe	Leu	Asn	Gln	Cys	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu	Met	Asn	Ser	Met	Ile		
		835					840					845					
Pro	Tyr	Gly	Val	Lys	Arg	Leu	Glu	Asp	Phe	Asp	Ala	Ser	Leu	Lys	Asp		
		850		855						860							
Ala	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Asn	Arg	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly	Gln		
865				870						875					880		
Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Asp	Lys	Val	Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Thr	Asp	Ile		
				885					890					895			
Pro	Phe	Gln	Leu	Ser	Lys	Tyr	Val	Asp	Asn	Gln	Arg	Leu	Leu	Ser	Thr		
		900						905					910				
Leu	Glu	Ala	Leu	Ala	Ser	Gly											
		915															

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

5

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

10

15

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					

ES 2 770 033 T3

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  
 <213> *Macaca mulatta*

5

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

15

<400> 8  
 Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg

ES 2 770 033 T3

```

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> 9  
 <211> 206  
 5 <212> PRT  
 <213> *Rattus norvegicus*

```

<400> 9
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

```

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

15 <400> 10

ES 2 770 033 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  
 5 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*

<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  
 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  
 10 <213> *Carassius auratus*

<400> 12



ES 2 770 033 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  
 5 <212> PRT  
 <213> *Carassius auratus*

<400> 13  
 Met Ala Asp Glu Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Thr 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> 14  
 <211> 204  
 <212> PRT  
 15 <213> *Danio rerio*

<400> 14

ES 2 770 033 T3

Met Ala Glu Asp Ser Asp Met Arg Asn Glu Leu Ala 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 Ala 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> 15  
 <211> 203  
 5 <212> PRT  
 <213> *Danio rerio*

<400> 15  
 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

10 <210> 16  
 <211> 210  
 <212> PRT  
 15 <213> *Torpedo marmorata*

<400> 16

ES 2 770 033 T3

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  
 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

10

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

15

<400> 18

ES 2 770 033 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

<210> 19

<211> 212

5 <212> PRT

<213> *Strongylocentrotus purpuratus*

<400> 19

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

10

<210> 20

<211> 212

<212> PRT

15 <213> *Drosophila melanogaster*

<400> 20

ES 2 770 033 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  
 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 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

<210> 22  
 <211> 212  
 <212> PRT  
 <213> *Loligo pealei*

10

15

<400> 22

ES 2 770 033 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  
 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

10

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

15

<400> 24

ES 2 770 033 T3

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

5 <211> 370

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

ES 2 770 033 T3

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

<210> 26  
 5 <211> 365  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 26



ES 2 770 033 T3

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

<210> 27  
 <211> 372  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

ES 2 770 033 T3

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

<210> 28

<211> 372

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 28

Met Glu Pro Ala Pro Ser Ala Gly Ala Glu Leu Gln Pro Pro Leu Phe

ES 2 770 033 T3

```

1           5           10           15
Ala Asn Ala Ser Asp Ala Tyr Pro Ser Ala Phe Pro Ser Ala Gly Ala
20
Asn Ala Ser Gly Pro Pro Gly Ala Arg Ser Ala Ser Ser Leu Ala Leu
35
Ala Ile Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ser Ala Val Cys Ala Val Gly Leu
50
Leu Gly Asn Val Leu Val Met Phe Gly Ile Val Arg Tyr Thr Lys Met
65
Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala
85
Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Ala Lys Tyr Leu Met Glu
100
Thr Trp Pro Phe Gly Glu Leu Leu Cys Lys Ala Val Leu Ser Ile Asp
115
Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val
130
Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg
145
Thr Pro Ala Lys Ala Lys Leu Ile Asn Ile Cys Ile Trp Val Leu Ala
165
Ser Gly Val Gly Val Pro Ile Met Val Met Ala Val Thr Arg Pro Arg
180
Asp Gly Ala Val Val Cys Met Leu Gln Phe Pro Ser Pro Ser Trp Tyr
195
Trp Asp Thr Val Thr Lys Ile Cys Val Phe Leu Phe Ala Phe Val Val
210
Pro Ile Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Leu Leu Arg Leu
225
Arg Ser Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg Ser Leu
245
Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Val Gly Ala Phe Val Val
260
Cys Trp Ala Pro Ile His Ile Phe Val Ile Val Trp Thr Leu Val Asp
275
Ile Asp Arg Arg Asp Pro Leu Val Val Ala Ala Leu His Leu Cys Ile
290
Ala Leu Gly Tyr Ala Asn Ser Ser Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe
305
Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Gln Leu Cys Arg Lys Pro
325
Cys Gly Arg Pro Asp Pro Ser Ser Phe Ser Arg Ala Arg Glu Ala Thr
340
Ala Arg Glu Arg Val Thr Ala Cys Thr Pro Ser Asp Gly Pro Gly Gly
355
Gly Ala Ala Ala
370

```

<210> 29

<211> 380

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

```

Met Asp Ser Pro Ile Gln Ile Phe Arg Gly Glu Pro Gly Pro Thr Cys
1           5           10           15
Ala Pro Ser Ala Cys Leu Pro Pro Asn Ser Ser Ala Trp Phe Pro Gly
20
Trp Ala Glu Pro Asp Ser Asn Gly Ser Ala Gly Ser Glu Asp Ala Gln
35
Leu Glu Pro Ala His Ile Ser Pro Ala Ile Pro Val Ile Ile Thr Ala
50

```

ES 2 770 033 T3

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

<210> 30

<211> 380

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

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

ES 2 770 033 T3

```

115          120          125
Val Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr
130          135          140
Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val
145          150          155          160
Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Leu Lys Ala Lys
165          170          175
Ile Ile Asn Ile Cys Ile Trp Leu Leu Ser Ser Ser Val Gly Ile Ser
180          185          190
Ala Ile Val Leu Gly Gly Thr Lys Val Arg Glu Asp Val Asp Val Ile
195          200          205
Glu Cys Ser Leu Gln Phe Pro Asp Asp Asp Tyr Ser Trp Trp Asp Leu
210          215          220
Phe Met Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe Val Ile Pro Val Leu
225          230          235          240
Ile Ile Ile Val Cys Tyr Thr Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val
245          250          255
Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile
260          265          270
Thr Arg Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe Val Val Cys Trp Thr
275          280          285
Pro Ile His Ile Phe Ile Leu Val Glu Ala Leu Gly Ser Thr Ser His
290          295          300
Ser Thr Ala Ala Leu Ser Ser Tyr Tyr Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr
305          310          315          320
Thr Asn Ser Ser Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn
325          330          335
Phe Lys Arg Cys Phe Arg Asp Phe Cys Phe Pro Leu Lys Met Arg Met
340          345          350
Glu Arg Gln Ser Thr Ser Arg Val Arg Asn Thr Val Gln Asp Pro Ala
355          360          365
Tyr Leu Arg Asp Ile Asp Gly Met Asn Lys Pro Val
370          375          380

```

<210> 31

<211> 493

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

```

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

```

ES 2 770 033 T3

Gly Leu Phe Gly Asn Phe Leu Val Met Tyr Val Ile Val Arg Tyr Thr  
 180 185 190  
 Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala  
 195 200 205  
 Asp Ala Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Val Asn Tyr Leu  
 210 215 220  
 Met Gly Thr Trp Pro Phe Gly Thr Ile Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser  
 225 230 235 240  
 Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Cys Thr Met  
 245 250 255  
 Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp  
 260 265 270  
 Phe Arg Thr Pro Arg Asn Ala Lys Ile Ile Asn Val Cys Asn Trp Ile  
 275 280 285  
 Leu Ser Ser Ala Ile Gly Leu Pro Val Met Phe Met Ala Thr Thr Lys  
 290 295 300  
 Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Asp Cys Thr Leu Thr Phe Ser His Pro Thr  
 305 310 315 320  
 Trp Tyr Trp Glu Asn Leu Leu Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe  
 325 330 335  
 Ile Met Pro Val Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Ile Leu  
 340 345 350  
 Arg Leu Lys Ser Val Arg Met Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg  
 355 360 365  
 Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Val Ala Val Phe  
 370 375 380  
 Ile Val Cys Trp Thr Pro Ile His Ile Tyr Val Ile Ile Lys Ala Leu  
 385 390 395 400  
 Val Thr Ile Pro Glu Thr Thr Phe Gln Thr Val Ser Trp His Phe Cys  
 405 410 415  
 Ile Ala Leu Gly Tyr Thr Asn Ser Cys Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala  
 420 425 430  
 Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Glu Phe Cys Ile Pro  
 435 440 445  
 Thr Ser Ser Asn Ile Glu Gln Gln Asn Ser Thr Arg Ile Arg Gln Asn  
 450 455 460  
 Thr Arg Asp His Pro Ser Thr Ala Asn Thr Val Asp Arg Thr Asn His  
 465 470 475 480  
 Gln Leu Glu Asn Leu Glu Ala Glu Thr Ala Pro Leu Pro  
 485 490

<210> 32  
 <211> 5  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> Antígeno SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo libre en el P1

<400> 32  
 Asp Glu Ala Asn Gln  
 1 5

<210> 33  
 15 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 33  
 Ile Asp Glu Ala Asn Gln  
 1 5

<210> 34  
 25 <211> 7  
 <212> PRT

ES 2 770 033 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Antígeno SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A

<400> 34  
**Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln**  
 1 5

10 <210> 35  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>

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

<400> 35  
**Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln**  
 20 1 5

<210> 36  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>

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

30 <400> 36  
**Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln**  
 1 5

<210> 37  
 35 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Antígeno SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo libre en el P1

<400> 37  
**Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln**  
 1 5 10

45 <210> 38  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>

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

<400> 38  
**Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln**  
 55 1 5 10

<210> 39  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

ES 2 770 033 T3

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

<400> 39  
**Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln**  
5        1                                5                                10

<210> 40  
<211> 13  
<212> PRT  
10 <213> Secuencia artificial

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

15 <221> SITIO  
<222> (13)...(13)  
<223> glutamina carboxilada

20 <400> 40  
**Cys Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln**  
          1                                5                                10

<210> 41  
<211> 7  
25 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Antígeno SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo libre en el P1

30 <400> 41  
**Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys**  
          1                                5

<210> 42  
35 <211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> Antígeno SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A

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

45 <210> 43  
<211> 9  
<212> PRT  
50 <213> Secuencia artificial

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

55 <400> 43  
**Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys**  
          1                                5

<210> 44  
60 <211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial



<220>  
 <223> Antígeno SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A  
 5  
 <400> 44  
**Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys**  
 1 5 10  
 <210> 45  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Antígeno SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A  
 15  
 <400> 45  
**Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys**  
 1 5 10  
 20  
 <210> 46  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Antígeno SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A  
 30  
 <400> 46  
**Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys**  
 1 5 10  
 <210> 47  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Antígeno SNAP-25 que tiene un carboxilo terminal carboxilado libre en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A  
 40  
 <221> SITIO  
 <222> (13)...(13)  
 <223> Lisina carboxilada  
 45  
 <400> 47  
**Cys Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys**  
 1 5 10  
 <210> 48  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Antígeno SNAP-25  
 55  
 <400> 48  
**Cys Gly Gly Gly Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln**  
 1 5 10  
 60  
 <210> 49  
 <211> 11  
 <212> PRT

ES 2 770 033 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Antígeno SNAP-25

5

<400> 49  
 Cys Gly Gly Gly Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys  
 1 5 10

<210> 50

10 <211> 88  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> BirA-HisTag?-SNAP-25-134-197

<400> 50  
 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

20 <210> 51  
 <211> 97  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> BirA-HisTag?-SNAP-25-134-206

<400> 51  
 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

30 <210> 52  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Péptido BirA

<400> 52  
 Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His  
 1 5 10 15

40 <210> 53  
 <211> 7570

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC.

<400> 53

```

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggctcgt gagtagtgcg 120
cgagcaaaa ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcctg gccattgcat acgttgatc 240
catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300
gattattgac tagtatttaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 360
tggagtcccg cgttacataa cttacggtaa atggcccggc tggctgaccg cccaacgacc 420
cccgccatt gagctcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 480
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 540
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600
atgccagta catgacctta tgggactttc ctactggca gtacatctac gtattagtca 660
tcgctattac catggtgatg cggttttgyc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggttt 720
actcacgggg attccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagttt ttttggcacc 780
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatggcg 840
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg 900
cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc 960
tccgcgggcc accatggagg gcccggttac cggtagcggg tccagatata tgggcggccg 1020
ctcagcaagc ttcgcgaatt cgggagcgg aggtggagct agcaaaggag aagaactctt 1080
cactggagtt gtccaattc ttgttgaatt agatggtgat gttaacggcc acaagtctc 1140
tgtcagtgga gaggtgaag gtgatgcaac atacggaaa cttaccctga agttcatctg 1200
cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtgt 1260
tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gactttttca agagtgccat 1320
gcccgaaggt tatgtacagg aaaggacct cttcttcaaa gatgacggca actacaagac 1380
acgtgctgaa gtcaagtttg aaggtgatac cttgttaat agaatcgagt taaaaggtat 1440
tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact ataactcaca 1500
caatgtatac atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagacccg 1560
ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagacct tatcaacaaa atactccaat 1620
tggcgtggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaat ctgccctttc 1680
gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gagtttghta cagctgctgg 1740
gattacacat ggcatggatg aactgtacaa catcgatgga gccggagggtg gaccttttgt 1800
taataaaca ttaattata aagatcctgt aaatggtgtt gatattgctt atataaaaa 1860
tccaaatgca ggacaaatc aaccagtaa agcttttaaa atcataata aaatatgggt 1920
tattccagaa agagatatac ttacaaatcc tgaagaagga gatttaaatc caccaccaga 1980
agcaaaaaca gttccagttt catattatga ttcaacatat ttaagtacag ataataaaaa 2040
agataattat ttaaaggagg ttacaaaatt atttgagaga atttattcaa ctgatcttgg 2100
aagaatggtg ttaacatcaa tagtaagggg aataccattt tggggtggaa gtacaataga 2160
tacagaatta aaagttattg atactaattg tattaatgtg atacaaccag atggtagtta 2220
tagatcagaa gaacttaatc tagtaataatc aggaccctca gctgatatta tacagtttga 2280
atgtaaaagc tttggacatg aagttttgaa tcttacgoga aatggttatg gctctactca 2340
atacattaga tttagcccag attttacatt tggttttgag gactcacttg aagttgatac 2400
aaatcctctt ttagggtcag gcaaatgtg tacagatcca gcagtaacat tagcacatga 2460
acttatacat gctggacata gattatatgg aatagcaatt aatccaaata gggtttttaa 2520
agtaaatact aatgcctatt atgaaatgag tgggttagaa gtaagctttg aggaacttag 2580
aacatttggg ggacatgatg caaagtttat agatagttaa caggaaaacg aatttcgtct 2640
atattattat aataagttta aagatatagc aagtacactt aataaagcta aatcaatagt 2700
aggtactact gcttcattac agtatatgaa aaatgtttt aaagagaaat atctcctatc 2760
tgaagataca tctggaaaaat tttcggtaga taaattaaaa tttgataagt tataaaaaat 2820
gttaacagag atttacacag aggataatth tgttaagttt tttaaagtac ttaacagaaa 2880
aacatatttg aattttgata aagccgtatt taagataaat atagtaccta aggtaaatga 2940
cacaatatat gatggattta atttaagaaa tacaatttta gcagcaact ttaatggtca 3000
aaatacagaa attaataata tgaattttac taaactaaaa aattttactg gattgtttga 3060
atthttatag ttgtatgtg taagaggat aatcacttcg aaatgaacgc gttggcccta 3120
ttctatagtg tcacctaaat gctagagctc gctgatcagc ctcgactgtg ccttctagtt 3180
gccagccatc tgttgtttgc ccctcccgcg tgccttctct gaccctggaa ggtgccactc 3240
ccactgtcct ttcctaataa aatgagggaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt 3300
ctattctggg ggtgggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca 3360
ggcatgctgg ggtgcccgtg ggtctatgg cttctgaggc ggaaagaacc agctggggct 3420
ctagggggtg tccccacgcg cctgttagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta 3480
    
