

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 911**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

C07K 14/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2016** **PCT/EP2016/000962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016** **WO16198163**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2016** **E 16738667 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020** **EP 3307302**

54 Título: **Nuevas neurotoxinas costridiales recombinantes con mayor duración del efecto**

30 Prioridad:

11.06.2015 EP 15001733

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

02.10.2020

73 Titular/es:

MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA (100.0%)
Eckenheimer Landstrasse 100
60318 Frankfurt am Main, DE

72 Inventor/es:

FREVERT, JUERGEN;
HOFMANN, FRED;
SCHMIDT, MICHAEL;
LOPEZ DE LA PAZ, MANUELA y
SCHEPS, DANIEL

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 784 911 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

Nuevas neurotoxinas clostridiales recombinantes con mayor duración del efecto

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a nuevas neurotoxinas clostridiales recombinantes que exhiben una mayor duración del efecto y a métodos para la fabricación de dichas neurotoxinas clostridiales recombinantes. Estas nuevas neurotoxinas clostridiales recombinantes comprenden un segmento de proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos (Xaa)x-
 10 [(P,A,S)y-(Xaa)-]z(P,A,S)y-(Xaa)x, y los métodos comprenden las etapas de insertar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho segmento de proteína en una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una neurotoxina clostridial parental y la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos recombinante que comprende dicha secuencia que codifica el segmento de proteína en una célula huésped. La invención se refiere, además, a nuevas neurotoxinas clostridiales precursoras monocatenarias recombinantes usadas en dichos métodos, secuencias de ácidos nucleicos que codifican
 15 dichas neurotoxinas clostridiales precursoras monocatenarias recombinantes y composiciones farmacéuticas que comprenden la neurotoxina clostridial recombinante con mayor duración del efecto.

Antecedentes de la invención

20 Clostridium es un género de bacterias anaerobias gram-positivas, pertenecientes a las Firmicutes. Clostridium consta de alrededor de 100 especies que incluyen bacterias comunes de vida libre, así como también patógenos importantes, tales como *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani*. Ambas especies producen neurotoxinas, la toxina botulínica y la toxina tetánica, respectivamente. Estas neurotoxinas son potentes inhibidores de la secreción de neurotransmisores dependiente de calcio de las células neuronales y se encuentran entre las toxinas más fuertes conocidas por el hombre. La dosis letal
 25 en humanos se encuentra entre 0,1 ng y 1 ng por kilogramo de peso corporal.

La ingestión oral de la toxina botulínica a través de alimentos contaminados o la generación de la toxina botulínica en las heridas puede provocar botulismo, que se caracteriza por la parálisis de diversos músculos. La parálisis de los músculos respiratorios puede provocar la muerte del individuo afectado.

30 Aunque tanto la neurotoxina botulínica (BoNT) como la neurotoxina tetánica (TxNT) funcionan mediante un mecanismo de acción fisiológico inicial similar, al inhibir la liberación de neurotransmisores desde el axón de la neurona afectada hacia la sinapsis, difieren en su respuesta clínica. Mientras que la toxina botulínica actúa en la unión neuromuscular y otras sinapsis colinérgicas en el sistema nervioso periférico, al inhibir la liberación del neurotransmisor acetilcolina lo que
 35 provoca de esta manera parálisis flácida, la toxina tetánica actúa principalmente en el sistema nervioso central, al impedir la liberación de los neurotransmisores inhibidores GABA (ácido gamma-aminobutírico) y glicina al degradar la proteína sinaptobrevina. La consiguiente hiperactividad en los músculos resulta en contracciones generalizadas de la musculatura agonista y antagonista, denominada espasmo tetánico (parálisis rígida).

40 Si bien la neurotoxina tetánica existe en un tipo inmunológicamente distinto, se conoce que las neurotoxinas botulínicas se producen en siete tipos inmunogénicos diferentes, denominados BoNT/A hasta BoNT/G. La mayoría de las cepas de *Clostridium botulinum* producen un tipo de neurotoxina, pero también se han descrito cepas que producen múltiples toxinas.

45 Las neurotoxinas botulínicas y tetánicas tienen secuencias de aminoácidos altamente homólogas y muestran una estructura de dominio similar. Su forma biológicamente activa comprende dos cadenas peptídicas, una cadena ligera de aproximadamente 50 kDa y una cadena pesada de aproximadamente 100 kDa, unidas por un enlace disulfuro. Un enlazador o región de bucle, cuya longitud varía entre las diferentes toxinas clostridiales, se ubica entre los dos residuos de cisteína que forman el enlace disulfuro. Esta región de bucle se escinde proteolíticamente por una endoproteasa
 50 clostridial desconocida para obtener la toxina biológicamente activa.

El mecanismo molecular de intoxicación por TxNT y BoNT también parece ser similar: la entrada en la neurona objetivo se media por la unión de la parte C-terminal de la cadena pesada a un receptor específico de la superficie celular; a continuación la toxina se capta por endocitosis mediada por receptor. El pH bajo en el endosoma formado de esta forma
 55 desencadena a continuación un cambio conformacional en la toxina clostridial que le permite incrustarse en la membrana endosómica y translocarse a través de la membrana endosómica hacia el citoplasma, donde el enlace disulfuro que une la cadena pesada y la cadena ligera se reduce. La cadena ligera puede escindir entonces selectivamente las llamadas proteínas SNARE, que son esenciales para diferentes etapas de liberación de neurotransmisores en la hendidura sináptica, por ejemplo, reconocimiento, anclaje y fusión de vesículas que contienen neurotransmisores con la membrana plasmática. TxNT, BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F y BoNT/G provocan la escisión proteolítica de la sinaptobrevina o VAMP (proteína de membrana asociada a vesículas), BoNT/A y BoNT/E escinden la proteína SNAP-25 asociada a la membrana plasmática, y BoNT/C escinde la proteína syntaxina integrada en la membrana plasmática y SNAP-25.

65 Las neurotoxinas clostridiales muestran duraciones de acción variables que son específicas del serotipo. El efecto terapéutico clínico de BoNT/A dura aproximadamente 3 meses para los trastornos neuromusculares y de 6 a 12 meses para la hiperhidrosis. Los efectos de BoNT/E, por otro lado, duran menos de 4 semanas. El efecto terapéutico más