```

ES 2 770 033 T3

cgcgacgct gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc gctttcttcc 3540  
cttcctttct cgccacgctt gccggctttc ccctgcaagc tctaatacgg ggcatccctt 3600  
tagggttccg attttagtgc ttacggcacc tcgaccccaa aaaaacttgat tagggtagt 3660  
gttcacgtag tgggcatcg ccctgataga cggtttttcg ccttttgacg ttggagtcca 3720  
cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggctc 3780  
attcttttga tttataaggg attttgggga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 3840  
tttaacaaaa atttaacgcg aattaattct gtggaatgtg tgtcagttag ggtgtggaaa 3900  
gtcccagggc tcccagggca ggcagaagta tgcaagcat gcattcaat tagtcagcaa 3960  
ccaggtgtgg aaagtccccca ggctcccag caggcagaag tatgcaaac atgcatctca 4020  
attagtcagc aaccatagtc ccgccccta ctccgcccata cccgccccta actccgccc 4080  
gttcgcccata ttctccgccc catggctgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg 4140  
ccgctctgct ctctgagcta tccagaagt agtgaggagg ctttttttga ggctaggct 4200  
tttgcaaaaa gctcccggga gcttgtatat ceatttttcg atctgatcaa gagacaggat 4260  
gaggatcggt tcgcatgatt gaacaagatg gattgacgc aggttctccg gccgcttggg 4320  
tggagaggct attcggtat gactgggac aacagacaat cggctgctct gatgccggc 4380  
tgttcgggct gtcagcgcg gggcggcgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccgggtg 4440  
ccctgaatga actgacggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcttc 4500  
cttgccgacg tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg 4560  
aagtgcgggg gcaggatctc ctgtcatctc acctgtctcc tgcggagaaa gtatccatca 4620  
tgggtgagct ctgcaggcgg ctgcatacgc ttgatccggg tacttgccca ttcgaccacc 4680  
aagcgaaaaa tcgcatcgag cagcagcgtc ctggatgga agccggctct gtcatcagg 4740  
atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgcagccga actgttcgcc aggtcaagg 4800  
cgcgcatgcc cgacggcggg gatctcgtcg tgaccatgg cgtgcctgc ttccgaata 4860  
tcattggtga aatggcggc tttctggat tcactgactg tggccggctg ggtgtggcgg 4920  
accgctatca ggacatagcg ttggctacc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat 4980  
gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta tcgcccctcc cgattcgag cgcatcgct 5040  
tctatcgctt tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca 5100  
agcgaccgcc aacctgccat cagcagattt cgattccacc gccgccttct atgaaagggt 5160  
gggcttcgga atcgttttcc gggacggcgg ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat 5220  
gctggagttc ttccgccacc ccaactgtgt tattgcagct tataatggtt acaataaag 5280  
caatagcatc acaatttca caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtgggtt 5340  
gtccaaactc atcaatgtat ctatcatgt ctgtataccg tcgacctca gctagagctt 5400  
ggcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 5460  
caacatagca gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaagtag tgagctaact 5520  
cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaacactgt cgtgccagct 5580  
gcattaatga atcggccaac agcgggggag agcgggtttg cgtattgggc gctcttccgc 5640  
ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 5700  
ctcaaaaggc gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 5760  
agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaacgg taaaaaggcc gcgttgcctg cgtttttcca 5820  
taggtccgct ccccctgacg agcatcacia aatcgacgc tcaagtcaag ggtggcga 5880  
cccagacgga ctataaagat accagcgctt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 5940  
tgttcgacc ctgcccgtta cgggatacct gtccgctttt ctcccttcg gaagcgtggc 6000  
gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct 6060  
gggctgtgtg atcgaacccc cgttcagcc cgaccgctcg gccttatccg gtaactatcg 6120  
tcttgagtcc aaccgggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 6180  
gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg gccctaacta 6240  
cggctacact agaagagacg tattttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcg 6300  
aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaacacc gctggtagcg gtggtttttt 6360  
tgtttgcaag cagcagatta gcgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 6420  
ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatg 6480  
attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aatgaagt ttaaatcaat 6540  
ctaaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttacca tgcttaatca gtgaggcacc 6600  
tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tctgttagat 6660  
aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct gcaatgatac cgcgagacc 6720  
acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 6780  
aagtgtcct gcaactttat ccgctccat ccagctatt aattggtgcc ggaagctag 6840  
agtaagttag tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt 6900  
ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggctt attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 6960  
agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 7020  
tgtcagaagt aagttggcgg cagtgtatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc 7080  
tcttactgtc atgcccctcg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 7140  
attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtaa tacgggataa 7200  
taccgcccga catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaacactt cttcggggcg 7260  
aaaaactctca agatctttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc 7320  
caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtagcaaa aaacaggaag 7380  
gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 7440  
cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 7500  
tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgccc acatttcccc gaaaagtgcc 7560  
acctgacgtc 7570

<210> 54  
<211> 682  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

ES 2 770 033 T3

<220>

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

<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	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		
5	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
          645              650              655
Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu
          660              665              670
Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys
          675              680

```

<210> 55  
 <211> 6259  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

10 <400> 55  
 gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60  
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120  
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcc tgcaggcctg gccattgcat acgttgatc 240  
 catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300  
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 360  
 tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 420  
 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgcccaata gggactttcc 480  
 attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca ctgggcagta catcaagtgt 540  
 atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600  
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca 660

ES 2 770 033 T3

tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 720  
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 780  
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatgggcy 840  
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg 900  
cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgtaccagcc 960  
tccgcggggc accatggagg gcccggttac cggtagccgga tccagatate tgggcggccg 1020  
ctcagcaagc ttcgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag aagaactctt 1080  
cactggagtt gtcccattc ttgttgaatt agatggtgat gttaacggcc acaagtcttc 1140  
tgtcagtggg gagggtgaag gtgatgcaac atacggaaaa cttaccctga agttcatctg 1200  
cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtgt 1260  
tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gactttttca agagtgccat 1320  
gcccgaaggt tatgtacagg aaaggacccat ctcttcaaa gatgacggca actacaagac 1380  
acgtgctgaa gtcaagtttg aaggtgatac cettgttaat agaatcgagt taaaaggat 1440  
tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact ataactcaca 1500  
caatgtatac atcatggcag acaaaacaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagaccgg 1560  
ccacaacatt gaagatggga cggttcaact agcagaccat tatcaacaaa atactccaat 1620  
tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaaat ctgccctttc 1680  
gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gaggttttaa cagctgctgg 1740  
gattacacat ggcatggatg aactgtacaa catcgatgga gccggagggtg gatgaaccgc 1800  
ttggccctat tctatagttg cacctaaatg ctagagctcg ctgatcagcc tccactgtgc 1860  
cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctccccctg gccttccttg accctggaag 1920  
gtgccaactc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcacgcat tgtctgagta 1980  
ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtgg ggcaggacag caagggggag gattgggaa 2040  
acaatagcag gcatgctggg gatgcggtgg gctctatggc tctgaggcg gaaagaacca 2100  
gctggggctc tagggggtat ccccacgcgc cctgtagcgg ccattaaagc gcggcgggtg 2160  
tggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgcgc gctcctttcg 2220  
ctttcttccc ttcctttctc gccacgttgc ccggctttcc ccgtcaagct ctaaatcggg 2280  
gcaccccttt aggttccga tttagtctt tacggcacct cgaccctaaa aaacttgatt 2340  
aggggtgatg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt 2400  
tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggacaaca ctaacccta 2460  
tctcggctca ttcttttgat ttataaggga ttttggggat ttcggcctat tggttaaaaa 2520  
atgagctgat ttaacaaaaa ttaaacgcga attaattctg tggaatgtgt gtcagttagg 2580  
gtgtggaag tccccaggct ccccaggcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 2640  
agtcagcaac cagggtgaga aagtcaccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 2700  
tgcatctcaa ttagtcagca accatagtc cccccctaac tccgcccata ccccccctaa 2760  
ctccgccctt tcccgccca atggctgact aatttttttt atttatgcag 2820  
agggcgaggc cgcctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 2880  
gcctaggcct ttgcaaaaag ctcccgggag ctgtatatac cattttcgga tctgatcaag 2940  
agacaggatg aggatcgttt cgcgatgattg aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 3000  
ccgcttgggt ggagaggctg tccggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 3060  
atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgccgggt tctttttgtc aagaccgacc 3120  
tgtccgggtg cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 3180  
cgggcggttc ttgcccagct gtgctcagc ttgtcactga agcgggaaag gactggctgc 3240  
tattggcgga agtgcggggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccagaaaag 3300  
tatccatcat ggctgatgca atgcccggcg tgcatacgtg tgatccggct acctgcccata 3360  
tcgaccacca agcgaaacat cgcacagcag gacacagctac tccgatggaa gccggtcttg 3420  
tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca 3480  
ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc gatgctgct 3540  
tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgaactgt gccggctgg 3600  
gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccog tgatattgct gaagagcttg 3660  
gcccgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat ccccgctccc gattcgcagc 3720  
gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat 3780  
gaccgaccaa gcgacgccc acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta 3840  
tgaaaggttg ggcttcggaa tggttttccg ggacgcgggc tggatgatcc tccagcggcg 3900  
ggatctcatg ctggagttct tcgcccaccc caacttgttt attgcagctt ataatggtta 3960  
caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag 4020  
ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tgtataccgt cgacctctag 4080  
ctagagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaattgtt atccgctcac 4140  
aattccacac aacatacagc ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaataagt 4200  
gagctaaact acattaattg cgttgcgctc actgccgct ttcagtcgg gaaacctgtc 4260  
gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga gccggtttgc gtattgggcy 4320  
ctctccgctc tctcgcctca ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc gccgagcgg 4380  
atcagctcac tcaaaaggcg taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 4440

ES 2 770 033 T3

```

gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc 4500
gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag 4560
gtggcgaaac cggacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctcccctcg 4620
gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg 4680
aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg 4740
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg 4800
taactatcgt cttgagtcga acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac 4860
tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggt 4920
gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt 4980
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg 5040
tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 5100
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt 5160
ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctatagtcctt ttaaattaaa aatgaagttt 5220
taaatacaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 5280
tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcggtcatcc atagttgcct gactccccgt 5340
cgtgtagata actacgatac gggagggtct accatctggc cccagtgtg caatgatacc 5400
gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 5460
cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgcg 5520
ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtt ccattgctac 5580
aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 5640
atcaaggcga gttacatgat cccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtc 5700
tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact 5760
gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 5820
aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat 5880
acgggataat accgcgcac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 5940
ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 6000
tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 6060
aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact 6120
catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 6180
atacatattht gaatgtattht agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 6240
aaaagtgcga cctgacgtc 6259

```

<210> 56

- 5 <211> 245
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

- 10 <223> Secuencia de aminoácidos de GFP.