- duradero de BoNT/A la hace preferible para el uso clínico en comparación con otros serotipos, por ejemplo, los serotipos B, C₁, D, E, F y G. Una posible explicación para las duraciones de acción divergentes podría ser las distintas localizaciones subcelulares de los serotipos de BoNT. El dominio de proteasa de la cadena ligera de BoNT/A se localiza de manera puntual en la membrana plasmática de las células neuronales, donde se colocaliza con su sustrato SNAP-25. Por el contrario, el serotipo BoNT/E de corta duración es citoplasmático. La asociación a la membrana podría proteger a la BoNT/A de los mecanismos de degradación citosólica, lo que permitiría una persistencia prolongada de la BoNT/A en la célula neuronal.
- En *Clostridium botulinum*, la toxina botulínica se forma como un complejo proteico que comprende el componente neurotóxico y proteínas no tóxicas. Las proteínas auxiliares incrustan el componente neurotóxico, lo que lo protege de esta manera de la degradación por enzimas digestivas en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, las neurotoxinas botulínicas de la mayoría de los serotipos son tóxicas por vía oral. Los complejos con, por ejemplo, 450 kDa o con 900 kDa pueden obtenerse de cultivos de *Clostridium botulinum*.
- En los últimos años, las neurotoxinas botulínicas se han usado como agentes terapéuticos en el tratamiento de distonías y espasmos. Las preparaciones que comprenden complejos de toxina botulínica están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Ipsen Ltd (Dysport®) o Allergan Inc. (Botox®). Un componente neurotóxico de alta pureza, libre de cualesquiera proteínas complejantes, está disponible, por ejemplo, en Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt (Xeomin®).
- Las neurotoxinas clostridiales se inyectan generalmente en el tejido muscular afectado, lo que acerca el agente a la placa terminal neuromuscular, es decir, cerca del receptor celular que media su captación en la célula nerviosa que controla dicho músculo afectado. Se han observado diversos grados de propagación de neurotoxinas. Se cree que la propagación de neurotoxinas depende de la cantidad inyectada y de la preparación particular de la neurotoxina. Puede provocar efectos secundarios adversos, tales como parálisis en el tejido muscular cercano, que puede evitarse en gran medida al reducir las dosis inyectadas al nivel relevante terapéuticamente. La sobredosis puede desencadenar, además, que el sistema inmunitario genere anticuerpos neutralizantes que inactivan la neurotoxina lo que impide que alivie la actividad muscular involuntaria. Se ha demostrado que la tolerancia inmunológica a la toxina botulínica se correlaciona con las dosis acumulativas.
- En la actualidad, las neurotoxinas clostridiales aún se producen predominantemente por procesos de fermentación mediante el uso de cepas de *Clostridium* apropiadas. Sin embargo, la producción industrial de neurotoxina clostridial a partir del cultivo anaeróbico de *Clostridium* es un proceso engorroso y lento. Debido a la alta toxicidad del producto final, el procedimiento debe realizarse con estricta contención. Durante el proceso de fermentación, los precursores monocatenarios se escinden proteolíticamente por una proteasa clostridial desconocida para obtener la neurotoxina clostridial bicatenaria biológicamente activa. El grado de activación de neurotoxinas por escisión proteolítica varía entre diferentes cepas y serotipos de neurotoxinas, lo cual es una consideración importante para la fabricación debido al requerimiento de preparaciones de neurotoxinas con una actividad biológica bien definida. Además, durante los procesos de fermentación que usan cepas de *Clostridium*, las neurotoxinas clostridiales se producen como complejos proteicos, en los que el componente neurotóxico se incrusta en las proteínas auxiliares. Estas proteínas accesorias no tienen ningún efecto beneficioso sobre la actividad biológica o la duración del efecto. Sin embargo, pueden desencadenar una reacción inmunitaria en el paciente, lo que resulta en inmunidad contra la neurotoxina clostridial. La fabricación de neurotoxinas clostridiales recombinantes, que no se incrustan en las proteínas auxiliares, podría ser por lo tanto ventajosa.
- Los métodos para la expresión recombinante de neurotoxinas clostridiales en *E. coli* se conocen bien en la técnica (ver, por ejemplo, los documentos WO 00/12728, WO 01/14570 o WO 2006/076902). Además, las neurotoxinas clostridiales se han expresado en sistemas de expresión eucariotas, tales como *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Saccharomyces cerevisiae*, células de insecto y células de mamífero (ver el documento WO 2006/017749).
- Las neurotoxinas clostridiales recombinantes pueden expresarse como precursores monocatenarios, que posteriormente tienen que escindirse proteolíticamente para obtener la neurotoxina clostridial biológicamente activa final. Por lo tanto, las neurotoxinas clostridiales pueden expresarse con alto rendimiento en bacterias de crecimiento rápido como polipéptidos monocatenarios relativamente no tóxicos.
- Además, podría ser ventajoso modificar las características de la neurotoxina clostridial con respecto a la actividad biológica, la especificidad celular, el potencial antigénico y la duración del efecto mediante ingeniería genética para obtener neurotoxinas recombinantes con nuevas propiedades terapéuticas en áreas clínicas específicas. La modificación genética de las neurotoxinas clostridiales podría permitir alterar el modo de acción o expandir la gama de objetivos terapéuticos.
- El documento WO 96/39166 describe análogos de toxina botulínica que comprenden residuos de aminoácidos que son más resistentes a la degradación en el tejido neuromuscular.
- La familia de patentes basada en el documento WO 02/08268 (lo que incluye el miembro de la familia US 6,903,187) describe una neurotoxina clostridial que comprende una modificación estructural seleccionada de la adición o delección de un motivo basado en leucina, que altera la persistencia biológica de la neurotoxina (ver, además: Fernández-Salas y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (2004) 3208-3213; Wang y otros, J. Biol. Chem. 286 (2011) 6375-6385). Fernández-Salas y otros plantearon inicialmente la hipótesis de que el aumento de la persistencia se debía a las propiedades de

unión a la membrana del motivo de dileucina (ver Fernández-Salas y otros, loc. cit., páginas 3211 y 3213). Wang y otros mencionan esta teoría de la membrana (ver Wang y otros, loc. cit., p. 6376, columna izquierda, último párrafo completo, y p. 6383, primer párrafo completo de "Discusión"), pero favorecen una teoría alternativa: la protección contra la degradación por proteólisis (ver Wang y otros, loc. cit., p. 6384, columna izquierda, líneas 27ff).

El documento US 2002/0127247 describe neurotoxinas clostridiales que comprenden modificaciones en sitios de modificación secundaria y exhiben una persistencia biológica alterada.

Las variantes de toxina botulínica que exhiben vidas medias biológicas más largas en el tejido neuromuscular que las toxinas botulínicas de origen natural serían ventajosas para reducir la frecuencia de administración y la incidencia de la generación de anticuerpos neutralizantes ya que la tolerancia inmunológica a la toxina botulínica se correlaciona con las dosis acumulativas.

Además, los serotipos de BoNT que exhiben naturalmente una corta duración de la acción podrían usarse potencialmente de manera eficaz en aplicaciones clínicas, si su persistencia biológica pudiera mejorarse. La BoNT/E modificada con una mayor duración de la acción podría usarse potencialmente en pacientes que exhiben una reacción inmunitaria contra la BoNT/A. Además, se demostró que BoNT/E induce un bloqueo más severo de la liberación del mediador del dolor de las neuronas sensoriales que BoNT/A. En aplicaciones clínicas donde BoNT/A proporciona solo un alivio parcial del dolor o solo en un subconjunto de pacientes, tal como en el tratamiento de dolores de cabeza, o donde se ha encontrado que BoNT/E es más eficaz que BoNT/A pero solo proporciona una terapia a corto plazo, tal como en el tratamiento de la epilepsia, una BoNT/E con una mayor duración del efecto podría resultar útil.

Existe una fuerte demanda de producir neurotoxinas clostridiales con una mayor duración del efecto, para permitir la reducción de la frecuencia de administración y la explotación del potencial terapéutico de los serotipos de BoNT, que hasta ahora se han considerado poco prácticos para la aplicación clínica debido a la corta vida media del efecto relevante clínicamente respectivo. Idealmente, la duración del efecto de una neurotoxina clostridial en particular podría ajustarse de manera personalizada para abordar cualquier característica y demanda particulares de una indicación dada, tal como la cantidad de neurotoxina que se administra, la frecuencia de administración, etcétera. Hasta la fecha, dichos aspectos no se han resuelto satisfactoriamente.

Objetos de la invención

Fue un objeto de la invención proporcionar neurotoxinas clostridiales recombinantes que exhiban una mayor duración del efecto y establecer un método confiable y preciso para fabricar y obtener dichas neurotoxinas clostridiales recombinantes. Dicho método y las nuevas neurotoxinas clostridiales precursoras usadas en dichos métodos servirían para satisfacer la gran necesidad de neurotoxinas clostridiales recombinantes que exhiban una mayor duración del efecto.

Sumario de la invención

Los serotipos de toxina botulínica de origen natural muestran duraciones de efecto altamente divergentes, debido probablemente a su distinta localización subcelular. Se demostró que BoNT/A, que exhibe la persistencia más larga, se localiza en la vecindad de la membrana plasmática de las células neuronales, mientras que el serotipo BoNT/E de corta duración es citosólico. Sin embargo, factores adicionales tales como las tasas de degradación, difusión y/o translocación podrían tener un impacto decisivo en las diferencias en la duración del efecto para los serotipos individuales de la toxina botulínica.

Hasta el momento, no se dispone de un método aplicable generalmente para modificar las neurotoxinas clostridiales para aumentar su duración del efecto. Sorprendentemente, se ha encontrado que las neurotoxinas clostridiales recombinantes que tienen dichos efectos pueden obtenerse mediante la clonación de una secuencia que codifica un dominio de enrollamiento al azar en un gen que codifica una neurotoxina clostridial parental, y mediante la posterior expresión heteróloga del constructo generado en células huésped recombinantes.

Por lo tanto, la presente solicitud se refiere a una neurotoxina clostridial recombinante que comprende un dominio de enrollamiento al azar.

En un aspecto, la invención se refiere a una neurotoxina clostridial recombinante que comprende un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, en donde (i) dicho segmento de proteína consiste en la secuencia de aminoácidos $(Xaa)_x-[(P,A,S)_y-(Xaa)-]_z-(P,A,S)_y-(Xaa)_x$, en donde Xaa es un residuo de aminoácido seleccionado independientemente de cualquier residuo de aminoácido de origen natural, siempre y cuando al menos un Xaa en $[(P,A,S)_y-(Xaa)-]_z$ es diferente de un residuo de alanina, serina o prolina; (P,A,S) representa un residuo de aminoácido seleccionado independientemente de un residuo de alanina (A), uno de serina (S) y uno de prolina (P); x es un número seleccionado independientemente de 0 y 1; y es un número seleccionado independientemente de 3 y 4; y z es 9 o más.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la neurotoxina clostridial recombinante de la presente invención.

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de la composición de la presente invención para el tratamiento cosmético.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la generación de la neurotoxina clostridial recombinante de la presente invención, que comprende la etapa de obtener una secuencia de ácidos nucleicos recombinante que codifica una neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante mediante la inserción de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, en particular un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos de acuerdo con la presente solicitud, en una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una neurotoxina clostridial parental.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante que comprende un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, en particular un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos de acuerdo con la presente solicitud.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para obtener la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, que comprende la etapa de insertar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, en particular un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos de acuerdo con la presente solicitud, en una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una neurotoxina clostridial parental.

La presente solicitud se refiere, además, a un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, o la secuencia de ácidos nucleicos que puede obtenerse por el método de la presente invención.

La presente solicitud se refiere, además, a una célula huésped recombinante que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, la secuencia de ácidos nucleicos que puede obtenerse por el método de la presente invención, o el vector de la presente solicitud.

La presente solicitud se refiere, además, a un método para producir la neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante de la presente invención, que comprende la etapa de expresar la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, o la secuencia de ácidos nucleicos que puede obtenerse por el método de la presente invención, o el vector de la presente solicitud en una célula huésped recombinante, o cultivar la célula huésped recombinante de la presente solicitud en condiciones que resultan en la expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos.

Figuras

Figura 1: Presentación esquemática de la toxina botulínica A PASilada (PAS-rBoNT/A).

Figura 2: SDS-PAGE de PAS-rBoNT/A purificada. Antes de aplicar las muestras al gel, se añadió β-mercaptoetanol. Carril "v.A.": PAS-rBoNT/A monocatenaria purificada, no activada, que tiene un peso molecular (Mw) de aproximadamente 175 kDa. Los carriles "n.A." (después de la activación) y "n.R." (después de la purificación) muestran la cadena ligera (PAS-Lc) y la cadena pesada (Hc) obtenidas después de la activación por trombina en condiciones reductoras. La cadena ligera corre con un Mw aparente de aproximadamente 110 kDa muy por encima del Mw teórico de aproximadamente 75 kDa.

Figura 3: Ensayo de carrera del ratón con PAS200-rBoNT/A: ■: PAS200-rBoNT/A; ●: media del estándar (54 ensayos) de Xeomin 81 208 (0,6 U)

Figura 4: Ensayo de carrera del ratón con PAS100-rBoNT/A: ■: PAS100-rBoNT/A; ●: media del estándar (54 ensayos) de Xeomin 81 208 (0,6 U)

Figura 5: Ensayo de carrera del ratón con VPASA100 rBoNT/A: ■: (2) VPASA100 rBoNT/A; ●: media del estándar (54 ensayos) de Xeomin 81 208 (0,6 U);

Descripción detallada de la invención

La presente invención puede entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de la invención y los ejemplos incluidos en la misma.

La presente solicitud se refiere a una neurotoxina clostridial recombinante que comprende un dominio de enrollamiento al azar.

En el contexto de la presente invención, el término "neurotoxina clostridial" se refiere a una neurotoxina natural que puede

obtenerse de bacterias de la clase Clostridia, lo que incluye *Clostridium tetani* y *Clostridium botulinum*, o a una neurotoxina que puede obtenerse de fuentes alternativas, lo que incluye tecnologías recombinantes o por modificación química o genética. Particularmente, las neurotoxinas clostridiales tienen actividad endopeptidasa.

Las neurotoxinas clostridiales se producen como precursores monocatenarios que se escinden proteolíticamente por una endoproteasa clostridial desconocida dentro de la región del bucle para obtener la forma bicatenaria unida por disulfuro biológicamente activa de la neurotoxina, que comprende dos elementos de cadena, una cadena ligera funcionalmente activa y una cadena pesada funcionalmente activa, donde un extremo de la cadena ligera se une a un extremo de la cadena pesada no a través de un enlace peptídico, sino a través de un enlace disulfuro.

En el contexto de la presente invención, el término "cadena ligera de neurotoxina clostridial" se refiere a esa parte de una neurotoxina clostridial que comprende una actividad endopeptidasa responsable de escindir una o más proteínas que es/son parte del denominado complejo SNARE involucrado en el proceso que resulta en la liberación de neurotransmisores en la hendidura sináptica: en las neurotoxinas clostridiales de origen natural, la cadena ligera tiene un peso molecular de aprox. 50 kDa.

En el contexto de la presente invención, el término "cadena pesada de neurotoxina clostridial" se refiere a la parte de una neurotoxina clostridial que es responsable de la entrada de la neurotoxina en la célula neuronal: en las neurotoxinas clostridiales de origen natural, la cadena pesada tiene un peso molecular de aprox. 100 kDa.

En el contexto de la presente invención, el término "cadena de neurotoxina clostridial funcionalmente activa" se refiere a una cadena de neurotoxina clostridial recombinante capaz de realizar las funciones biológicas de una cadena de neurotoxina de *Clostridium botulinum* de origen natural hasta al menos aproximadamente 50 %, particularmente, hasta al menos aproximadamente 60 %, hasta al menos aproximadamente 70 %, hasta al menos aproximadamente 80 %, y más particularmente hasta al menos aproximadamente 90 %, donde las funciones biológicas de las cadenas de neurotoxinas clostridiales incluyen, pero no se limitan a, la unión de la cadena pesada a la cadena célula neuronal, la entrada de la neurotoxina en una célula neuronal, la liberación de la cadena ligera desde la neurotoxina bicatenaria y la actividad endopeptidasa de la cadena ligera. Los métodos para determinar una actividad neurotóxica pueden encontrarse, por ejemplo, en el documento WO 95/32738, que describe la reconstitución de cadenas ligeras y pesadas de toxina tetánica y toxina botulínica obtenidas por separado.

En el contexto de la presente invención, el término "aproximadamente" significa dentro del 20 %, alternativamente dentro del 10 %, lo que incluye dentro del 5 % de un valor o intervalo dado. Alternativamente, especialmente en sistemas biológicos, el término "aproximadamente" significa dentro de aproximadamente un log (es decir, un orden de magnitud), incluido dentro de un factor de dos de un valor dado.

En el contexto de la presente invención, el término "neurotoxina clostridial recombinante" se refiere a una composición que comprende una neurotoxina clostridial que se obtiene mediante la expresión de la neurotoxina en una célula heteróloga tal como *E. coli*, e incluye, pero no se limita a, la materia prima obtenida a partir de un proceso de fermentación (sobrenadante, composición después de la lisis celular), una fracción que comprende una neurotoxina clostridial obtenida de la separación de los ingredientes de dicha materia prima en un proceso de purificación, una proteína aislada y esencialmente pura, y una formulación para uso farmacéutico y/o estético que comprende una neurotoxina clostridial y adicionalmente solventes y/o excipientes aceptables farmacéuticamente.

En el contexto de la presente invención, el término "neurotoxina clostridial recombinante" se refiere, además, a una neurotoxina clostridial basada en una neurotoxina clostridial parental que comprende adicionalmente un dominio de enrollamiento al azar heterólogo, es decir, un dominio de enrollamiento al azar que no es de origen natural en dicha neurotoxina clostridial parental, en particular un dominio de enrollamiento al azar sintético, o un dominio de enrollamiento al azar de una especie distinta de *Clostridium botulinum*, en particular un dominio de enrollamiento al azar de una proteína humana.

En el contexto de la presente invención, el término "comprende" o "que comprende" significa "que incluye, pero no se limita a". El término se pretende que sea abierto, para especificar la presencia de cualesquiera características, elementos, números enteros, etapas o componentes establecidos, pero no para excluir la presencia o adición de una o más características, elementos, números enteros, etapas, componentes, o grupos de estos. El término "que comprende" incluye por lo tanto los términos más restrictivos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

En el contexto de la presente solicitud, el término "dominio de enrollamiento al azar" se refiere a un segmento de proteína, que carece esencialmente de una estructura secundaria. Los dominios de enrollamiento al azar pueden detectarse mediante el uso de una variedad de métodos, lo que incluye métodos espectroscópicos tales como el dicroísmo circular o los métodos de resonancia magnética nuclear (RMN), lo que incluye experimentos multidimensionales de RMN o determinaciones de la estructura cristalográfica.

En un aspecto, la presente solicitud se refiere a una neurotoxina clostridial recombinante que comprende un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, en donde dicho segmento de proteína consiste en la secuencia de aminoácidos $(Xaa)_x[(P,A,S)_y(Xaa)]_z(P,A,S)_y(Xaa)_x$, en donde Xaa es un residuo de aminoácido

seleccionado independientemente de cualquier residuo de aminoácido de origen natural, siempre y cuando al menos un Xaa en $[(P,A,S)_y(Xaa)]_z$ es diferente de un residuo de alanina, serina o prolina; (P,A,S) representa un residuo de aminoácido seleccionado independientemente de un residuo de alanina (A), uno de serina (S) y uno de prolina (P); x es un número seleccionado independientemente de 0 y 1; y es un número seleccionado independientemente de 3 y 4; y z es 9 o más.

En una modalidad particular, Xaa es valina.

En una modalidad particular, z es un número entre 9 y 750.