<400> 56

```

Ala Ser Lys Gly 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 2 770 033 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  
 245

- <210> 57
- <211> 4
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Espaciador flexible de espaciador G
- 10 <400> 57
- Gly Gly Gly Gly
- 1
  
- <210> 58
- <211> 5
- 15 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Espaciador flexible de espaciador G
- 20 <400> 58
- Gly Gly Gly Gly Ser
- 1 5
  
- <210> 59
- <211> 4
- 25 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Espaciador flexible de espaciador A
- 30 <400> 59
- Ala Ala Ala Ala
- 1
  
- <210> 60
- <211> 5
- 35 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Espaciador flexible de espaciador A
- 40 <400> 60
- Ala Ala Ala Ala Val
- 45 1 5
  
- <210> 61
  
- <211> 3359
- 50 <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
  
- <400> 61

ES 2 770 033 T3

gtcagagtg tcatagtgga gccctggctc ccgggaggac ggagccgcac ggtagtagat 60  
 ggggggtgtg cctgtgcccc cgactctgct cggcggggcc gttcctgctt tgccatccgt 120  
 gtgggacttc caccagacgtg gaggcacgag agctgggccc catatgctgc ttgccacgt 180  
 tgggaaagag gaggctgctg caaaggaccg atcggcggct tcgggctgcc ggctcactcg 240  
 gctgctgctg ctggtctggc gtctgctgag aagatcctct tctaccctgc tctgcacctg 300  
 tgctcgactg ccagccggct gagggcgggg gtctccacgg tgggtccagc tcccaaggag 360  
 gttgcagaag taccgtacag agtggattg cagggcagtg gcatggagcc cctcttcccc 420  
 gcgccgttct gggaggttat ctacggcagc caccttcagg gcaacctgtc cctcctgagc 480  
 cccaaccaca gtctgctgcc ccogcatctg ctgctcaatg ccagccacgg cgccttcctg 540  
 cccctcgggc tcaaggtcac catcgtgggg ctctacctgg ccgtgtgtgt cggagggctc 600  
 ctggggaact gccttgtcat gtacgtcatc ctcaggcaca ccaaatgaa gacagccacc 660  
 aatatttaca tctttaacct ggccctggcc gacactctgg tctgtctgac gctgcccttc 720  
 cagggcacgg acatcctcct gggcttctgg ccgtttggga atgcgctgtg caagacagtc 780  
 attgccattg actactaaa catgctcacc agcaccttca ccctaactgc catgagtgtg 840  
 gatcgtatg tagcatctg ccacccatc cgtgccctcg acgtccgcac gtcagcaaaa 900  
 gccaggtctg tcaatgtggc catctgggcc ctggcctctg ttgtcgggtg tcccgttgcc 960  
 atcatgggct cggcacaggt cgaggatgaa gagatcgagt gcctgggtgga gatccctacc 1020  
 cctcaggatt actggggccc ggtgtttgcc atctgcatct tcctcttctc cttcatcgtc 1080  
 cccgtgctcg tcatctctgt ctgctacagc ctcatgatcc ggccgctccg tggagtccgc 1140  
 ctgctctcgg gctcccgaga gaaggaccgg aacctgcggc gcatcactcg gctggtgctg 1200  
 gtggtagtgg ctgtgttcgt gggctgctgg acgcctgtcc aggtcttctg gctggcccaa 1260  
 gggctggggg ttcagccgag cagcgagact gccctggcca ttctgcgctt ctgcacggcc 1320  
 ctgggctacg tcaacagctg cctcaacccc atcctctacg ccttccctgga tgagaacttc 1380  
 aaggcctgct tccgcaagtt ctgctgtgca tctgccctgc gccgggacgt gcaggtgtct 1440  
 gaccgctgct gcagcattgc caaggacgtg gccctggcct gcaagacctc tgagacggta 1500  
 ccgcgcccg catgactagg cgtggacctg cccatggtgc ctgtcagccc gcagagccca 1560  
 tctacgcca acacagagct cacacaggtc actgctctct agcgggacac accctgggcc 1620  
 ctgagcatcc agagcctggg atgggctttt ccctgtgggc cagggatgct cgggtcccaga 1680  
 ggaggacctg gtgacatcat gggacaggtc aaagcattag ggccacctcc atggccccag 1740  
 acagactaaa gctgccctcc tgggtgcaggg ccgaggggac acaaggacct acctggaagc 1800  
 agctgacatg ctggtggacg gccgtgactg gagcccgctc ccctccctcc ccgtgcttca 1860  
 tgtgactctt ggctctctg ctgctgctgt ggcagaacct tgggtgggca ggcacccgga 1920  
 ggaggagcag cagctgtgct atcctgtgcc ccccatgtgc tgtgtgctgt ttgcatggca 1980  
 gggctccagc tccgttcagc cctgtgactg ctctcaggg cagctggaca ggcttggcac 2040  
 tgcccgga gctgacgag cagcttttct ttggggggg acttgcctg agcttggagc 2100  
 tgccacctgg aggacttgcc tgttccgact ccacctgtgc agcgggggcc accccaggag 2160  
 aaagtgtcca ggtgggggct ggcagtcctt ggctgcagac cccgagctgg ccctgggcca 2220  
 gccgcacctc tgaaggtttt ctgtgtgctg cacgggtgac gcctcatccc tgactgcagc 2280  
 ttgactctgg gcccaacccc catttccctt caggagacca gcgagaggcc ctggccatt 2340  
 cctccagcg gtgcaatgaa ctatcatgct gtggaccgtc aaccagccc tgcttctcag 2400  
 tgtggggcag gtgtctcagg acgaagcgc cgctgacca catgggcagc tctgttaca 2460  
 aagtggaggc ctgcttttcc tggctctgac tgcctgtttt ggggtgggaga agattctctg 2520  
 ggggtcccca catcctccca aggtcccct cacagcctct cctttgcttg aagccagagg 2580  
 tcagtggccg tgcgtgtgtt cgggggaagc tgtgtggaag gagaagctgg tggccacagc 2640  
 agagtctgct tctggggacg cctgcttcat ttacaagcct caagatggct ctgtgtaggg 2700  
 cctgagcttg ctgcccaacg ggaggatggc ttcacagcag agccagcatg aggggtgggg 2760  
 cctggcaggg ctgcttgag ccaaactgca aaggctgtgg tggctgtgag gacactgcgg 2820  
 ggggtggggg gggggcgtct gtacctcagg ggatgcccc ctgtggtcac ccagagaatc 2880  
 acccttctct gtctacagat ggaagctgca ggttgggtgac tttgcaatg cacttctctac 2940  
 agatgaacta ttaaaagacc tgcaacattg aaaaaactca ttttttccac caaaccttg 3000  
 gccaggtaac ctaccttagg cacctgcaaa gaacaggaag tgatggctgt ctgcacaacag 3060  
 agcctgggct gctcctcctg ctctggggag tctaggcctg ggggactgtt ctggggaggc 3120  
 tcatgctgct tccatgacgt ctgtggcagg agtccctgag gacgggagct gcctagctac 3180  
 agttttcttg ccaaggcgag gtgttttgtg aatctgtgct gatgtaatgt gcacctcac 3240  
 gtatttatgc atgtggcaag cgttacttcc tgtgcacgta gccagccctg ggtctgtctc 3300  
 tggggtaatg aaaaaggacc ctaataaaca cctgctcact ggctgggtat tcttcgtaa 3359

<210> 62  
 <211> 1134  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 62

ES 2 770 033 T3

ttgcaggcca gtggcatgga gccctcttc cccgcgctt tctgggaggt tatctacggc 60  
agccaccttc agggcaacct gtccctctcg agccccaacc acagtctgct gcccccgcat 120  
ctgctgctca atgccagcca cggcgccttc ctgcccctcg ggctcaaggt caccatcgtg 180  
gggctctacc tggccgtgtg tgtcggaggg ctctgggga actgccttgt catgcacacc 240  
aaaatgaaga cagccaccaa tatttacatc tttaacctgg ccttggccga cactctggtc 300  
ctgctgacgc tgccttcca gggcacggac atcctcctgg gcttctggcc gtttgggaat 360  
gcgctgtgca agacagtcac tgccattgac tactacaaca tgttcaccag cacctcacc 420  
ctaactgcca tgagtgtgga tcgctatgta gccatctgcc accccatccg tgccctcgac 480  
gtccgcacgt ccagcaaagc ccaggctgtc aatgtggcca tctgggccct ggcctctgtt 540  
gtcgggtgtc ccgttgccat catgggctcg gcacaggtcg aggatgaaga gatcgagtgc 600  
ctgggtggaga tcctacccc tcaggattac tggggcccgg tgtttgccat ctgcatcttc 660  
ctcttctcct tcacgtccc cgtgctcgtc atctctgtct gctacagcct catgatccgg 720  
cggctccgtg gactccgct gctctcgggc tcccagagaga aggaccggaa cctgcggcgc 780  
atcactcggc tgggtctggt ggtagtggct gtgtctgtgg gctgctggac gcctgtccag 840  
gtcttctgtc tggcccaagg gctgggggtt cagccgagca gcgagactgc cgtggccatt 900  
ctgcgcttct gcacggccct gggctacgtc aacagctgcc tcaaccccat cctctacgcc 960  
ttcctggatg agaacttcaa ggcctgcttc cgcaagttct gctgtgcatc tgccctgcgc 1020  
cgggacgtgc aggtgtctga ccgctgctgc agcatgtcca aggacgtggc cctggcctgc 1080  
aagacctctg agacggatcc gcggcccga tgactaggcg tggacctgcc catg 1134

<210> 63  
<211> 1774  
5 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 63  
ccgaggagcc tgcggtgct cctggctcac agcgctccgg gcgaggagag cgggcggacg 60  
ccgggggctg ggccgggtgc gggggcgagg caggcggacg aggcgcagag acagcggggc 120  
ggccggggcg cggcagccgg cggcgtcggg gccgcggcct ctgccttgcc gctcccctcg 180  
cgtcggatcc ccgcgcccag ggcgcacggg ggagagggac gcggcggagc cggccggcag 240  
ccatggaacc ggccccctcc gccggcgcgg actgcaagc cccgctcttc gccaacgcct 300  
cggacgccta ccctagcgc tgcccagcg ctggcgccaa tgcgtcgggg ccgccaaggc 360  
cgcggagcgc ctgctcctc gccctggcaa tcgcatcac cgcgctctac tcggccgtgt 420  
gcgccgtggg gctgctgggc aacgtgcttg tcatgttcgg catcgtccgg tacactaaga 480  
tgaagacggc caccaacatc tacatcttca acctggcctt agccgatgcg ctggccaaca 540  
gcacgtgccc tttccagagt gccaaagtacc tgatggagac gtggcccttc ggcgagctgc 600  
totgcaaggc tgtgctctcc atogactact acaatatggt caccagcatc ttcacgctca 660  
ccatgatgag tgttgaccgc tacatcgtg tctgccacc tgtcaaggcc ctggacttcc 720  
gcacgcctgc caaggccaag ctgatcaaca tctgtatctg ggtcctggcc tcaggcgttg 780  
gctgtcccac catggtcatg gctgtgacc gtccccggga cggggcagtg gtgtgcatgc 840  
tccagtctcc cagccccagc tggactggg acacggtgac caagatctgc gtgttcctct 900  
tcgctctcgt ggtgcccac tcatcatca ccgtgtgcta tggcctcatg ctgctgcgcc 960  
tgcgcagtgt ggcctgctg tcgggctcca aggagaagga ccgcagcctg cggcgcacat 1020  
cgcgcaggtg gctggtggtt gtgggcgccc tcgtggtgtg ttgggcgccc atccacatct 1080  
tcgtcatcgt ctggaagctg gtggacatcg accggcgcga cccgctggtg gtggctgcgc 1140  
tgcacctgtg catcgcgctg ggctacgcca atagcagcct caaccctgt ctctacgctt 1200  
tcctcgacga gaacttcaag cgctgcttcc gccagctctg ccgcaagccc tgcggccgcc 1260  
cagaccccag cagcttcagc cgcgcccgcg aagccacggc ccgcgagcgt gtcaccgctt 1320  
gcaccccgtc cgtgggtccc ggcgggtggc ctgcccctg accaggccat ccggccccc 1380  
gagcggccct ccctagtgac ccggaggcca catgagtccc agtgggagg gcgagccatg 1440  
atgtggagtg gggcagtaga aggtcggagg cttgggaccg ccagatgggg cctctgttcc 1500  
ggagacggga ccgggcccgt agatgggcat ggggtgggcc tctggtttgg ggcgaggcag 1560  
aggacagatc aatggcgagc tgccctcgtt ctgggtgccc cgtccacggc tctaggtggg 1620  
gccggaaagc cagtgactcc aggagaggag cgggacctgt ggctctaaa ctgagtcctt 1680  
aaacagggca tctccaggaa ggcggggctt caacctgag acagcttcgg tttctaactt 1740  
10 ggagccggac tttcggagtt gggggtccgg gcc 1774

<210> 64  
<211> 1773  
15 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 64

ES 2 770 033 T3

ccgaggagcc tgcgctgctc ctggctcaca gcgctccggg cgaggagagc gggcggaccg 60  
 gggggctggg ccggtgctggg cggcgaggca ggcggacgag gcgcagagac agcggggcgg 120  
 ccggggcgcg gcacgcggcg ggtcggggcc ggctctgccc ttgccgctcc cctcgcgtcg 180  
 gatccccgcg cccaggcagc cgggtggagag ggacgcggcg gacgcgggca gccatggaac 240  
 cggccccctc cgccggcgcc gagctgcagc ccccgtcttt cgccaacgcc tcggacgcct 300  
 accctagcgc cttccccagc gctggcgcca atgctgctgg gcccagcagg gcgcggagcg 360  
 cctcgtccct cgccttgcca atcgccatca ccgctctca ctggccctg tgccgctgg 420  
 ggctgctggg caactgtgct gtcattgttc gcatcgtccg gtacactaag atgaagacgg 480  
 ccaccaacat ctacatcttc aacctggcct tagccgatgc gctggccacc agcacgctgc 540  
 ctttccagag tgccaagtac ctgatggaga cgtggccctt cggcgagctg ctctgcaagg 600  
 ctgtgctctc catcgactac tacaatatgt taccagcat cttcacgctc accatgatga 660  
 gtgttgaccg ctacatcgct gtctgccacc ctgtcaaggc cctggacttc cgcacgcctg 720  
 ccaaggccaa gctgatcaac atctgtatct gggctcctggc ctgaggcgtt ggcgtgccca 780  
 tcatggtcat ggtgtgacc cgtccccggg acggggcagt ggtgtgcatg ctccagtcc 840  
 ccagccccag ctggtactgg gacacggtga ccaagatctg cgtgttcctc ttcgccttcg 900  
 tgggtgcccat cctcatcatc accgtgtgct atggcctcat gctgctgccc ctgcccagtg 960  
 tgcgctgctc gtcgggctcc aaggagaagg accgcagcct gcggcgcatc acgcgcatgg 1020  
 tgctggtggt tgtgggccc ttcgtggtgt gttgggccc catccacatc ttcgtcatcg 1080  
 tctggacgct ggtggacgc gaccggcgcg acccgtggt ggtggctgcg ctgacactgt 1140  
 gcactcgcct gggctacgcc aatagcagcc tcaaccccgt gctctacgct ttcctcgacg 1200  
 agaactcaa gcgctgcttc cgccagctct gccgcaagcc ctggggccc cagacccca 1260  
 gcagcttcag ccgcgcccgc gaagccacgg cccgcgagcg tgtcaccgcc tgcaccccgt 1320  
 ccgatggtcc cggcggtggc gctgcccct gaccaggcca tccggccccc agacgcccct 1380  
 ccctagtgtg acccggagcc cacatgagtc ccagtgggag gcgcgagcca tgatgtggag 1440  
 tggggccagt agataggtcg gagggctttg ggaccgccag atggggcctc tgtttcggag 1500  
 acgggaccgg gccgctagat gggcatgggg tgggctctcg gtttggggcg aggcagagga 1560  
 cagatcaatg gcgcagtgcc tctggtctgg gtgccccct ccacggctct aggtggggcg 1620  
 ggaaagccag tgactccagg agaggagcgg gacctgtggc tctacaactg agtccttaa 1680  
 caggcatctc ccaggaagg ggggctcaa ccttgagaca gcttcggtt ctaacttga 1740  
 gccggacttt cggagtggg gggccgggg ccc 1773

<210> 65  
 <211> 1154  
 5 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 65  
 atggactccc cgatccagat cttccgctgg gagccgggccc ctacctgccc cccgagcggc 60  
 tgcctgcccc ccaacagcag cgcctggttt cccgctggg ccgagcccga cagcaacggc 120  
 agcgcgggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccgc catcccggtc 180  
 atcatcacgg cggctactc cgtagtgttc gtcgtgggct tgggtgggcaa ctgctggtc 240  
 atgttctgta tcatccgata cacaagatg aagacagcaa ccaacattta catatttaac 300  
 ctggccttgg cagatgcttt agttactaca acctgcccct ttcagagtac ggtctacttg 360  
 atgaattcct ggccttttgg ggatgtgctg tgcaagatag taatttccat tgattactac 420  
 aacatgttca ccagcatctt caccttgacc atgatgagcg tggaccgcta cattgcccgt 480  
 tgcaccccgc tgaaggcttt ggacttccc acacccttga aggcaaatat catcaatc 540  
 tgcactctggc tgcctgctc atctgttggc atctctgcaa tagtccttgg aggcaccaa 600  
 gtcaggggag acgtcgatgt cattgagtgc tccttgagct tcccagatga tgactactcc 660  
 tgggtgggacc tcttcatgaa gatctgctc ttcatctttg ccttcgtgat ccctgtcctc 720  
 atcatcatcg tctgtacacac cctgatgatc ctgctctca agagcgtccg gctccttct 780  
 ggctcccagc agaaagatcg caacctgctg aggatcacca gactggctcct ggtggtggg 840  
 gcagctctcg tctctgctg gactcccatt cacatattca tctggttga ggctctgggg 900  
 agcacctccc acagcacagc tgcctctctc agctattact tctgcatcgc cttaggctat 960  
 accaacagta gcctgaatcc cattctctac gcctttcttg atgaaaact caagcgggtg 1020  
 ttccgggact tctgctttcc actgaagatg aggatggagc gcagagcac tagcagagtc 1080  
 cgaaatacag ttcaggatcc tgcttacctg agggacatcg atgggatgaa taaaccagta 1140  
 10 tgactagtgc tgga 1154

<210> 66  
 <211> 1143  
 <212> ADN  
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 66

ES 2 770 033 T3

atggaatccc cgattcagat cttccgcggg gagccgggccc ctacctgcgc cccgagcgc 60  
 tgcctgcccc ccaacagcag cgcctggttt cccggctggg ccgagcccga cagcaacggc 120  
 agcgcgggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccggc catcccggtc 180  
 atcatcacgg cggctactc cgtagtgttc gtcgtgggct tggggggcaa ctcgctggtc 240  
 atgttcgtga tcatccgata cacaaagatg aagacagcaa ccaacattta catatttaac 300  
 ctggccttgg cagatgcttt agttactaca accatgccct ttcagagtac ggtctacttg 360  
 atgaattcct ggccttttgg ggatgtgctg tgcaagatag taatttccat tgattactac 420  
 aacatgttca ccagcatctt caccttgacc atgatgagcg tggaccgcta cattgccgtg 480  
 tgccaccccg tgaaggcttt ggacttccgc acacccttga aggcaaagat catcaatc 540  
 tgcacttggc tgctgtcgtc atctgttggc atctctgcaa tagtccttgg aggacccaaa 600  
 gtcaggggag acgtcgtatg cattgagtgc tccttgagc tcccagatga tgactactcc 660  
 tgggtgggacc tctcatgaa gatctgcgtc ttcacttttg ccttcgtgat ccctgtcctc 720  
 atcatcatcg tctgtacac cctgatgatc ctgctctca agagcgtccg gctcctttct 780  
 ggctcccag agaaagatcg caacctgcgt aggatcacca gactggctct ggtggtggtg 840  
 gcagtcttgc tctctgctg gactcccatt cacatattca tctgggtgga ggctctgggg 900  
 agcacctccc acagcacagc tgctctctcc agctattact tctgcatcgc cttaggctat 960  
 accaacagta gcctgaatcc cattctctac gcctttcttg atgaaaact caagcgggtg 1020  
 ttccgggact tctgctttcc actgaagatg aggatggagc ggcagagcac tagcagagtc 1080  
 cgaatacacg ttcaggatcc tgcttacctg agggacatcg atgggatgaa taaaccagta 1140  
 tga 1143

- <210> 67
- <211> 2738
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*

5

<400> 67  
 cctgtaaaga aatgatgag ggctaaatcc atcagcacca aagctgggaa gccctccagg 60  
 ttcatttgga agaaaatact cctctgagct caaaggaagt gtgatctgtc acaatattgt 120  
 atgcctgcac taagtttgc tctgaaaac tcaactggaag ataggaaagc aagcatgaaa 180  
 aagcagccgg gtcagacagg cttctggatt cagtgtgtgg acatgacttt gcctgcatga 240  
 attgccctt tctcctacaa acaagagaat tcggtcaagt ggatgtggca gaactgggct 300  
 gctctgagat gatagaaaag ggctcctgct tttcctgtaa ttgcagcccc ttgttcttgt 360  
 ggttgttaca tgcaataaat gtaattctat gagaaggacc agcccttaca tcccatacaa 420  
 atgtttcctg gaaacctgga gcacagaact ctgatatcct ctcaactgt ggcaggagaa 480  
 gcagcacaag gcacaatgct gaaatagcat ggtccaggat gtgtttgac agaagagtgc 540  
 ccagtgaaga gacctactcc ttggatcgtc ttgcgcaaaa tccaccctt tccctcctc 600  
 cctcccttcc agcctccgaa tcccgcagtg cccacgctcc cctcctgcag cgggtcgggg 660  
 cagccaggac tggtttctgt aagaaacagc aggagctgtg gcagcggcga aaggaaagcgg 720  
 ctgagggcgt tggaaaccga aaagtctcgg tgctcctggc tacctcgcac agcggtgccc 780  
 gcccgccgt cagtaccatg gacagcagcg ctgccccac gaacgcagc aattgactg 840  
 atgccttggc gtactcaagt tgctccccag caccagccc cggttcctgg gtcaacttgt 900  
 cccacttaga tggcaacctg tccgaccat gcggtccgaa ccgcaccgac ctgggcggga 960  
 gagacagcct gtgcctccg accggcagtc cctccatgat cacggccatc acgatcatgg 1020  
 ccctctactc catcgtgtgc gtgggtggggc tcttcggaaa cttcctggtc atgtatgtga 1080  
 ttgtcagata caccaagatg aagactgcca ccaacatcta cattttcaac cttgctctgg 1140  
 cagatgcctt agccaccagt accctgcctt tccagagtgt gaattaccta atgggaacat 1200  
 ggccatttgg aacctcctt tgcaagatag tgatctccat agattactat aacatgttca 1260  
 ccagcatatt caccctctgc accatgagtg ttgatcgata cattgcagtc tgccaccctg 1320  
 tcaaggcctt agatttccgt actccccgaa atgccccaaat tatcaatgtc tgcaactgga 1380  
 tcctctcttc agccattggc cttcctgtaa tgttcatggc tacaacaaaa tacaggcaag 1440  
 gttccataga ttgtacacta acattctctc atccaacctg gtactgggaa aacctgctga 1500  
 agatctgtgt tttcatcttc gccttcatta tgccagtgtc catcattacc gtgtgctatg 1560

ES 2 770 033 T3

gactgatgat cttgcgctc aagagtgtcc gcatgctctc tggctccaaa gaaaaggaca 1620  
 ggaatcttgc aaggatcacc aggatgggtc tgggtgggtt ggctgtgttc atcgtctgct 1680  
 ggactcccat tcacatttac gtcattatta aagccttggg tacaatccca gaaactacgt 1740  
 tccagactgt ttcttggcac ttctgcattg ctctaggtta cacaaacagc tgcctcaacc 1800  
 cagtccttta tgcatttctg gatgaaaact tcaaacgatg cttcagagag ttctgtatcc 1860  
 caacctcttc caacattgag caacaaaact ccaactcgaat tcgtcagaac actagagacc 1920  
 acccctccac ggccaatata gtggatagaa ctaatcatca gctagaaaat ctggaagcag 1980  
 aaactgtctc gttgccctaa cagggctca tgccattccg accttcacca agcttagaag 2040  
 ccaccatgta tgtggaagca ggttgcttca agaattgtga ggaggctcta attctctagg 2100  
 aaagtgcctg cttttaggtc atccaacctc tttcctctct ggccactctg ctctgcacat 2160  
 tagagggaca gccaaaagta agtggagcat ttggaaggaa aggaatatac cacaccgagg 2220  
 agtccagttt gtgcaagaca cccagtgga ccaaaaccca tcgtgggatg tgaattgaag 2280  
 tcatcataaa aggtgaccct tctgtctgta agattttatt tcaagcaaa tttttatgac 2340  
 ctcaacaag aagaaccatt ttttgtaag ttaccgtag taacacataa agtaaatgct 2400  
 acctctgac aaagcacctt gaatggaagg tccgagtctt tttagtgttt tgcaagggaa 2460  
 tgaatccatt attctatttt agacttttaa cttcacctta aaattagcat ctggctaagg 2520  
 catcattttc acctccatth cttgggtttg tattgtttaa aaaaataaca tctcttcat 2580  
 ctagctccat aattgcaagg gaagagatta gcatgaaagg taatctgaaa cacagtcag 2640  
 tgtcagctgt agaaaggttg attctcatgc actgcaaata cttccaaaga gtcacatg 2700  
 gggatttttc attcttaggc tttcagtggt ttgttctc 2738

<210> 68  
 <211> 2053  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 68  
 catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggg 60  
 gctgtctttc cttccctccc tgctcggcgg ctccaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120  
 ggagaacaca accctcccga gaagcccagg tccagagcca aacctcgtcac tgacccccca 180  
 gcccaggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atgcgcaatg 240  
 agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtgcgtg gaaagcacc 300  
 gtcgtatgct gcaactgggt gaagagagta aagatgctgg taccaggact ttggttatgt 360  
 tggatgaaca aggagaacaa ctcgatcgtg tcgaagaagg catgaacctat atcaaccaag 420  
 acatgaagga ggtgagaaa aattttaaag atttaggaaa atgctgtggc cttttcatat 480  
 gtccttgtaa caagctttaa tcaagtgatg cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540  
 acggagtggg gccagccag cctgctcgtg tagtggacga acgggagcag atggccatca 600  
 gtggcggctt catccgcagg gtaacaaatg atgcccgaga aatgaaatg gatgaaacc 660  
 tagagcaggt gagcggcatc atcgggaacc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720  
 agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaacaaa 780  
 ccagaattga tgagggcaac caactgcaa caaagatgct gggagtggt taagtgtgcc 840  
 caccctgtgt ctctccaaa tgctgtcggg caagatagct cttcatgct tttctcatgg 900  
 tattatctag taggtctgca cacataaac acatcagctc accccattg tgaatgttgt 960  
 cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct tttgttctct cttggtctct 1020  
 ttctttccaa agttgtata tagtggctcat ttggtggctc taactcctg atgtctgag 1080  
 tttcattttt cattttctct cctcgggtgc atttgctgaa taacaacaat ttaggaatgc 1140  
 tcaatgtgct gttgattctt tcaatccaca gtattgttct tgtaaaactg tgacattcca 1200  
 cagagtact gccacggctc tttgagtgct aggtctgaa tctctcaaaa tgtgccgtct 1260  
 ttggttctc atggctgtta tctgtcttta tgatttcatg attagacaat gtggaattac 1320  
 ataacaggca ttgcactaaa agtgaatgta tttatgcatt tatgcatgag aactaaatag 1380  
 atttttagat tcctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcatactg atgagcaac 1440  
 acacacacac acaaaacaac agcaacaaca acagaacaac acaaaagcat gctcagttat 1500  
 gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact ttttctctgt 1560  
 caatatatag agacttctaa atcataatca tcctttttta aaaaaagaa ttttaaaaaa 1620  
 gatggatttg acacactcac catttaatca tttccagcaa aatatatgtt tggctgaaat 1680  
 tatgtcaaat ggtgtaata tagggtttgt ttgctgcttt tgatggctac gttttggaga 1740  
 gagcaatctt gctgtgaaac agtgtggatg taaattttat aaggctgact cttactaacc 1800  
 accatttccc ctgtggtttg ttatcagtac aattctttgt tgcttaatct agagctatgc 1860  
 acaccaaat gctgagatgt ttagtagctg ataaagaaac ctttttaaaaa aataataaa 1920  
 atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatagc atgtaatat aaattcctcc 1980  
 tgtctctct gtcagtttgt gaagtgttg acattttgta gctagtttaa aattattaa 2040  
 aattatagac tcc 2053

<210> 69  
 <211> 2053  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 69

ES 2 770 033 T3

```

catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggg 60
gctgtctttc cttccctccc tgctcggcgg ctccaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120
ggagaacaca accctcccga gaagcccagg tccagagcca aacctcgtcac tgacccccca 180
gccaggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atggcgaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtcgctg gaaagcacc 300
gtcgtatgct gcaactgggtt gaagagagta aagatgctgg tatcaggact ttggttatgt 360
tggatgaaca aggagaacaa ctggaacgca ttgaggaagg gatggaccaa atcaataagg 420
acatgaaaga agcagaaaag aatttgacgg acctaggaaa attctgcggg ctttgtgtgt 480
gtccctgtaa caagcttaaa tcaagtgatg cttcaaaaaa agcctggggc aataatcagg 540
acggagtggg gccagccag cctgctcgtg tagtggacga acgggagcag atggccatca 600
gtggcggctt catccgcagg gtaacaaatg atgcccgaga aatgaaatg gatgaaaacc 660
tagagcaggt gagcggcatc atcgggaacc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaacaaaa 780
ccagaattga tgaggccaac caacgtgcaa caaagatgct gggagtggt taagtgtgcc 840
cacccgtgtt ctctccaaa tgctgtcggg caagatagct cttcatgct tttctcatgg 900
tattatctag taggtctgca cacataacac acatcagtcc accccattg tgaatgttgt 960
cctgtgcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct tttgttctct cttggtctct 1020
ttctttccaa aggttgtaaca tagtggctcat ttggtggtc 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 tgatttcatg attagacaat gtggaattac 1320
ataacaggca ttgactaaa agtgatgtga tttatgcatt tatgcatgag aactaaatag 1380
atthtttagat tcctacttaa acaaaaaactt tccatgacag tagcatactg atgagacaac 1440
acacacacac acaaaacaac agcaacaaca acagaacaac acaaagcat gctcagtatt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact ttttctctgt 1560
caatataatag agacttctaa atcataatca tcctttttta aaaaaaagaa ttttaaaaaa 1620
gatgatttg acacactcac catttaatca tttccagcaa aatatagtt tggctgaaat 1680
tatgtcaaat ggatgtaata tagggttgt ttgctgcttt tgatggctac gttttggaga 1740
gagcaatctt gctgtgaaac agtgtggatg taaatthtat aaggctgact cttactaacc 1800
accatttccc ctgtggtttg ttatcagtac aattctttgt tgcttaatct agagctatgc 1860
acaccaaatt gctgagatgt ttagtagctg ataaagaaac cttttaaaaa aataatataa 1920
atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatagc atgtaatatt aaattcctcc 1980
tgtctcctct gtcagtttgt gaagtgattg acattttgta gctagtttaa aattattaaa 2040
aattatagac tcc 2053

```

<210> 70

<211> 266

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 70

```

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

```

ES 2 770 033 T3

```

          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  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

5

```

<400> 71
caggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
tcctgcaagg cttctggcta catcttact gaccatgctc ttcactgggt gaggcagaag 120
cctgaacagg gcctggaatg gattgggtat atttttcccg gaaatggtaa tattgagtac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag tactgcctac 240
atgcacctca acagcctgac atctggagat tctgcaatgt atttctgtaa aaagatggac 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca 336

```

10

<210> 72  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15

```

<400> 72
Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1          5          10          15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His
          20          25          30
Ala Leu His Trp Val Arg Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45
Gly Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
          50          55          60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
          85          90          95
Lys Lys Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          100          105          110

```

20

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

25

```

<400> 73
caggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60
tcctgcaagg cttctgggta caccttact gaccattcta ttcactgggt gaagcagaag 120
cctggacagg gcctagaatg gattggatata ctttttcccg gaaatggtaa ttttgaatat 180
aatgagaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
atgcacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaagatggac 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca 336

```

<210> 74  
 <211> 112



ES 2 770 033 T3

<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

<400> 74  
 Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His  
 20 25 30  
 Ser Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Lys Lys Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

5

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

10

<400> 75  
 caggttcagc tgcagcagtc cgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60  
 tcctgcaggg cttctggcta caccttcact gaccattcta ttcactgggt gaagcagcag 120  
 cctggccagg gcctggaatg gatcgatat atttttcccg gaaatggaaa tattgaatac 180  
 aatgacaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccgg cactgcctac 240  
 atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaggatgggg 300  
 tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctca 336

15

<210> 76  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

20

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

25

<210> 77  
<211> 336  
<212> ADN  
<213> *Mus musculus*

<400> 77  
 caggtaaac tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60  
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcact 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 ggtcaccgtc tcctca 336

30

<210> 78  
<211> 112  
<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 78

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

5

<210> 79

<211> 336

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

10

<400> 79

cagggtcaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60  
 tcctgcaagg ctctctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120  
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatoctt acaatgatgg ctctaagtac 180  
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaatggac 300  
 tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca 336