En dichas modalidades particulares, y es 3, y z es 11 o más, particularmente z es un número entre 11 y 749, más particularmente entre 14 y 124, más particularmente entre 16 y 67, más particularmente entre 19 y 59, más particularmente entre 21 y 54, o más particularmente 23, 24 o 25, o 35, 36, o 37, o 48, 49 o 50. En otras de dichas modalidades particulares, y es 4, y z es 9 o más, particularmente z es un número entre 9 y 599, más particularmente entre 11 y 99, más particularmente entre 13 y 51, más particularmente entre 15 y 47, más particularmente entre 17 y 43, o más particularmente 18, 19, o 20, o 28, 29, o 30, o 38, 39, o 40.

Las secuencias denominadas "PAS" (ver, por ejemplo, Schlapsch y otros, Protein Engineering, Design and Selection 26 (2013) 489-501; documento EP 2 369 005; documento WO 2011/144756) se han desarrollado para extender la vida media plasmática de las proteínas activas farmacéuticamente. Se argumenta que la fusión genética con dichas secuencias de polipéptidos desordenados conformacionalmente proporciona una forma simple de unir una cadena aleatoria solvatada con gran volumen hidrodinámico a la pareja de fusión, por ejemplo, una proteína de interés biofarmacéutico, de manera que el tamaño de la proteína de fusión resultante se aumenta significativamente, y que por este medio el aclaramiento típicamente rápido del componente biológicamente activo mediante filtración renal se retrasa en uno o dos órdenes de magnitud.

Sorprendentemente, se ha encontrado que la unión de un segmento de proteína basado en un dominio PAS, que comprende otros residuos de aminoácidos distintos de P, A o S, particularmente valina, también puede extender la duración del efecto de una proteína que es activa intracelularmente, particularmente ya que la vida media plasmática de las toxinas botulínicas hasta ahora no se ha considerado de importancia fundamental para su duración del efecto. Además, la extensión de la duración es particularmente sorprendente, ya que se ha argumentado que las cadenas laterales macromoleculares tales como las secuencias PAS(Xaa) o las secuencias basadas en polietilenglicol evitan la captación celular, por lo que esta forma de estabilización de proteínas intravasales solo podría aplicarse a las proteínas para la intervención terapéutica con marcadores o receptores de la superficie celular (A. Weber, Inhibierung von Stat5 in Tumoren durch RNA-Interferenz und spezifische Interaktion eines Peptidaptamer-Konstruktes mit der DNA-Bindedomane, tesis de doctorado, Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt am Main (Alemania) 2013, p. 220, última oración completa).

La presente solicitud se refiere, además, a constructos, en donde un dominio de enrollamiento al azar consiste en residuos de alanina, serina y prolina.

La presente solicitud se refiere, además, a constructos, en donde un dominio de enrollamiento al azar comprende una pluralidad de repeticiones de aminoácidos, en donde dichas repeticiones consisten en residuos de Ala, Ser y Pro y en donde no más de seis residuos de aminoácidos consecutivos son idénticos.

En modalidades particulares, dicho segmento de proteína comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, particularmente entre 50 y 3000 residuos de aminoácidos, más particularmente entre 60 y 500 residuos de aminoácidos, más particularmente entre 70 y 260 residuos de aminoácidos, más particularmente entre 80 y 240 residuos de aminoácidos, más particularmente entre 90 y 220 residuos de aminoácidos, particularmente 100 residuos de aminoácidos, 150 residuos de aminoácidos o 200 residuos de aminoácidos.

En modalidades particulares, los residuos de prolina comprendidos en dicho dominio de enrollamiento al azar constituyen más del 4 % y menos del 40 % de los aminoácidos de dicho dominio de enrollamiento al azar.

En modalidades particulares, dicho segmento de proteína comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (VPASA)₂₀ (SEQ ID NO: 12) y (VAPSA)₂₀ (SEQ ID NO: 13).

En otras modalidades particulares, al menos el 20 % de dichos residuos de aminoácidos (Xaa) son diferentes de residuos de alanina (A), serina (S) o prolina (P). En dichas modalidades particulares, cada uno de dichos residuos (Xaa) es idéntico, es decir, dicho segmento de proteína consiste en cuatro residuos de aminoácidos diferentes. En dichas modalidades particulares, cada (Xaa) es una valina (V). En dichas modalidades particulares, dicho dominio de enrollamiento al azar se selecciona de (VPASA)₂₀ (SEQ ID NO: 12) y (VAPSA)₂₀ (SEQ ID NO: 13).

Sorprendentemente, los segmentos de proteínas del tipo (VPASA)₂₀ y (VAPSA)₂₀ resultan en dominios de fusión de neurotoxinas botulínicas, que no solo muestran una mayor duración de la persistencia biológica (como se observa para las secuencias pasiladas que consisten solo en P, A y S) sino que exhiben, además, un inicio rápido de la actividad biológica similar a las neurotoxinas botulínicas de tipo silvestre (ver Figura 6). Esto contrasta con el rendimiento de las

secuencias pasiladas que consisten solamente en P, A y S, que exhiben un inicio retardado de la actividad biológica (ver Figuras 4 y 5).

En modalidades particulares, dicho segmento de proteína se inserta en (i) el extremo N terminal de la cadena ligera de dicha neurotoxina clostridial recombinante; (ii) el extremo C terminal de la cadena ligera de dicha neurotoxina clostridial recombinante; (iii) el extremo N terminal de la cadena pesada de dicha neurotoxina clostridial recombinante; o (iv) el extremo C terminal de la cadena pesada de dicha neurotoxina clostridial recombinante, particularmente en el extremo N terminal de la cadena ligera de dicha neurotoxina clostridial recombinante.

En modalidades particulares, la secuencia de dicha neurotoxina clostridial se selecciona de la secuencia de (i) una neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A, B, C, D, E, F y G, particularmente la neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A, C y E, particularmente la neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A, o (ii) de la secuencia de una variante funcional de una neurotoxina de *Clostridium botulinum* de (i), o (iii) de la secuencia de una neurotoxina de *Clostridium botulinum* quimérica, en donde la cadena ligera y la cadena pesada de la neurotoxina de *Clostridium botulinum* son de diferentes serotipos de neurotoxinas clostridiales parentales.

En el contexto de la presente invención, el término "neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A, B, C, D, E, F y G" se refiere a neurotoxinas encontradas en y que pueden obtenerse de *Clostridium botulinum*. Actualmente, se conocen siete tipos serológicamente distintos, los serotipos designados A, B, C, D, E, F y G, lo que incluye ciertos subtipos (por ejemplo, A1, A2, A3, A4 y A5).

En modalidades particulares, la neurotoxina clostridial se selecciona de una neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A, C y E, en particular de la neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A, o de una variante funcional de cualquiera de dichas neurotoxinas de *Clostridium botulinum*.

En modalidades particulares, dicha neurotoxina clostridial recombinante tiene una cadena ligera y una cadena pesada comprendidas en la secuencia de aminoácidos como se encuentra en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15.

En el contexto de la presente invención, el término "variante funcional de una neurotoxina clostridial" se refiere a una neurotoxina que difiere en la secuencia de aminoácidos y/o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de una neurotoxina clostridial, pero aún es funcionalmente activa. En el contexto de la presente invención, el término "funcionalmente activa" se refiere a la propiedad de una neurotoxina clostridial recombinante de exhibir una actividad biológica de al menos aproximadamente 50 %, particularmente hasta al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, y más particularmente al menos aproximadamente 90 % de la actividad biológica de una neurotoxina clostridial parental de origen natural, es decir, una neurotoxina clostridial parental sin dominio de enrollamiento al azar, donde las funciones biológicas incluyen, pero no se limitan a, la unión al receptor de neurotoxina, la entrada de la neurotoxina en una célula neuronal, la liberación de la cadena ligera desde la neurotoxina bicatenaria y la actividad endopeptidasa de la cadena ligera, y por lo tanto la inhibición de la liberación del neurotransmisor desde la célula nerviosa afectada.

A nivel de proteína, una variante funcional mantendrá las características claves de la neurotoxina clostridial correspondiente, tales como los residuos claves para la actividad endopeptidasa en la cadena ligera, o los residuos claves para la unión a los receptores de neurotoxinas o para la translocación a través de la membrana endosómica en la cadena pesada, pero puede contener una o más mutaciones que comprenden una delección de uno o más aminoácidos de la neurotoxina clostridial correspondiente, una adición de uno o más aminoácidos de la neurotoxina clostridial correspondiente, y/o una sustitución de uno o más aminoácidos de la neurotoxina clostridial correspondiente. Particularmente, dichos aminoácidos eliminados, añadidos y/o sustituidos son aminoácidos consecutivos. De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, puede añadirse, eliminarse y/o sustituirse cualquier número de aminoácidos, siempre que la variante funcional permanezca biológicamente activa. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 15, hasta 25, hasta 50, hasta 100, hasta 200, hasta 400, hasta 500 aminoácidos o incluso más aminoácidos pueden añadirse, eliminarse y/o sustituirse. En consecuencia, una variante funcional de la neurotoxina puede ser un fragmento biológicamente activo de una neurotoxina de origen natural. Este fragmento de neurotoxina puede contener una delección N-terminal, C-terminal y/o una o más delecciones internas.

En otra modalidad, la variante funcional de una neurotoxina clostridial comprende adicionalmente un péptido señal. Generalmente, dicho péptido señal se ubicará en el extremo N-terminal de la neurotoxina. Muchos de estos péptidos señales se conocen en la técnica y se comprenden por la presente invención. En particular, el péptido señal resulta en el transporte de la neurotoxina a través de una membrana biológica, tal como la membrana del retículo endoplásmico, la membrana de Golgi o la membrana plasmática de una célula eucariota o procariota. Se ha descubierto que los péptidos señales, cuando se unen a la neurotoxina, mediarán la secreción de la neurotoxina hacia el sobrenadante de las células. En ciertas modalidades, el péptido señal se escindirá en el curso de la secreción o posterior a ella, de manera que la proteína secretada carece del péptido señal N-terminal, se compone de cadenas ligeras y pesadas separadas, que se unen covalentemente por puentes disulfuro, y es proteolíticamente activa.

En modalidades particulares, la variante funcional tiene en su parte de neurotoxina clostridial una identidad de secuencia

- de al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 % o más particularmente al menos aproximadamente 80 %, y una homología de secuencia de al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, o más particularmente al menos aproximadamente 95 % con respecto a la parte correspondiente en la neurotoxina clostridial parental. Los métodos y algoritmos para determinar la identidad de secuencia y/o la homología, lo que incluye la comparación de variantes que tienen delecciones, adiciones y/o sustituciones con respecto a una secuencia parental, se conocen bien por el experto en la técnica. A nivel de ADN, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el homólogo funcional y la neurotoxina clostridial parental pueden diferir en mayor medida debido a la degeneración del código genético. Se conoce que el uso de codones es diferente entre los organismos procariotas y eucariotas. Por lo tanto, cuando se expresa una proteína procariota, tal como una neurotoxina clostridial, en un sistema de expresión eucariota, puede ser necesario, o al menos útil, adaptar la secuencia de ácidos nucleicos al uso de codones de la célula huésped de expresión, lo que significa que la identidad de secuencia o la homología puede ser más bien baja al nivel de ácido nucleico.
- En el contexto de la presente invención, el término "variante" se refiere a una neurotoxina que es un derivado modificado química, enzimática o genéticamente de una neurotoxina clostridial correspondiente, lo que incluye una neurotoxina modificada química o genéticamente de *C. botulinum*, particularmente de neurotoxina de *C. botulinum* serotipo A, C o E. Un derivado modificado químicamente puede ser uno modificado por piruvación, fosforilación, sulfatación, lipidación, pegilación, glucosilación y/o la adición química de un aminoácido o un polipéptido que comprende entre 2 y aproximadamente 100 aminoácidos, lo que incluye la modificación que se produce en la célula huésped eucariota usada para expresar el derivado. Un derivado modificado enzimáticamente es uno que se modifica por la actividad de enzimas, tales como las enzimas endo o exoproteolíticas, lo que incluye la modificación por enzimas de la célula huésped eucariota usada para expresar el derivado. Como se señaló anteriormente, un derivado modificado genéticamente es uno que se ha modificado mediante la delección o sustitución de uno o más aminoácidos contenidos en, o mediante la adición de uno o más aminoácidos (lo que incluye polipéptidos que comprenden entre 2 y aproximadamente 100 aminoácidos) a, la secuencia de aminoácidos de dicha neurotoxina clostridial. Los métodos para diseñar y construir dichos derivados modificados química o genéticamente y para probar la funcionalidad de dichas variantes se conocen por cualquier experto en la técnica.
- En modalidades particulares, dicha neurotoxina clostridial recombinante muestra una mayor duración del efecto con respecto a una neurotoxina clostridial idéntica sin el dominio de enrollamiento al azar.
- En el contexto de la presente invención, el término "mayor duración del efecto" o "mayor duración de la acción" se refiere a una desnervación de mayor duración mediada por una neurotoxina clostridial de la presente invención. Por ejemplo, como se describe en la presente descripción, la administración de una neurotoxina clostridial bicatenaria unida por disulfuro que comprende un dominio de enrollamiento al azar resulta en una parálisis localizada durante un período de tiempo más largo con respecto a la administración de una neurotoxina clostridial bicatenaria unida por disulfuro idéntica sin el segmento de proteína.
- En el contexto de la presente invención, el término "mayor duración del efecto/acción" se define como un aumento de más de aproximadamente un 20 %, particularmente más de aproximadamente un 50 %, más particularmente más de aproximadamente un 90 % de la duración del efecto de la neurotoxina recombinante de la presente invención con respecto a la neurotoxina idéntica sin el segmento de proteína.
- En el contexto de la presente invención, el término "desnervación" se refiere a la desnervación resultante de la administración de un agente quimiodesnervante, por ejemplo, una neurotoxina.
- En el contexto de la presente invención, el término "desnervación localizada" o "parálisis localizada" se refiere a la desnervación de una región anatómica en particular, generalmente un músculo o un grupo de músculos relacionados anatómicamente y/o fisiológicamente, que resulta de la administración de un agente quimiodesnervante, por ejemplo, una neurotoxina, a la región anatómica en particular.
- Sin desear limitarse por la teoría, las neurotoxinas clostridiales recombinantes de la presente invención podrían mostrar una mayor vida media biológica, tasas de degradación reducidas, tasas de difusión disminuidas, captación aumentada por las células neuronales y/o tasas de translocación intracelular modificadas, en cada caso con respecto a una neurotoxina clostridial parental idéntica sin el segmento de proteína.
- En modalidades particulares, la mayor duración del efecto se debe a una mayor vida media biológica.
- En el contexto de la presente invención, el término "vida media biológica" especifica la vida útil de una proteína, por ejemplo, de una neurotoxina clostridial, *in vivo*. En el contexto de la presente invención, el término "vida media biológica" se refiere al período de tiempo durante el cual la mitad de un conjunto de proteínas se degrada *in vivo*. Por ejemplo, se refiere al período de tiempo durante el cual se degrada la mitad de la cantidad de neurotoxina clostridial de una dosis administrada.
- En el contexto de la presente invención, el término "mayor vida media biológica" se define como un aumento de más de

aproximadamente 20 %, particularmente más de aproximadamente 50 %, más particularmente más de aproximadamente 90 % de la vida media biológica de la neurotoxina recombinante de la presente invención con respecto a la neurotoxina idéntica sin el segmento de proteína.

5 En el contexto de la presente invención, el término "tasa de degradación reducida" significa que el segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos (secuencia PAS) protege la cadena ligera contra los procesos de degradación en el citosol de la neurona, tal como, por ejemplo, el ataque de proteasas o enzimas modificadoras como las ligasas E3. Debido a esta protección, la vida media de la cadena ligera en la neurona se extiende, lo que resulta en una mayor duración del efecto terapéutico.

10 En modalidades particulares, la neurotoxina clostridial recombinante es para el uso en el tratamiento de una enfermedad que requiere una mejor quimiodesnervación, en donde la neurotoxina clostridial recombinante provoca una desnervación más duradera con respecto a una neurotoxina clostridial idéntica sin el segmento de proteína.

15 En otras modalidades particulares, la neurotoxina clostridial recombinante es para su uso en el tratamiento de (a) pacientes que muestran una reacción inmunitaria contra BoNT/A, o (b) dolor de cabeza o epilepsia, en donde la neurotoxina clostridial recombinante es del serotipo E.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la neurotoxina clostridial recombinante de la presente invención.

25 En modalidades particulares, la neurotoxina clostridial recombinante de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención es para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección tomada de la lista de: distonía cervical (tortícolis espasmódica), blefaroespasma, hiperhidrosis axilar primaria severa, acalasia, lumbalgia, hipertrofia benigna de próstata, neuropatías crónicas dolorosas focales, migraña y otros trastornos de cefalea.