<210> 80

15

<211> 112

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 80

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 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

20

<210> 81

25

<211> 336

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 81

cagggtcaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60  
 tcctgcaagg ctctctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120  
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatoctt acaatgatgg ctctaagtac 180  
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaatgggg 300  
 tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca 336

30

<210> 82

<211> 112

<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 Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

5 <210> 83  
 <211> 342  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 83  
 gatgttttga tgaccctaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60  
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120  
 tacctcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtcc caaccgattt 180  
 tctggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatggtcct 300  
 cctacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg ct 342

<210> 84  
 <211> 113  
 15 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 84  
 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

20 <210> 85  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 85  
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60  
 atcacatgtc gaacaactga aatatttac 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  
 gggaccaggc tggaaataag acgg 324

<210> 86  
 30 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

ES 2 770 033 T3

<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 Thr Arg Leu Glu Ile Arg Arg  
 100 105

5 <210> 87  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 87  
 gatgttttg atgacccaaac tccactcact ttgtcgggta ccattggaca accagcttcc 60  
 atctcttgc aagtcagtc gagcctctta tataactaatg gaaaaaccta tttgacttgg 120  
 ttattccag aggcaggcca gtctccaaa cgcctaactc atctgggtgc tgaattggac 180  
 tctggagtc cctgacaggtt cagtggcagt ggctcagggg cagatttcac actgaaatc 240  
 accagagtg gaggtgagga tttgggagtt tattactgct tgcagagtgc acattttcca 300  
 ttcacgttc ggctcgggcac caagctggaa atcaaacgg 339

15 <210> 88  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 88  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr  
 20 25 30  
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Phe Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser  
 85 90 95  
 Ala His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

20 Arg  
 <210> 89  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 25 <213> *Mus musculus*

<400> 89  
 gatgttgatga tgacccaaac tccactcact ctgtcgggta ccattggaca accagcgttc 60  
 atctcttgc aagtcagtc gagcctcttt aactactaatg gaaaaaccta tttgacttgg 120  
 ttaattcaga ggcaggcca gtctccacag cgcctgatct atctgggtgc caaattggac 180  
 tctggcgtcc cggacaggtt cagtggcagt ggctcagggg cagatttcac actgaaatc 240  
 agcagagtgg aggtgagga tctgggagtt tattactgcc tgcagagtag ccattttccg 300  
 tttacgttcg gctcgggcac caagctggaa atcaaacgg 339

30 <210> 90  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

ES 2 770 033 T3

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

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

10 <400> 91  
 gatgttgtgc taactcagtc tcttgccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtca 60  
 ctttctgca gggccagcca aaatattggc aactacctac actggtatca acagaaatca 120  
 catgagctct caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatcccctcc 180  
 aggttcagtg gcagtggatc agtcacagat ttcactctca atatcaacag tgtggagact 240  
 gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtgacacct ggcctctcac gttcgggtgct 300  
 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

30 <210> 94  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

35 <400> 94  
 Thr Phe Thr Asn Tyr Val Ile His  
 1 5

ES 2 770 033 T3

<210> 95  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 5 <213> *Mus musculus*  
  
 <400> 95  
 Ile Phe Thr Asp His Ala Leu His  
 1 5  
 10  
 <210> 96  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 15  
 <400> 96  
 Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Asp Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 20  
 <210> 97  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
  
 <400> 97  
 Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 25 Gly  
  
 <210> 98  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 30 <213> *Mus musculus*  
  
 <400> 98  
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 35  
 <210> 99  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 40  
 <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  
 45 <213> *Mus musculus*  
  
 <400> 100  
 Lys Arg Met Gly Tyr  
 1 5  
 50  
 <210> 101  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 55  
 <400> 101  
 Lys Lys Met Asp Tyr  
 1 5

ES 2 770 033 T3

<210> 102  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 5 <213> *Mus musculus*  
  
 <400> 102  
 Ala Arg Met Asp Tyr  
 1 5  
  
 10 <210> 103  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
  
 15 <400> 103  
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
 1 5 10 15  
  
 <210> 104  
 <211> 11  
 20 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
  
 <400> 104  
 Arg Thr Thr Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Phe Val  
 1 5 10  
  
 25 <210> 105  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
  
 30 <400> 105  
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr  
 1 5 10 15  
  
 35 <210> 106  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
  
 <400> 106  
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr  
 40 1 5 10 15  
  
 <210> 107  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 45 <213> *Mus musculus*  
  
 <400> 107  
 Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Asn Tyr Leu His  
 1 5 10  
  
 50 <210> 108  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
  
 55 <400> 108  
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5  
  
 <210> 109  
 <211> 7  
 60 <212> PRT

<213> *Mus musculus*  
 <400> 109  
 Asn Ala Lys Ser Leu Ala Glu  
 1 5  
 5  
 <210> 110  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 10  
 <400> 110  
 Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser  
 1 5  
 15  
 <210> 111  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 20  
 <400> 111  
 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser  
 1 5  
 25  
 <210> 112  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 30  
 <400> 112  
 Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
 1 5  
 35  
 <210> 113  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 40  
 <400> 113  
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr  
 1 5  
 45  
 <210> 114  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 50  
 <400> 114  
 Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr  
 1 5  
 55  
 <210> 115  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 60  
 <400> 115  
 Leu Gln Ser Ala His Phe Pro Phe Thr  
 1 5  
 65  
 <210> 116  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 70  
 <400> 116



Leu Gln Ser Ser His Phe Pro Phe Thr  
 1 5  
 <210> 117  
 <211> 9  
 5 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 117  
 Gln Gln Ser Asp Thr Trp Pro Leu Thr  
 1 5  
 10 <210> 118  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 15 <400> 118  
 Asp His Ser Ile His  
 1 5  
 20 <210> 119  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 119  
 Asn Tyr Val Ile His  
 25 1 5  
 <210> 120  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 30 <213> *Mus musculus*  
 <400> 120  
 Asp His Ala Leu His  
 1 5  
 35 <210> 121  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 40 <400> 121  
 Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu  
 1 5  
 <210> 122  
 <211> 9  
 45 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 122  
 Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu  
 1 5  
 50 <210> 123  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 55 <400> 123  
 Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys  
 1 5  
 <210> 124

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5 <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*

10 <400> 125  
 Ser Asn Gly Asn Thr  
 1 5

15 <210> 126  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 126  
 Glu Asn Ile Tyr Ser  
 1 5

25 <210> 127  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

30 <400> 127  
 Thr Ser Gly Tyr Ser  
 1 5

35 <210> 128  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 128  
 Gln Asp Ile Lys Ser  
 1 5

40 <210> 129  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

45 <400> 129  
 Gln Asn Ile Gly Asn  
 1 5

<210> 130  
 <211> 911  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Endopeptidasa redirigida

55 <400> 130

ES 2 770 033 T3

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

ES 2 770 033 T3

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

				645					650					655			
Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Thr	Thr	Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Thr	Ile	Ile		
				660					665					670			
Ile	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala	Leu	Asn	Ile	Gly	Asn	Met	Leu	Tyr	Lys		
				675					680					685			
Asp	Asp	Phe	Val	Gly	Ala	Leu	Ile	Phe	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Leu		
				690					695					700			
Glu	Phe	Ile	Pro	Glu	Ile	Ala	Ile	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Phe	Ala	Leu		
				705					710					715			720
Val	Ser	Tyr	Ile	Ala	Asn	Lys	Val	Leu	Thr	Val	Gln	Thr	Ile	Asp	Asn		
				725					730					735			
Ala	Leu	Ser	Lys	Arg	Asn	Glu	Lys	Trp	Asp	Glu	Val	Tyr	Lys	Tyr	Ile		
				740					745					750			
Val	Thr	Asn	Trp	Leu	Ala	Lys	Val	Asn	Thr	Gln	Ile	Asp	Leu	Ile	Arg		
				755					760					765			
Lys	Lys	Met	Lys	Glu	Ala	Leu	Glu	Asn	Gln	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala		
				770					775					780			
Ile	Ile	Asn	Tyr	Gln	Tyr	Asn	Gln	Tyr	Thr	Glu	Glu	Glu	Lys	Asn	Asn		
				785					790					795			800
Ile	Asn	Phe	Asn	Ile	Asp	Asp	Leu	Ser	Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Ile		
				805					810					815			
Asn	Lys	Ala	Met	Ile	Asn	Ile	Asn	Lys	Phe	Leu	Asn	Gln	Cys	Ser	Val		
				820					825					830			
Ser	Tyr	Leu	Met	Asn	Ser	Met	Ile	Pro	Tyr	Gly	Val	Lys	Arg	Leu	Glu		
				835					840					845			
Asp	Phe	Asp	Ala	Ser	Leu	Lys	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Asp		
				850					855					860			
Asn	Arg	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly	Gln	Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Asp	Lys	Val		
				865					870					875			880
Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Thr	Asp	Ile	Pro	Phe	Gln	Leu	Ser	Lys	Tyr	Val		
				885					890					895			
Asp	Asn	Gln	Arg	Leu	Leu	Ser	Thr	Leu	Glu	Ala	Leu	Ala	Ser	Gly			
				900					905					910			

<210> 131  
 <211> 904  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Endopeptidasa redirigida

10

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

145					150					155				160	
Ala	Asp	Ile	Ile	Gln	Phe	Glu	Cys	Lys	Ser	Phe	Gly	His	Glu	Val	Leu
				165						170				175	
Asn	Leu	Thr	Arg	Asn	Gly	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln	Tyr	Ile	Arg	Phe	Ser
			180					185					190		
Pro	Asp	Phe	Thr	Phe	Gly	Phe	Glu	Glu	Ser	Leu	Glu	Val	Asp	Thr	Asn
		195					200					205			
Pro	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Lys	Phe	Ala	Thr	Asp	Pro	Ala	Val	Thr	Leu
	210					215					220				
Ala	His	Glu	Leu	Ile	His	Ala	Gly	His	Arg	Leu	Tyr	Gly	Ile	Ala	Ile
	225				230					235				240	
Asn	Pro	Asn	Arg	Val	Phe	Lys	Val	Asn	Thr	Asn	Ala	Tyr	Tyr	Glu	Met
			245					250						255	
Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Ser	Phe	Glu	Glu	Leu	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	His
			260				265						270		
Asp	Ala	Lys	Phe	Ile	Asp	Ser	Leu	Gln	Glu	Asn	Glu	Phe	Arg	Leu	Tyr
	275						280					285			
Tyr	Tyr	Asn	Lys	Phe	Lys	Asp	Ile	Ala	Ser	Thr	Leu	Asn	Lys	Ala	Lys
	290					295					300				
Ser	Ile	Val	Gly	Thr	Thr	Ala	Ser	Leu	Gln	Tyr	Met	Lys	Asn	Val	Phe
	305				310					315					320
Lys	Glu	Lys	Tyr	Leu	Leu	Ser	Glu	Asp	Thr	Ser	Gly	Lys	Phe	Ser	Val
				325					330					335	
Asp	Lys	Leu	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Lys	Met	Leu	Thr	Glu	Ile	Tyr
			340					345					350		
Thr	Glu	Asp	Asn	Phe	Val	Lys	Phe	Phe	Lys	Val	Leu	Asn	Arg	Lys	Thr
	355						360					365			
Tyr	Leu	Asn	Phe	Asp	Lys	Ala	Val	Phe	Lys	Ile	Asn	Ile	Val	Pro	Lys
	370					375				380					
Val	Asn	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Asp	Gly	Phe	Asn	Leu	Arg	Asn	Thr	Asn	Leu
	385				390					395					400
Ala	Ala	Asn	Phe	Asn	Gly	Gln	Asn	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Met	Asn	Phe
				405					410					415	
Thr	Lys	Leu	Lys	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Phe	Glu	Phe	Tyr	Lys	Leu	Leu
			420					425					430		
Cys	Val	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Gly	Trp
	435						440					445			
Thr	Leu	Asn	Ser	Ala	Gly	Tyr	Leu	Leu	Gly	Pro	His	Ala	Val	Ala	Leu
	450					455					460				
Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
	465				470					475					480
Ala	Leu	Val	Leu	Gln	Cys	Ile	Lys	Val	Asn	Asn	Trp	Asp	Leu	Phe	Phe
				485					490					495	
Ser	Pro	Ser	Glu	Asp	Asn	Phe	Thr	Asn	Asp	Leu	Asn	Lys	Gly	Glu	Glu
			500					505					510		
Ile	Thr	Ser	Asp	Thr	Asn	Ile	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Asn	Ile	Ser	Leu
	515						520					525			
Asp	Leu	Ile	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asn	Phe	Asp	Asn	Glu	Pro
	530					535					540				
Glu	Asn	Ile	Ser	Ile	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	Ile	Gly	Gln	Leu
	545				550					555					560
Glu	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Glu	Arg	Phe	Pro	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Glu
			565						570					575	
Leu	Asp	Lys	Tyr	Thr	Met	Phe	His	Tyr	Leu	Arg	Ala	Gln	Glu	Phe	Glu
			580					585					590		
His	Gly	Lys	Ser	Arg	Ile	Ala	Leu	Thr	Asn	Ser	Val	Asn	Glu	Ala	Leu
	595						600					605			
Leu	Asn	Pro	Ser	Arg	Val	Tyr	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser	Asp	Tyr	Val	Lys
	610					615					620				
Lys	Val	Asn	Lys	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Met	Phe	Leu	Gly	Trp	Val	Glu
	625				630					635					640
Gln	Leu	Val	Tyr	Asp	Phe	Thr	Asp	Glu	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Thr	Thr
				645					650					655	

ES 2 770 033 T3

Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala  
 660 665 670  
 Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu  
 675 680 685  
 Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala  
 690 695 700  
 Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys  
 705 710 715 720  
 Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu  
 725 730 735  
 Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys  
 740 745 750  
 Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu  
 755 760 765  
 Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn  
 770 775 780  
 Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp  
 785 790 795 800  
 Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile  
 805 810 815  
 Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met  
 820 825 830  
 Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys  
 835 840 845  
 Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly  
 850 855 860  
 Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp  
 865 870 875 880  
 Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser  
 885 890 895  
 Thr Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly  
 900

<210> 132  
 <211> 360  
 5 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

<400> 132  
 caggtgaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60  
 tcctgcaagg ctctggata cacattcact aactatgta tacactgggt gaagcaaaag 120  
 cctgggcagg gccttgagt gattggatat attaactctt acaatgatgg ctctaagtac 180  
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacatctc 300  
 gctaatacct actactactt tgactactgg ggccaaggca ccaactctcac agtctcctca 360

10 <210> 133  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 133  
 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

20 <210> 134

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

5 <400> 134  
 Ala Arg Met Gly Tyr  
 1 5

<210> 135  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 135  
 Ala Arg His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