30 Las indicaciones adicionales donde el tratamiento con neurotoxinas botulínicas se encuentra actualmente en investigación y donde puede usarse la composición farmacéutica de la presente invención, incluyen incontinencia pediátrica, incontinencia debido a vejiga hiperactiva e incontinencia debido a vejiga neurogénica, fisura anal, trastornos espásticos asociados con lesiones o enfermedades del sistema nervioso central, lo que incluye trauma, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson o parálisis cerebral, distonías focales que afectan las extremidades, cara, mandíbula o cuerdas vocales, trastornos del dolor de la articulación temporomandibular (ATM), neuropatía diabética, cicatrización de heridas, salivación excesiva, disfunción de las cuerdas vocales, reducción del músculo masetero para disminuir el tamaño de la mandíbula inferior, tratamiento y prevención del dolor de cabeza crónico y dolor musculoesquelético crónico, tratamiento del ronquido, asistencia en la pérdida de peso al aumentar el tiempo de vaciado gástrico.

35 Más recientemente, se han evaluado las neurotoxinas clostridiales para el tratamiento de otras nuevas indicaciones, por ejemplo, queloide doloroso, dolor neuropático diabético, dolor refractario en la rodilla, aplicación de zona de activación de neuralgia del trigémino para controlar el dolor, cicatrización después de la cirugía de labio leporino, cáncer y depresión.

40 En aún otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de la composición de la presente invención para el tratamiento cosmético.

45 En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento cosmético" se refiere a usos en aplicaciones cosméticas o estéticas, tales como el tratamiento de arrugas, patas de gallo, líneas de expresión del entrecejo, etcétera.

50 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la generación de la neurotoxina clostridial recombinante de la presente invención, que comprende la etapa de obtener una secuencia de ácidos nucleicos recombinante que codifica una neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante mediante la inserción de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho segmento de proteína, en particular un segmento de proteína de acuerdo con la presente solicitud, en una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una neurotoxina clostridial parental.

55 En el contexto de la presente invención, el término "secuencia de ácidos nucleicos recombinante" se refiere a un ácido nucleico que se ha generado al unir material genético de dos fuentes diferentes.

60 En el contexto de la presente invención, el término "neurotoxina clostridial precursora monocatenaria" se refiere a un precursor monocatenario para una neurotoxina clostridial bicatenaria unida por disulfuro, que comprende una cadena ligera de neurotoxina clostridial funcionalmente activa, una cadena pesada de neurotoxina funcionalmente activa y una región de bucle que une el extremo C terminal de la cadena ligera con el extremo N terminal de la cadena pesada.

65 En el contexto de la presente invención, el término "neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante" se refiere a una neurotoxina clostridial precursora monocatenaria que comprende un segmento de proteína heteróloga que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, es decir, un segmento de proteína de una especie distinta de *Clostridium botulinum*.

En modalidades particulares, la neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante comprende un sitio de escisión de proteasa en dicha región de bucle.

Las neurotoxinas clostridiales precursoras monocatenarias tienen que escindirse proteolíticamente para obtener las neurotoxinas clostridiales biológicamente activas finales. La escisión proteolítica puede producirse durante la expresión heteróloga por las enzimas de la célula huésped, o al añadir enzimas proteolíticas al material proteico crudo aislado después de la expresión heteróloga. Las neurotoxinas clostridiales de origen natural contienen generalmente una o más señales de escisión para proteasas que escinden post-traduccionamente la molécula precursora monocatenaria, de manera que puede formarse el complejo di o multimérico final. En la actualidad, las neurotoxinas clostridiales aún se producen predominantemente por procesos de fermentación mediante el uso de cepas de *Clostridium* apropiadas. Durante el proceso de fermentación, los precursores monocatenarios se escinden proteolíticamente por una proteasa clostridial desconocida para obtener la neurotoxina clostridial bicatenaria biológicamente activa. En los casos en que la molécula precursora monocatenaria es el precursor de una proteasa, puede producirse una escisión autocatalítica. Alternativamente, la proteasa puede ser una enzima no clostridial separada expresada en la misma célula. El documento WO 2006/076902 describe la escisión proteolítica de un precursor monocatenario de neurotoxina clostridial recombinante en un sitio de reconocimiento y escisión heterólogo por incubación del lisado de la célula huésped de *E. coli*. La escisión proteolítica se lleva a cabo por una proteasa de *E. coli* desconocida. En ciertas aplicaciones de expresión recombinante, se han introducido recombinantemente sitios de escisión de proteasa modificados en la región intercadena entre la cadena ligera y la pesada de toxinas clostridiales, por ejemplo, sitios de escisión de proteasa para trombina humana u otras proteasas humanas o proteasas no humanas (ver el documento WO 01/14570).

En modalidades particulares, el sitio de escisión de proteasa es un sitio que se escinde por una proteasa seleccionada de la lista de: trombina, tripsina, enteroquinasa, factor Xa, papaína vegetal, papaína de insecto, papaína de crustáceo, enteroquinasa, proteasa 3C de rinovirus humano, proteasa 3C de enterovirus humano, proteasa del virus del grabado del tabaco, virus del moteado de las venas del tabaco, subtilisina y caspasa 3.

En una modalidad particular, la neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante comprende, además, una etiqueta de unión, seleccionada particularmente del grupo que comprende: glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), una etiqueta His, una etiqueta Estrep, o una etiqueta FLAG.

En el contexto de la presente invención, el término "neurotoxina clostridial parental" se refiere a una neurotoxina clostridial inicial sin un segmento de proteína heteróloga que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, seleccionados de una neurotoxina clostridial natural, una variante funcional de una neurotoxina clostridial natural o una neurotoxina clostridial quimérica, en donde la cadena ligera y la cadena pesada de la neurotoxina clostridial son de diferentes serotipos de neurotoxina clostridial.

En modalidades particulares, el método para la generación de la neurotoxina clostridial recombinante de la presente invención comprende, además, la etapa de expresar heterológamente dicha secuencia de ácidos nucleicos recombinante en una célula huésped, particularmente en una célula huésped bacteriana, más particularmente en una célula huésped de *E. coli*.

En ciertas modalidades, las células de *E. coli* se seleccionan de *E. coli* XL1-Blue, Nova Blue, TOP10, XL10-Gold, BL21 y K12.

En modalidades particulares, el método para la generación de la neurotoxina clostridial recombinante de la presente invención comprende adicionalmente al menos una de las etapas de (i) generar una neurotoxina clostridial recombinante bicatenaria unida por disulfuro que comprende un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos al provocar o permitir la puesta en contacto de dicha neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante con una endoproteasa y (ii) purificar dicha neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante o dicha neurotoxina clostridial recombinante bicatenaria unida por disulfuro por cromatografía.

En modalidades particulares, la neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante, o la neurotoxina clostridial bicatenaria recombinante unida por disulfuro, se purifica después de la expresión, o en el caso de la neurotoxina clostridial bicatenaria recombinante unida por disulfuro, después de la reacción de escisión. En dichas modalidades particulares, la proteína se purifica por cromatografía, particularmente por cromatografía de inmunoafinidad, o por cromatografía en una matriz de intercambio iónico, una matriz de interacción hidrófoba o una matriz de cromatografía multimodal, particularmente una matriz de intercambio iónico fuerte, más particularmente una matriz de intercambio catiónico fuerte.

En el contexto de la presente invención, el término "provocar ... la puesta en contacto de dicha neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante ... con una endoproteasa" se refiere a una etapa activa y/o directa de poner dicha neurotoxina y dicha endoproteasa en contacto, mientras que el término "permitir la puesta en contacto de una neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante ... con una endoproteasa" se refiere a una etapa indirecta de establecer condiciones de manera que dicha neurotoxina y dicha endoproteasa se pongan en contacto entre sí.

En el contexto de la presente invención, el término "endoproteasa" se refiere a una proteasa que rompe los enlaces peptídicos de aminoácidos no terminales (es decir, dentro de la cadena de polipéptidos). Como no atacan a los

aminoácidos terminales, las endoproteasas no pueden descomponer los péptidos en monómeros.

En modalidades particulares, la escisión de la neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante está casi completa.

En el contexto de la presente invención, el término "casi completa" se define como más de aproximadamente el 95 % de escisión, particularmente más de aproximadamente el 97,5 %, más particularmente más de aproximadamente el 99 % según lo determinado por SDS-PAGE y posterior transferencia de Western o cromatografía de fase inversa.

En modalidades particulares, la escisión de la neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante se produce en una señal de escisión heteróloga ubicada en la región de bucle de la neurotoxina clostridial precursora recombinante.

En modalidades particulares, la reacción de escisión se realiza con lisados de células huésped crudos que contienen dicha proteína precursora monocatenaria.

En otras modalidades particulares, la proteína precursora monocatenaria se purifica o se purifica parcialmente, particularmente mediante una primera etapa de enriquecimiento cromatográfico, antes de la reacción de escisión.

En el contexto de la presente invención, el término "purificada" se refiere a más de aproximadamente 90 % de pureza. En el contexto de la presente invención, el término "parcialmente purificada" se refiere a una pureza de menos de aproximadamente 90 % y un enriquecimiento de más de aproximadamente dos veces.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una neurotoxina clostridial monocatenaria recombinante, que es un precursor de la neurotoxina clostridial recombinante de la presente invención. Por lo tanto, en dicho aspecto, la presente invención se refiere a una neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante que comprende un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, en particular un segmento de proteína de acuerdo con la presente solicitud.

En modalidades particulares, dicho precursor de neurotoxina clostridial monocatenaria recombinante para una neurotoxina clostridial bicatenaria unida por disulfuro comprende una cadena ligera de neurotoxina clostridial funcionalmente activa, una cadena pesada de neurotoxina funcionalmente activa, una región de bucle que une el extremo C terminal de la cadena ligera con el extremo N terminal de la cadena pesada, y un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos de acuerdo con la presente solicitud.

En modalidades particulares, dicho segmento de proteína consiste en la secuencia de aminoácidos $(Xaa)_x-[(P,A,S)_y-(Xaa)-]_z(P,A,S)_y-(Xaa)_x$, en donde Xaa es un residuo de aminoácido seleccionado independientemente de cualquier residuo de aminoácido de origen natural, siempre y cuando al menos un Xaa en $[(P,A,S)_y-(Xaa)-]_z$ sea diferente de un residuo de alanina, serina o prolina; (P,A,S) representa un residuo de aminoácido seleccionado independientemente de un residuo de alanina (A), uno de serina (S) y uno de prolina (P); x es un número seleccionado independientemente de 0 y 1; y es un número seleccionado independientemente de 3 y 4; y z es 9 o más.

En modalidades particulares, Xaa es valina.

En modalidades particulares, z es un número entre 9 y 750.

En dichas modalidades particulares, y es 3, y z es 11 o más, particularmente z es un número entre 11 y 749, más particularmente entre 14 y 124, más particularmente entre 16 y 67, más particularmente entre 19 y 59, más particularmente entre 21 y 54, o más particularmente 23, 24 o 25, o 35, 36, o 37, o 48, 49 o 50. En otras de dichas modalidades particulares, y es 4, y z es 9 o más, particularmente z es un número entre 9 y 599, más particularmente entre 11 y 99, más particularmente entre 13 y 51, más particularmente entre 15 y 47, más particularmente entre 17 y 43, o más particularmente 18, 19, o 20, o 28, 29, o 30, o 38, 39, o 40.

En modalidades particulares, dicho segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, particularmente entre 50 y 3000 residuos de aminoácidos, más particularmente entre 60 y 500 residuos de aminoácidos, más particularmente entre 70 y 260 residuos de aminoácidos, más particularmente entre 80 y 240 residuos de aminoácidos, más particularmente entre 90 y 220 residuos de aminoácidos, particularmente 100 residuos de aminoácidos, 150 residuos de aminoácidos o 200 residuos de aminoácidos.

En modalidades particulares, la presente solicitud se refiere a un dominio de enrollamiento al azar que consiste en residuos de alanina, serina y prolina.

En modalidades particulares, la presente solicitud se refiere a un dominio de enrollamiento al azar que comprende una pluralidad de repeticiones de aminoácidos, en donde dicha repetición consiste en residuos de Ala, Ser y Pro y en donde no más de 6 residuos de aminoácidos consecutivos son idénticos.

En modalidades particulares, los residuos de prolina comprendidos en dicho segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos constituyen más del 4 % y menos del 40 % de los aminoácidos de dicho dominio de enrollamiento al azar.

5 En modalidades particulares, dicho segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (VPASA)₂₀ (SEQ ID NO: 12) y (VAPSA)₂₀ (SEQ ID NO: 13); o versiones circulares permutadas o (un) multímero(s) de estas secuencias como un todo o partes de estas secuencias, particularmente (VPASA)₂₀ (SEQ ID NO: 12).

10 En modalidades particulares, dicho segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos se inserta en (i) el extremo N terminal de la cadena ligera de dicha neurotoxina clostridial recombinante; (ii) el extremo C terminal de la cadena ligera de dicha neurotoxina clostridial recombinante; (i) el extremo N terminal de la cadena pesada de dicha neurotoxina clostridial recombinante; o (ii) el extremo C terminal de la cadena pesada de dicha neurotoxina clostridial recombinante.

15 En modalidades particulares, la secuencia de dicha neurotoxina clostridial se selecciona de la secuencia de (i) una neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A, B, C, D, E, F y G, particularmente la neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A, C y E, más particularmente, la neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A, o (ii) de la secuencia de una variante funcional de una neurotoxina de *Clostridium botulinum* de (i), o (iii) de la secuencia de una neurotoxina de *Clostridium botulinum* quimérica, en donde la cadena ligera de la neurotoxina clostridial y la cadena pesada son de diferentes serotipos de neurotoxinas clostridiales.

20 En modalidades particulares, dicha neurotoxina clostridial monocatenaria recombinante tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15 (ver la Tabla 1).

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la neurotoxina clostridial monocatenaria recombinante de la presente invención.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para obtener la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, que comprende la etapa de insertar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, en particular un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos de acuerdo con la presente solicitud, en una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una neurotoxina clostridial parental.

35 La presente solicitud se refiere, además, a un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, o la secuencia de ácidos nucleicos que puede obtenerse por el método de la presente invención.

La presente solicitud se refiere, además, a una célula huésped recombinante que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, la secuencia de ácidos nucleicos que puede obtenerse por el método de la presente invención, o el vector de la presente solicitud.

40 En ciertas modalidades, las células huésped recombinantes se seleccionan de *E. coli* XL1-Blue, Nova Blue, TOP10, XL10-Gold, BL21 y K12.

45 La presente solicitud se refiere, además, a un método para producir la neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante de la presente invención, que comprende la etapa de expresar la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, o la secuencia de ácidos nucleicos que puede obtenerse por el método de la presente invención, o el vector de la presente solicitud en una célula huésped recombinante, o cultivar la célula huésped recombinante de la presente solicitud en condiciones que resultan en la expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos.

50

Ejemplos

Ejemplo comparativo 1: generación y purificación de una toxina botulínica PASilada tipo A (PAS200-rBoNT/A)

55 El módulo "PAS" que comprende 200 residuos de aminoácidos construidos a partir de los aminoácidos prolina, serina y alanina se produjo sintéticamente y después de la digestión con SapI se insertó en el extremo N terminal de la BoNT/A recombinante (rBoNT/A) (**Figura 1**). La clonación correcta se verificó por secuenciación.

60 La expresión se realizó en la cepa de expresión *E. coli* B121. La purificación se realizó mediante el uso de una combinación de cromatografía de afinidad y exclusión por tamaño, seguida de activación mediante el uso de trombina. **La Figura 2** resume los resultados de la purificación y la activación.

Ejemplo comparativo 2: Medición de la actividad biológica en la prueba de hemidiafragma (prueba HDA)

65 Esta prueba *ex vivo* realiza todas las etapas necesarias para la intoxicación (unión a células objetivo, internalización y translocación en el citosol). Para lograr eso, una preparación de nervio-músculo murino, que comprende el hemidiafragma

y el Nervus phrenicus, se estimula en un baño de órganos por una frecuencia continua de 1 Hz. La amplitud resultante de la contracción muscular se representa en función del tiempo. Después de la adición de la muestra de toxina al baño de órganos, se determina el tiempo requerido para una reducción del 50 % de la amplitud observada sin toxina. Este llamado tiempo medio de parálisis es una medida directa de la actividad biológica. En el caso de PAS200-rBoNT/A, el tiempo medio de parálisis fue de 157 minutos a una concentración de 0,35 ng/ml en el baño de órganos. En comparación con una curva de calibración establecida con la BoNT/A de tipo silvestre, puede calcularse una actividad biológica específica de 60 pg/U.

10 **Ejemplo comparativo 3: Determinación de la actividad biológica *in vivo* mediante el uso de la prueba de "puntuación de la abducción digital" (DAS)**

En esta prueba *in vivo*, se determina la actividad biológica de una muestra. En base a los resultados para la actividad biológica específica obtenida en la prueba de HDA (ver Ejemplo 2), se calculan las dosis que deberían resultar en un efecto submáximo comparable al efecto observado con una muestra estándar procesada en paralelo. Esas dosis, en un volumen de 20 ml en cada caso, se inyectan en el M. gastrocnemius de la pata trasera derecha de cuatro ratones en cada caso. El efecto resultante se mide en el tiempo al determinar la abducción digital al levantar el ratón y se cuantifica mediante el uso de una puntuación de 0 a 4 (Aoki, K.R.; Toxicon 39 (2001) 1815-1820). Una puntuación de 0 corresponde a la abducción digital máxima, mientras que una puntuación de 4 corresponde a la parálisis máxima, donde la abducción digital se ausenta completamente. Las puntuaciones 1, 2 o 3 describen estados intermedios entre estos dos extremos. En la **Figura 3**, se muestran los resultados de la prueba DAS con PAS200-rBoNT/A.