15 <210> 136  
 <211> 349  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 136  
 Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Trp Pro  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu  
 20 25 30  
 Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val  
 35 40 45  
 Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly  
 50 55 60  
 Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr  
 85 90 95  
 Ala Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His  
 100 105 110  
 Tyr Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala  
 115 120 125  
 Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser  
 130 135 140  
 Ser Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Cys Ile Trp  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr His Gln Gly Leu  
 165 170 175  
 Phe His Pro Arg Ala Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu Gln Trp Pro  
 180 185 190  
 Asp Pro Arg His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val Phe Gly  
 195 200 205  
 Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu  
 210 215 220  
 Asn His Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Lys Ser Glu Ala  
 225 230 235 240  
 Ser Lys Lys Lys Thr Ala Gln Thr Val Leu Val Val Val Val Val Phe  
 245 250 255  
 Gly Ile Ser Trp Leu Pro His His Ile Ile His Leu Trp Ala Glu Phe  
 260 265 270  
 Gly Val Phe Pro Leu Thr Pro Ala Ser Phe Leu Phe Arg Ile Thr Ala  
 275 280 285  
 His Cys Leu Ala Tyr Ser Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala  
 290 295 300  
 Phe Leu Ser Glu Asn Phe Arg Lys Ala Tyr Lys Gln Val Phe Lys Cys  
 305 310 315 320  
 His Ile Arg Lys Asp Ser His Leu Ser Asp Thr Lys Glu Asn Lys Ser  
 325 330 335  
 Arg Ile Asp Thr Pro Pro Ser Thr Asn Cys Thr His Val  
 340 345

25 <210> 137  
 <211> 349



ES 2 770 033 T3

<212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 137

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

5

<210> 138  
 <211> 349  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 138

10

ES 2 770 033 T3

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

<210> 139  
 <211> 387  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 139

ES 2 770 033 T3

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

<210> 140  
 <211> 368  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 140  
 Met Ala Asp Ala Gln Asn Ile Ser Leu Asp Ser Pro Gly Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Val Ala Val Pro Val Val Phe Ala Leu Ile Phe Leu Leu Gly Thr  
 20 25 30

ES 2 770 033 T3

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

<210> 141  
 <211> 1050  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 141  
 atggagctgg cggcgggaa cctcagcgag ggcaacgoga gctggccgga gccccccgcc 60  
 ccggagcccg ggccgctggt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120  
 ggcctgatct tcgcgctggg tgtgctgggc aacagcctag tgatcaccgt gctggcgcgc 180  
 agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct gagcatcgcc 240  
 gacctggcct acctgctctt ctgcatcccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgcccacc 300  
 tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt gtccatgctg 360  
 gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcactcg 420  
 cggcgctcct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tgggcgctggg ctgcatctgg 480  
 gcgctgtcca ttgccatggc ctogcccgtg gcctaccacc agggcctctt ccaccgcgc 540  
 gccagcaacc agacccttctg ctgggagcag tggcccgacc ctgcgccaaa gaaggcctac 600  
 gtgggtgtgca ccttctgctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660  
 gccaaagtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtctgaagca 720  
 tccaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtggtgggtg tgggtgtttg aatctcctgg 780  
 ctgcgcgacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag ttttcccgtc gacgcccggc 840  
 tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaca gcaattcctc cgtgaatcct 900  
 atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960  
 cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa ataaaagtcg aatagacacc 1020  
 ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga 1050

10

<210> 142  
 <211> 1050  
 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 142

```

atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctggccgga gccccccgcc 60
ccggagcccg ggccgctggt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg tgtgctgggc aacagcctag tgatcacctg gctggcgcgc 180
agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcatcccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgcccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagtcc atccactact tcttcaccgt gtccatgctg 360
gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcaactg 420
cggcgctcct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tgggcgtggg ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctgcgccgtg gcctaccacc agggcctctt ccaccgcgcg 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgcacc ctgccacaa gaaggcctac 600
gtggtgtgca ccttctgctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtctgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtggtggttg tgggttttgg aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag ttttcccgtc gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaca gcaattcctc cgtgaatcct 900
atcatttatg ctttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa gtaaaagtcg aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga 1050

```

5

<210> 143

<211> 1050

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 143

```

atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctgtccgga gccccccgcc 60
ccggagcccg ggccgctggt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg cgtgctgggc aacagcctag tgatcacctg gctggcgcgc 180
agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcatcccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgcccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagtcc atccactact tcttcaccgt gtccatgctg 360
gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcaactg 420
cggcgctcct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tgggcgtggg ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctgcgccgtg gcctaccacc agggcctctt ccaccgcgcg 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgcacc ctgccacaa gaaggcctac 600
gtggtgtgca ccttctgctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtctgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtggtggttg tgggttttgg aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag ttttcccgtc gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaca gcaattcctc cgtgaatcct 900
atcatttatg ctttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa ataaagtcg aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga 1050

```

15

<210> 144

<211> 1164

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 144

ES 2 770 033 T3

```

atgaacgtct cgggctgccc aggggcccggg aacgcgagcc aggcgggctgg cgggggaggg 60
tggcaccocg aggcgggtcat cgtgccctctg ctcttcgctc tcatcttcct cgtgggcacc 120
gtgggcaaca cgtgggtgct ggcgggtgctg ctgcgcggcg gccaggcggc cagcactacc 180
aacctgttca tccttaacct gggcgtggcc gacctgtgtt tcatcctgtg ctgctgtccc 240
ttccaggcca ccatctacac cctggacggc tgggtgttcg gctcgtctct gtgcaaggcg 300
gtgcaactcc tcatcttcct caccatgcac gccagcagct tcacgctggc cgcctctcc 360
ctggacaggt atctggccat ccgctaccog ctgcaactcc gcgagctgcg cacgcctcga 420
aacgcgctgg cagccatcgg gctcatctgg gggctgtcgc tgcctcttc cggggccctac 480
ctgagctact accgccagtc gcagctggcc aacctgaccg tgtgccatcc cgcgtggagc 540
gccctcggcc gccgcgccat ggacatctgc accttcgtct tcagctacct gcttcctgtg 600
ctggttctcg gctgaccta cgcgcgcacc ttgcctacc tctggcgcgc cgtcgacccg 660
gtggccggcg gctcgggtgc ccggcgccgc aagcgaagg tgacacgcat gatcctcatc 720
gtggccggcg tctctgcct ctgctggatg ccccaccacg cgtcctcct ctgctgtgtg 780
ttcggccagt tcccgtcac gcgcgccact tatgcgttc gcacctctc gcacctggc 840
tcctacgcca actcctcgt caacccatc gtttacggc tggctctcaa gcactccgc 900
aaaggcttcc gcacgatctg cgcgggctg ctgggccgtg ccccaggccg agcctcgggc 960
cgtgtgtgcg ctgcgcgcg gggcaccac agtggcagcg tgttgagcg cagctccagc 1020
gacctgttc acatgagcga ggcggcggg gcccttcgt cctgccccg cgttcccag 1080
ccatgcatcc tcgagcctg tctggcccg tctggcagg gcccaaagg aggcgacagc 1140
atcctgacgg ttgatgtggc ctga 1164

```

<210> 145  
 <211> 1107  
 5 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

```

<400> 145
atggctgatg cccagaacat ttcactggac agcccagga gtgtgggggc cgtggcagtg 60
cctgtgtct ttgccctaat ctccctctg ggcacagtgg gcaatgggct ggtgctggca 120
gtgctcctgc agcctggccc gactgcctgg caggagcctg gcagcaccac ggacctgtc 180
atcctcaacc tggcgggtggc tgacctctgc ttcactctgt gctgcgtgcc cttccaggcc 240
accatctaca cgtgggatgc ctggctcttt ggggccctcg tctgcaaggc cgtgcacctg 300
ctcatctacc tcaccatgta cgcagcagc tttacgctgg ctgctgtctc cgtggacagg 360
tacctggccg tgcggcacc gctgcgctcg cgcgcctgc gcacgcccg taacgcccg 420
gccgcagtgg ggtggtgtg gctgctggcg gcgctcttc cggcgcccta cctcagctac 480
tacggcaccg tgcgctacgg cgcgctggag ctctgcgtgc ccgctggga ggacgcgcgc 540
cgccgcgcc tggacgtggc cacttcgct gccgctacc tgcgcccgt ggctgtggtg 600
agcctggcct acgggcgcac gctgcgctc ctgtgggccc ccgtgggtcc cgcggcgcg 660
gcccgcggcc aggcgcggcg gaggcgacg ggcgcgcgg gccgcgccat gctggcgggtg 720
gccgcgctct acgcgctctg ctggggctcc caccacgcgc tcatcctgtg cttctggtac 780
ggccgcttcg ccttcagccc ggccacctac gcctgcgcgc tggcctcaca ctgcctggcc 840
tacgccaaact cctgcctcaa ccgctcgtc tacgcgctcg cctcgcgcca cttccgcgcg 900
cgttccgcc gcctgtggcc gtgcggccgc cgacgcgcc accgtgcccg ccgcgccttg 960
cgtcgcgtcc gcccgcgct ctcgggccc cccgctgccc ccggagagcg ccggcctagc 1020
gggaggtgct tggctggtgg cggccagggc ccggagccc gggagggacc cgtccacggc 1080
ggagaggctg cccgaggacc ggaataa 1107

```

10 <210> 146  
 <211> 889  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Fragmento LHn/A

20 <221> VARIANTE  
 <222> (453)...(455)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 146

ES 2 770 033 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 Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu  
 50 55 60  
 Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu  
 85 90 95  
 Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val  
 100 105 110  
 Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys  
 115 120 125  
 Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr  
 130 135 140  
 Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile  
 145 150 155 160  
 Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr  
 165 170 175  
 Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe  
 180 185 190  
 Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu  
 195 200 205  
 Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu  
 210 215 220  
 Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn  
 225 230 235 240  
 Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu  
 245 250 255  
 Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys  
 260 265 270  
 Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn  
 275 280 285  
 Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val  
 290 295 300  
 Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys  
 305 310 315 320  
 Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu  
 325 330 335  
 Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp  
 340 345 350  
 Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn  
 355 360 365  
 Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr  
 370 375 380  
 Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn  
 385 390 395 400  
 Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu  
 405 410 415  
 Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg  
 420 425 430  
 Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Gly Gly Gly Glu Asn  
 435 440 445  
 Leu Tyr Phe Gln Xaa Xaa Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Gly Tyr  
 450 455 460  
 Asn Lys Ala Phe Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu  
 465 470 475 480  
 Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly  
 485 490 495

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

<210> 147

<211> 2661

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento LHn/A

10

<400> 147

atgccgttcg taaacaaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60  
 tatatcaaaa tcccgaatgc ggtcaaatg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120



ES 2 770 033 T3

```

aaaatttggg tgatcccgga gcgcgatacg ttcacgaacc cggaagaagg agatttaaac 180
ccaccgcctg aggctaaca ggtcccgtg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
gacaatgaaa aggacaacta cctgaaaggt gttaccaaac tgttcgagcg cattttattcg 300
acagatctcg gtcgcatggt gctgacttct attgtgagcg gcattccgtt ttgggggtggt 360
agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
gatgggagct accggtccga agagcttaac ctgtaatca ttggcccagag cgcggatatt 480
atccaattcg aatgtaaact ttttgggcat gaagtcctga atctgacgag gaatggctat 540
ggatcgacgc agtatattcg tttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
gaagttgata cgaaccctct tttaggcgcg ggaaaattcg cgacggaccg agcggtgacc 660
ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgtatg gaatcgccat taaccggaac 720
cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgat tacgagatgt cgggcttaga agtgtccttt 780
gaagaactgc gcacggttgg cggtcgatg gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaac 840
gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
aaaagcattg tgggtaccac ggtagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaa 960
tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggctc 1080
ttgaatcgga aaacttatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
aaagtttaac acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
tttaacggcc agaacaccga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtccgaggta ttatcaccag caaaaccaa 1320
tccttgggag gtggtggcga aaacctgtac ttccagggcg gtggcgggtg tgataagggc 1380
tataacaagg ccttcaatga tttatgcac aagtggaaca actgggactt gtttttctct 1440
ccatctgaag ataattttac taacgacttg aacaaggag aggaaattac ttccgatacc 1500
aacatcgaag cagcgggaag gaattattag ctgatctta ttcaacaata ttacctgacc 1560
tttaattttg ataacgagcc tgagaacatt tccattgaga atctcagctc tgacatcatc 1620
ggccagctgg aactgatgcc gaatatcga cgctttccta atggaaagaa atatgaattg 1680
gacaaatata ccatgttcca ctatctccgc gcgcaggagt ttgagcacgg caagtctcgt 1740
attgctctga ccaattcggg aaacgaagcc cttttaaatc cttcgcgtgt gtacaccttt 1800
ttctcaagcg attatgttaa aaaagtgaac aaggcgaccg aagcggcgat gtttttggga 1860
tgggtggaac aactggtata tgactttacg gatgaaactt ctgaagtctc gaccaccgac 1920
aaaattgccc atattacatc tatcattccc tatattggcc ctgcaactgaa cattggtaac 1980
atgctgtata aagatgattt tgtgggccc ctgatctttt caggcgctgt tatcctgctg 2040
gaatttatcc cggaaatcgc cattccagta ctcggtacct ttgcgctggt gtcctatatac 2100
gcaaacaaaag ttttgactgt ccagacgac gacaacgagc tcagtaaacg taacgaaaa 2160
tgggatgagg tgtataagta tattgttacc aactggctcg ctaaagtaaa caccagatt 2220
gacctgattc gcaagaagat gaaagaagcg ctggaaaacc aagcagaagc gaccaaagct 2280
attatcaact atcaatataa ccagtacaca gaggaagaaa agaataacat caactcaac 2340
atcgacgact tatcttcaaa gctgaatgaa tctattaaca aagcgatgat taatattaac 2400
aagttcttga accaatgtag tgtcagctat ctgatgaact cgatgatccc ttacggtgtg 2460
aaacgtctgg aagacttcga tgcaagcctt aaagatgccc ttctgaagta tatttacgat 2520
aatcgcgga ctcttattgg ccaagtggat cgcttaaaag ataaagtcaa caacacgctg 2580
agtacaaca tccttttca gctgtctaaa tatgtggaca atcagcgctt gctgtccacg 2640
caccatcacc atcaccacta a a 2661

```

<210> 148

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico directo ORL-1

10

<400> 148

cactcggctg gtgctggtg

20

<210> 149

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico inverso ORL-1

20

<400> 149

aatggccacg gcagttcgc

20

25 <210> 150

<211> 20

<212> ADN

## ES 2 770 033 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador oligonucleotídico directo del receptor de galanina 1	
	<400> 150	
	ccccatcatg tcatccacct	20
10	<210> 151	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico inverso del receptor de galanina 1	
	<400> 151	
	atggggttca ccgaggagt	20
20	<210> 152	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico directo del receptor de galanina 2	
	<400> 152	
30	catcgtggcg gtgcttt	18
	<210> 153	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico inverso del receptor de galanina 2	
	<400> 153	
40	agcgggaagc gaccaaac	18

## REIVINDICACIONES

1. Método para detectar actividad endopeptidasa redirigida, comprendiendo el método las etapas de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida, en el que la célula de una línea celular establecida es susceptible a la actividad endopeptidasa redirigida por una endopeptidasa redirigida; b) aislar de la línea celular tratada un componente SNAP-25 que comprende un producto de escisión de SNAP-25 que tiene un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A; c) poner en contacto al componente SNAP-25 con un anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP-25; en el que la detección por el complejo anticuerpo-antígeno es indicativa de actividad endopeptidasa redirigida; en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se une a un epítipo que comprende un extremo carboxilo en el residuo P<sub>1</sub> del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25 y en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 aislado tiene una V<sub>H</sub>CDR1 de SEQ ID NO: 93, una V<sub>H</sub>CDR2 de SEQ ID NO: 96, una V<sub>H</sub>CDR3 de SEQ ID NO: 100, una V<sub>L</sub>CDR1 de SEQ ID NO: 105, una V<sub>L</sub>CDR2 de SEQ ID NO: 110 y una V<sub>L</sub>CDR3 de SEQ ID NO: 115.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 se enlaza a un soporte de fase sólida.
3. Método según la reivindicación 2, que comprende una etapa de fijar el componente SNAP-25 a dicho soporte de fase sólida.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la célula es susceptible a actividad endopeptidasa redirigida en aproximadamente 500 nM o menos, en aproximadamente 400 nM o menos, en aproximadamente 300 nM o menos, en aproximadamente 200 nM o menos, en aproximadamente 100 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la célula puede absorber aproximadamente 500 nM o menos, aproximadamente 400 nM o menos, aproximadamente 300 nM o menos, aproximadamente 200 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos de endopeptidasa redirigida.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 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 endopeptidasa redirigida.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la muestra comprende aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos o aproximadamente 0,1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno se detecta por un análisis inmunoblot, un análisis de inmunoprecipitación, un ELISA o un ELISA en sándwich.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 tiene una constante de velocidad de asociación para un epítipo que no comprende glutamina carboxilo terminal del enlace escindible del sitio de escisión de BoNT/A de un producto de escisión de SNAP-25 de menos de  $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; y en el que el anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 tiene una constante de disociación de equilibrio para el epítipo de menos de 0,450 nM.
10. Anticuerpo  $\alpha$ -SNAP-25 monoclonal aislado que tiene una V<sub>H</sub>CDR1 de SEQ ID NO: 93, una V<sub>H</sub>CDR2 de SEQ ID NO: 96, una V<sub>H</sub>CDR3 de SEQ ID NO: 100, una V<sub>L</sub>CDR1 de SEQ ID NO: 105, una V<sub>L</sub>CDR2 de SEQ ID NO: 110 y una V<sub>L</sub>CDR3 de SEQ ID NO: 115.

FIG. 1A.

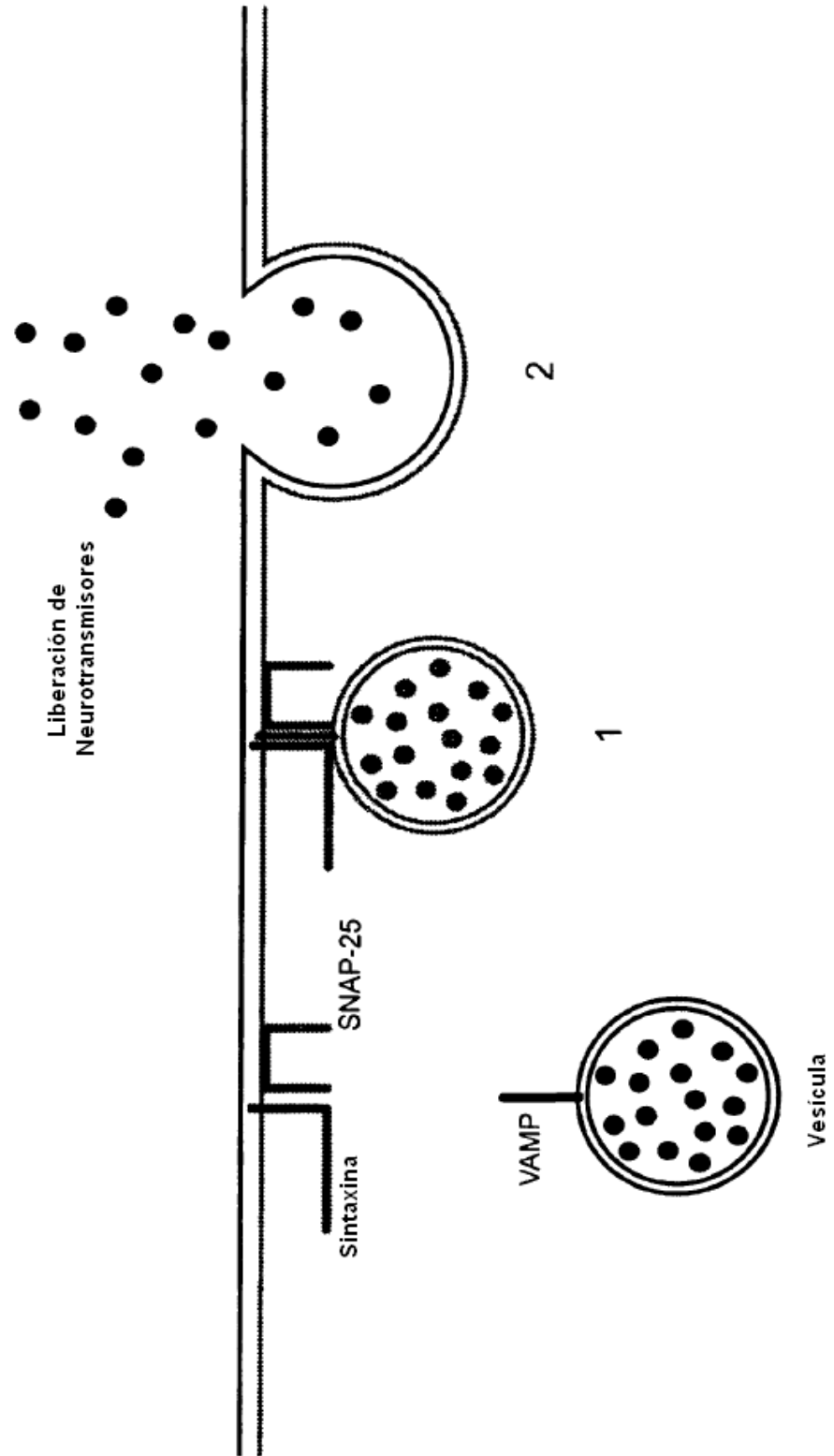
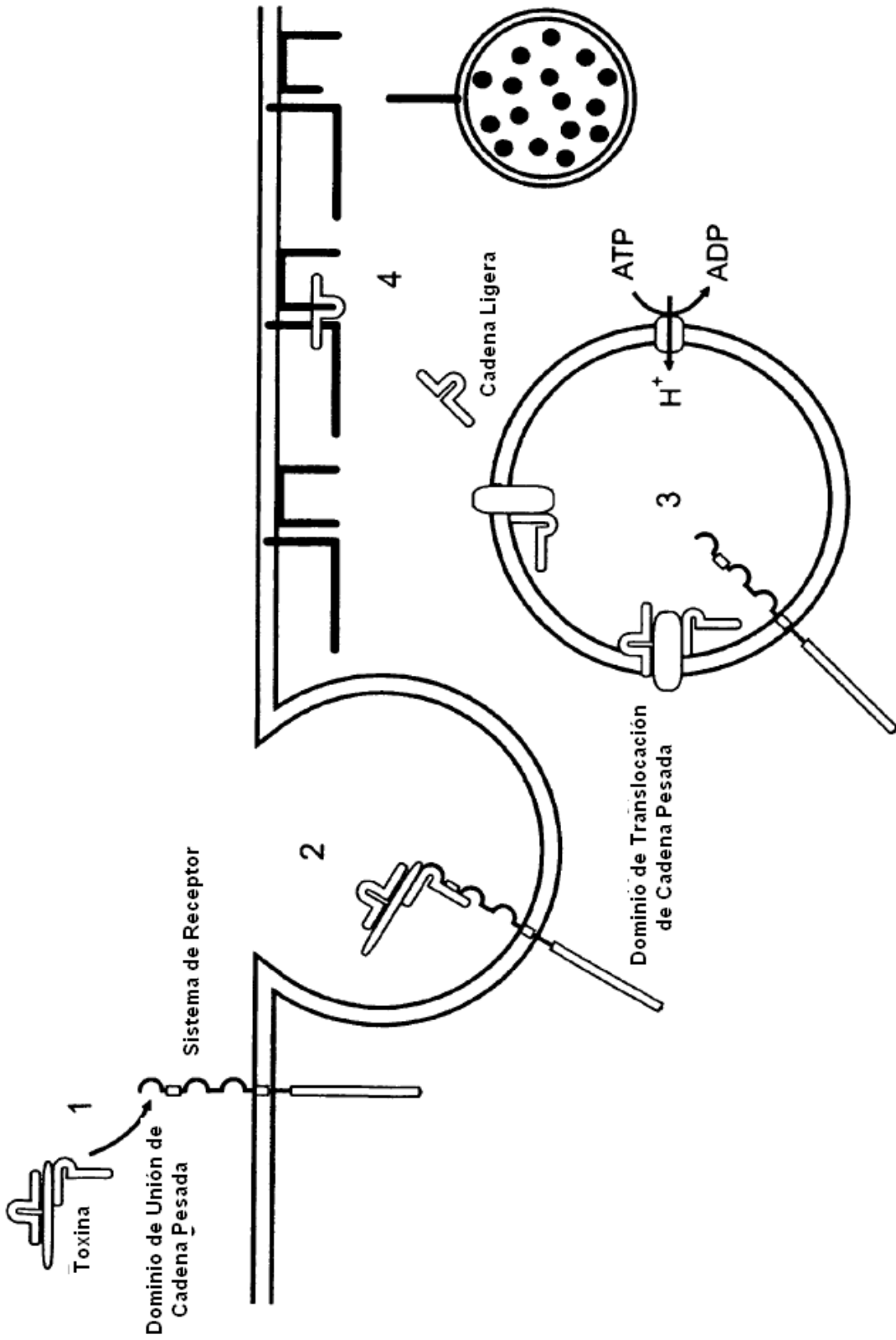


FIG. 1B.



**FIG. 2.**

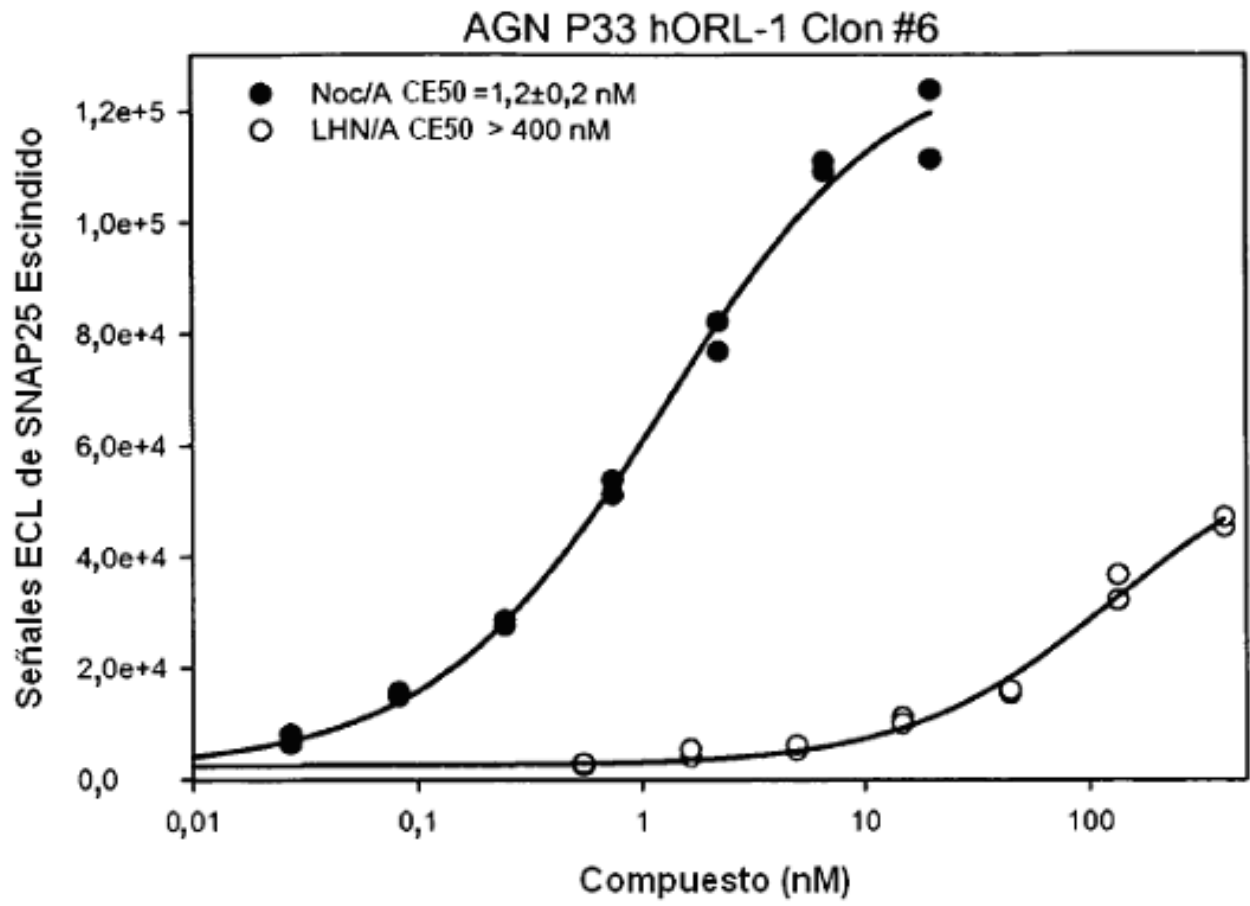


FIG. 3.

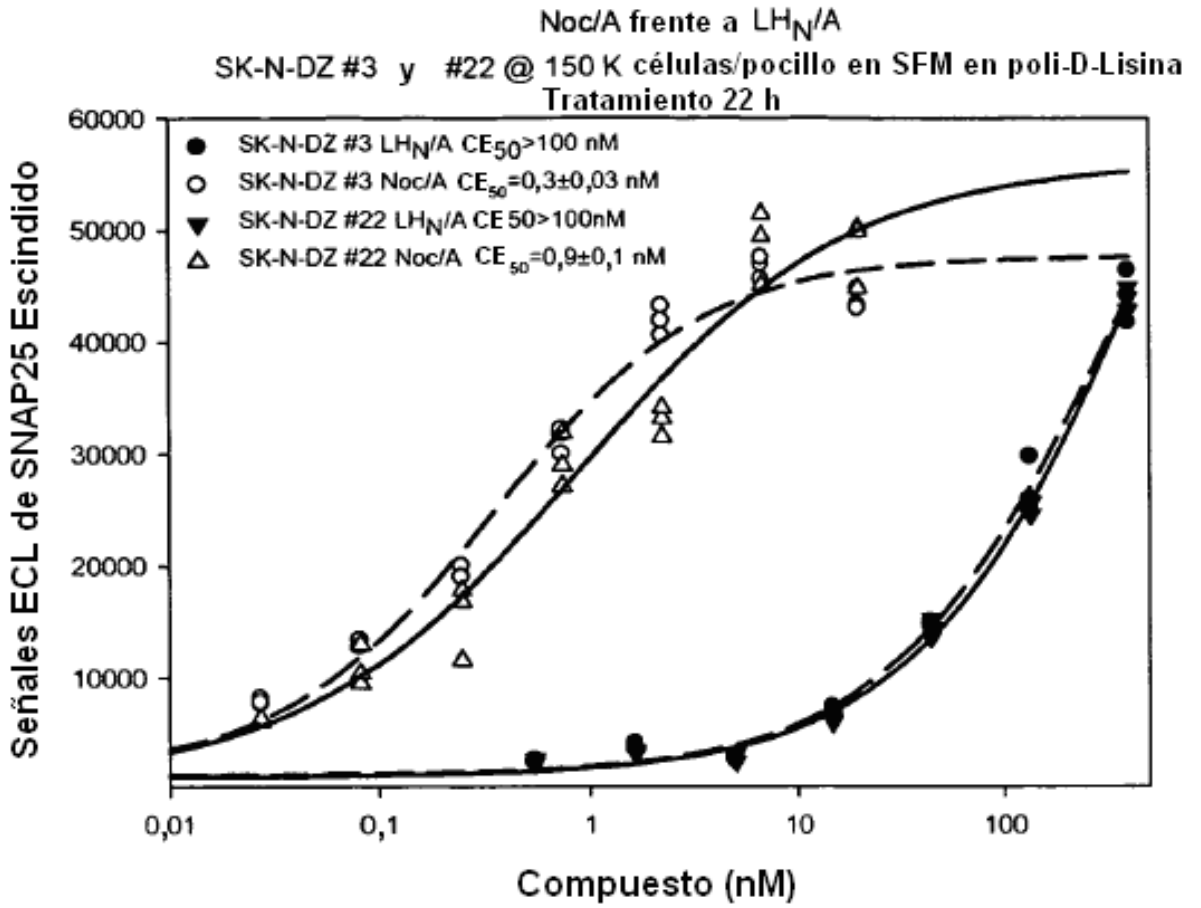


FIG. 4.

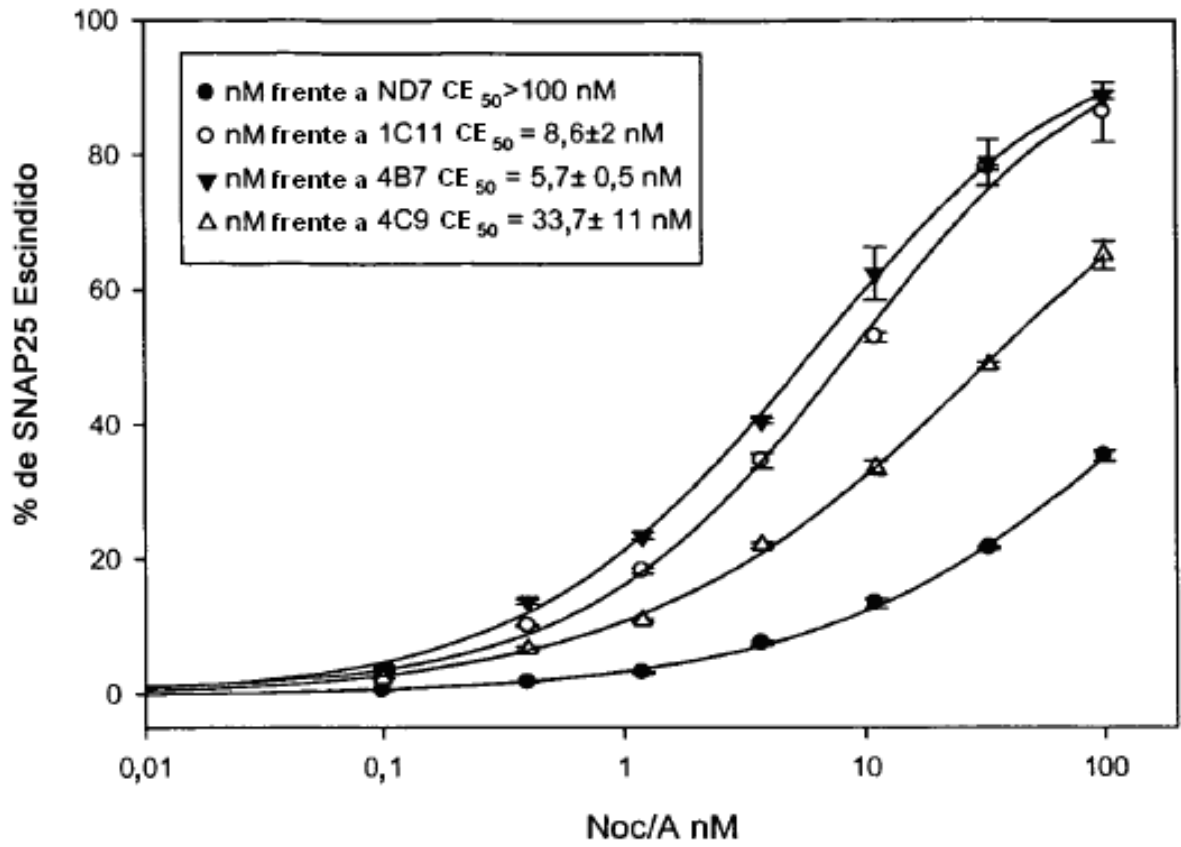
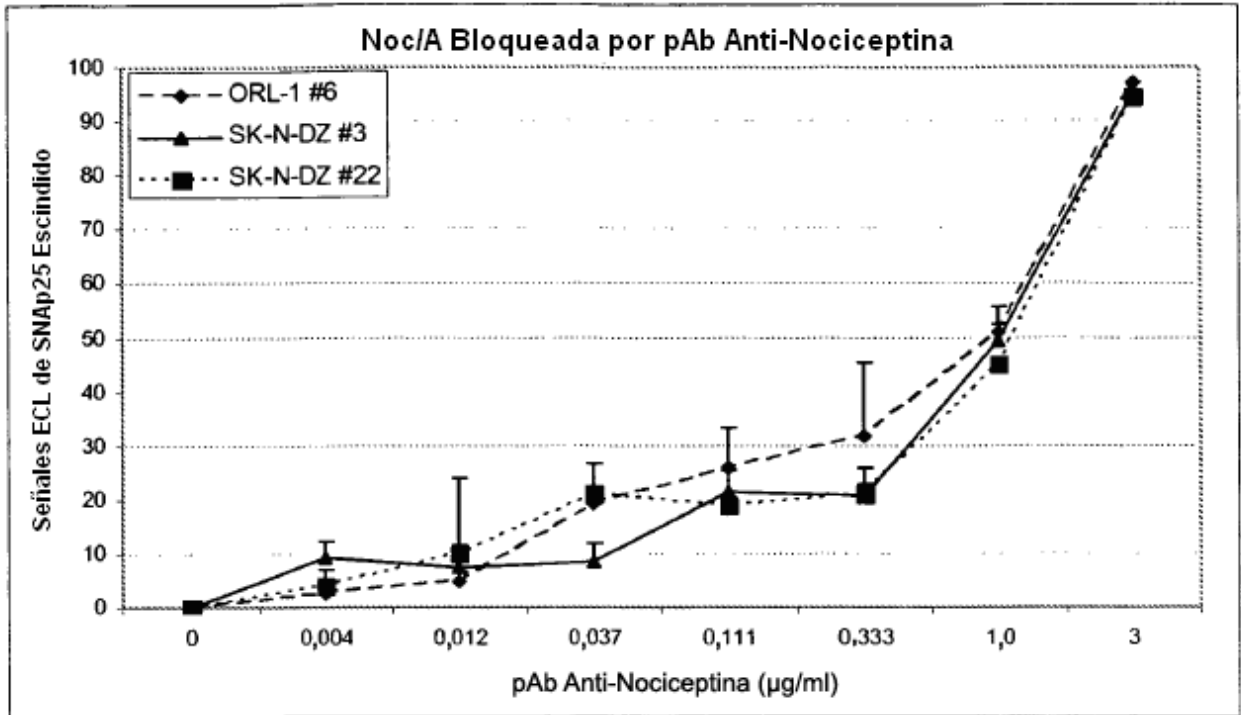




FIG. 5.



**FIG. 6.**

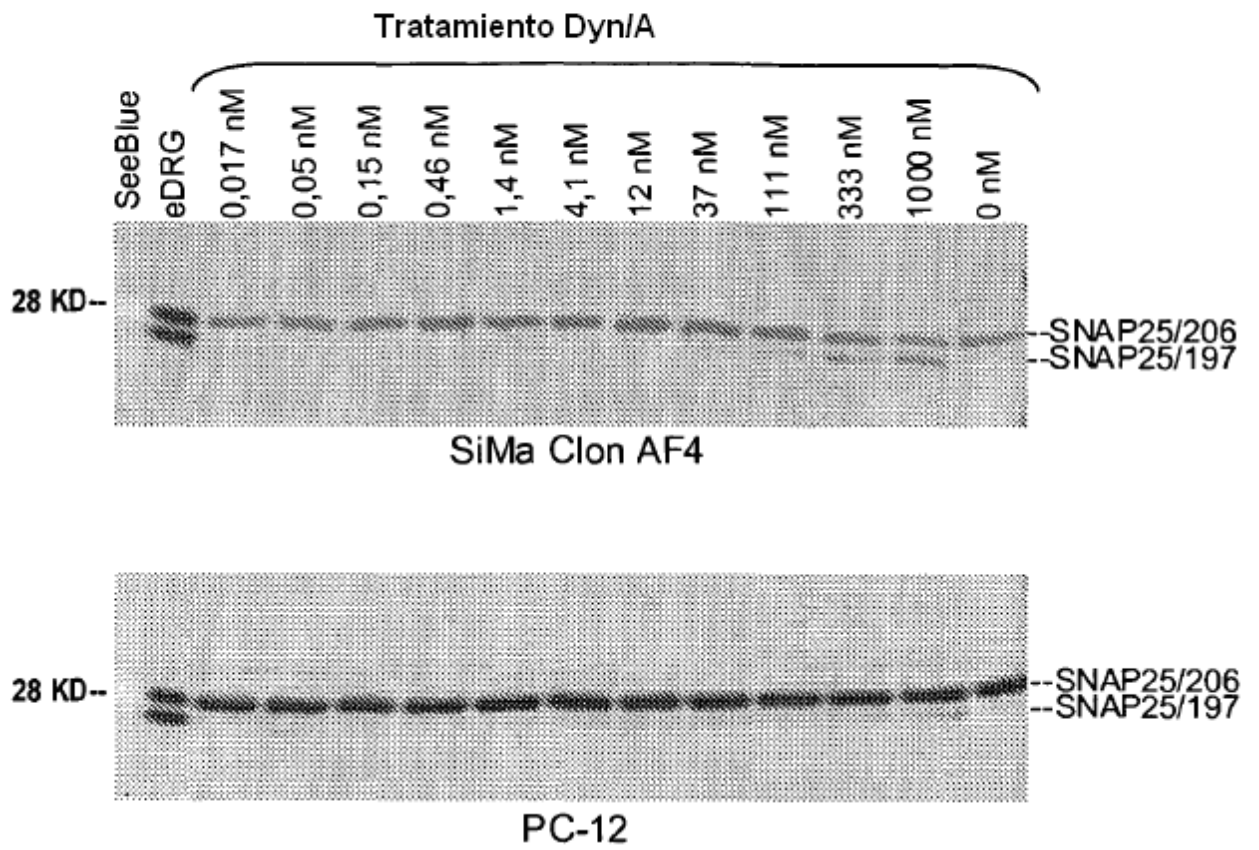


FIG. 7A.

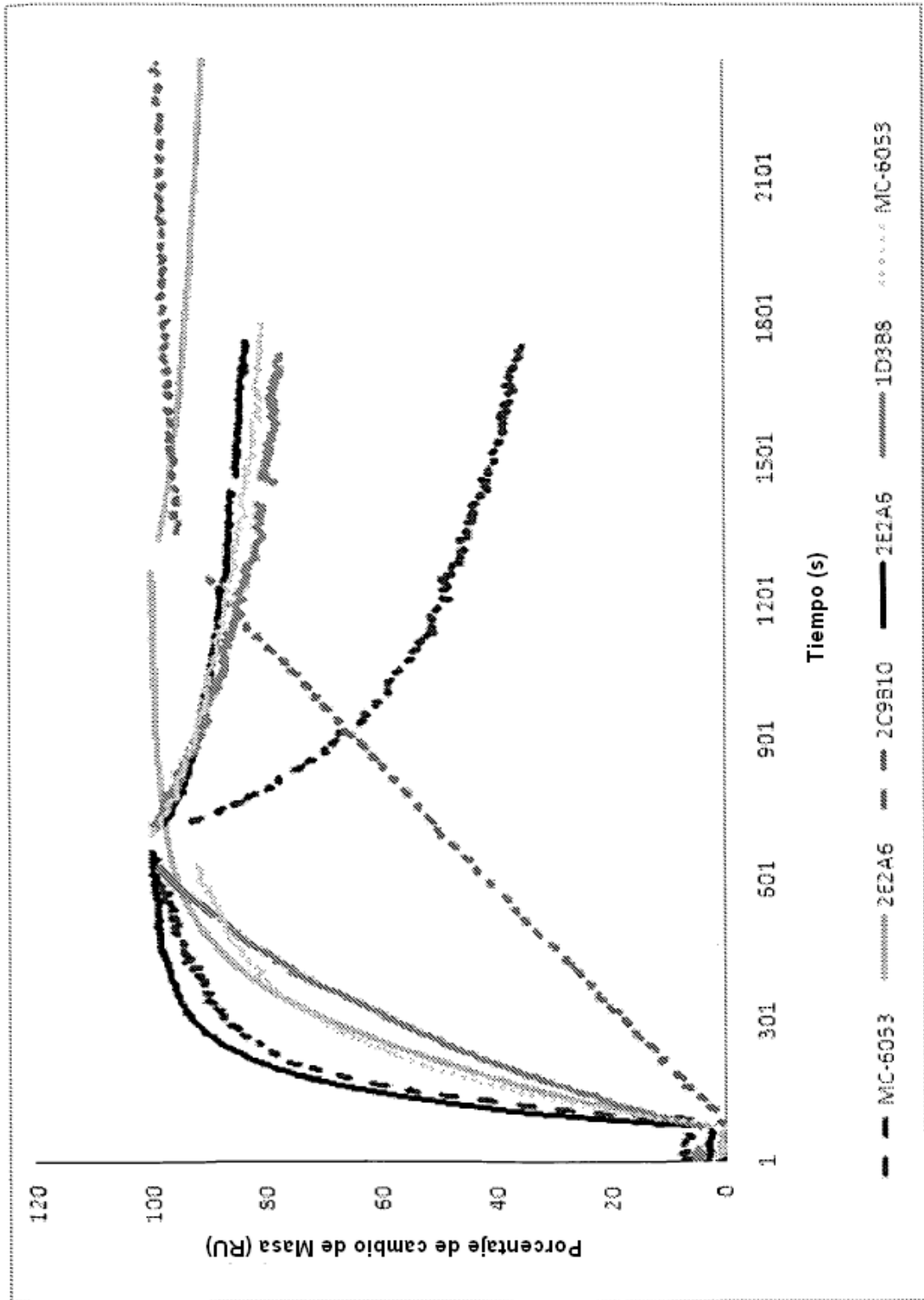


FIG. 7B.