Ejemplo comparativo 4: Duración del efecto de PAS200-rBoNT/A en un "ensayo de carrera del ratón"

En base a los resultados de la actividad obtenida en la prueba DAS (ver Ejemplo 3), pueden calcularse las dosis que son adecuadas para una comparación de la duración del efecto con una corrida estándar (Xeomin®) en paralelo. El objetivo es aplicar una dosis equipotente, es decir, el efecto máximo de la muestra y el estándar (Xeomin®) debe ser el mismo. Se inyectaron dosis equipotentes de PAS200-rBoNT/A o Xeomin® en el M. gastrocnemius de ocho ratones cada uno que se habían entrenado en una cinta caminadora. Mediante el uso de estas dosis, solo se observó una parálisis submáxima para excluir los posibles efectos sistémicos en la medida de lo posible, lo que puede tener un impacto en la duración del efecto. La distancia corrida diaria en la cinta se midió durante 15 días. La parálisis provocada por las toxinas se trazó como un porcentaje de la distancia de carrera el día anterior a la inyección, que se estableció como 100 %, en función del tiempo (ver **Figura 3**).

La inyección de PAS200-rBoNT/A resultó en una parálisis máxima después de 4 días correspondiente a la observada para el grupo control tratado con Xeomin. Durante la fase de recuperación que sigue a la fase de parálisis máxima, la distancia de carrera del grupo control alcanzó un valor del 25 % del valor inicial después de 8 días, mientras que el grupo tratado con PAS200-rBoNT/A alcanzó ese valor solo después de 11 días. Por lo tanto, la duración de la parálisis efectiva se extendió significativamente.

40 **Ejemplo comparativo 5: generación y purificación de una toxina botulínica PASilada tipo A (PAS100-rBoNT/A)**

Una PAS100-rBoNT/A que comprende un módulo "PAS" que comprende 100 residuos de aminoácidos construidos a partir de los aminoácidos prolina, serina y alanina se generó y purificó como se describió para PAS200-rBoNT/A en el Ejemplo 1.

45 **Ejemplo comparativo 6: Duración del efecto de PAS100-rBoNT/A en un "ensayo de carrera del ratón"**

Se realizó un ensayo de carrera del ratón con PAS100-rBoNT/A como se describió en el ejemplo 4. Se inyectaron dosis equipotentes de PAS100-rBoNT/A o Xeomin® en el M. gastrocnemius de ocho ratones cada uno y se midió la distancia corrida diaria en la cinta caminadora durante 15 días. La parálisis provocada por las toxinas se trazó como un porcentaje de la distancia corrida el día anterior a la inyección, que se estableció como 100 %, en función del tiempo (ver **Figura 4**).

La inyección de PAS100-rBoNT/A resultó en una parálisis máxima después de 6 días, para el grupo control tratado con Xeomin se observó parálisis máxima después de 4 días. Durante la fase de recuperación, la distancia corrida del grupo de control alcanzó un valor del 40 % del valor inicial 4 días después de que se observó la parálisis máxima (día 8), mientras que el grupo tratado con PAS100-rBoNT/A alcanzó ese valor 5 días después de la parálisis máxima (día 11). Por lo tanto, la duración de la parálisis efectiva se extendió significativamente.

60 **Ejemplo 7: Generación y purificación de una toxina botulínica VPASA100 tipo A (VPASA100-rBoNT/A)**

Una VPASA100-rBoNT/A que comprende un módulo "VPASA" que comprende 100 residuos de aminoácidos construidos a partir de la repetición de 20 veces de los aminoácidos valina, prolina, serina y alanina, (VPASA)₂₀-rBoNT/A, se generó y purificó como se describió para PAS200-rBoNT/A en el ejemplo 1.

65 **Ejemplo 8: Generación y purificación de una toxina botulínica VAPSA100 tipo A (VAPSA100-rBoNT/A)**

Una **VAPSA100-rBoNT/A** que comprende un módulo "VAPSA" que comprende 100 residuos de aminoácidos contruidos a partir de la repetición de 20 veces de los aminoácidos valina, prolina, serina y alanina, (**VAPSA**)₂₀-**rBoNT/A**), se generó y purificó como se describió para **PAS200-rBoNT/A** en el Ejemplo 1.

5 **Ejemplo 9: Duración del efecto de VPASA100-rBoNT/A en un "ensayo de carrera del ratón"**

Se realizó un ensayo de carrera con ratón mediante el uso de VPASA100-rBoNT/A como se describió en el ejemplo 4. Se inyectaron dosis equipotentes de VPASA100-rBoNT/A o Xeomin® en el M. gastrocnemius de ocho ratones cada una y se midió la distancia corrida diaria en la cinta caminadora durante 15 días. La parálisis provocada por las toxinas se trazó como un porcentaje de la distancia corrida el día anterior a la inyección, que se estableció como 100 %, en función del tiempo (ver Figura 5).

Durante la fase de recuperación, la distancia corrida del grupo tratado con VPASA100-rBoNT/A alcanzó el valor del 40 % notablemente más tarde que el del grupo control.

Tabla 1: Secuencias

SEQ ID NO 1:

AS PAAPAPASPAAPAPSAPA

SEQ ID NO 2:

AAPASPAPAAPSAPAPAAPS

SEQ ID NO 3:

APSSPSPSAPSSPSPASPSS

SEQ ID NO 4:

SAPSSPSPSAPSSPSPASPS

SEQ ID NO 5:

SSPSAPSPSSPASPSPPA

SEQ ID NO 6:

AASPAAPSAPPAASPAAPSAPPA

SEQ ID NO 7:

ASAAAPAAASAAASAPSAAA

ES 2 784 911 T3

SEQ ID NO 8: PAS200 rBoNT/A (secuencia de aminoácidos)

5 MGSSHHHHHGSLSVPRSSSASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAA
 SPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAA
 SPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAA
 SPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAAPFVNKQFNYKDPVNGVDIAY
 IKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWWIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDSTYLSTD
 10 NEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPD
 GSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLE
 VDTNPLLGAAGKFDTPAVTLAHELHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSE
 ELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKKFDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFEKEY
 15 LLS EDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDAVFKNINIVPK
 VNYTIYDGFNLNNTNLAANFNGQNTNINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKAGA
 GKSLVPRGSAGAGALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENIS
 LDLIQQYYLTNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLR
 AQEFEHKGSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVKNKATEAAMFLGWVEQLVYDFT
 20 DETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPV
 LGTFALVSYIANKVLTQVTDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLRKKMKEA
 LENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSY
 LMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLLKDKVNNTLSTDIPFQLSK
 25 YVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQ
 LFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWRIRPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWK
 VSLNYGEIIWTLQDTQEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRL
 IDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNNG
 30 ILKDFWGDYLYQDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLY
 RGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVG
 NLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNTIAKLVASNWNRYQIERSS
 RTLGCSWEFIPVDDGWGERPLGDLVPRGSANSSSVDKLWSHPQFEK

35

40

45

50

55

60

65

SEQ ID NO 9: PAS100 rBoNT/A (secuencia de aminoácidos)

5 MGSSHHHHHHGSLVPRSSSASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAA
SPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAA
PFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNP
PPEAKQVPVSYDDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGS
10 TIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYG
STQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAAGKFDTPAVTLAHELHAGHRLYGIATNPNR
VFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASLTNKKAK
SIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLFKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVL
NRKTYLNFDAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLNRLNLAANFNGQNTNINNMFTKLKNETG
15 LFEFYKLLCVRGIITSKAGAGKSLVPRGSAGAGALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDL
NKGEEITSNTNIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIE
RFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFHKGSRALTNVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVN
KATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMMLYKDDFVGA
20 LIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVTDNALSQRNEKWDEVYKYIVT
NWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNE
SINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVD
RLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYA
25 SKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVNSMYENFSTSFWIRIPKYFNS
ISLNNEYTIINCMENNSGWKVSILNYGEIIWTLQDTQEIQRVVFYKYSQMINISDYINRWI
FVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIYKYNLF
DKELNEKEIKDLYDNQSNISGILKDFWGDYLYQDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMY
30 LKGRGSMVTNTNIYLNSSLYRGTKFIKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVVKNKEYRLAT
NASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQF
NNIAKLVASNWNRQIERSSRTLGCSEFI PVDDGWGERPLGDLVPRGSANSSSVDKLWS
HPQFEK
35

40

45

50

55

60

65

SEQ ID NO 10: PAS200 rBoNT/A (secuencia de ácidos nucleicos)

5 ATGGGCAGCAGCCATCATCATCACCATCATGGTAGCCTGGTTCCGCGTAGCTCTTCTGCA
 AGTCCGGCAGCACCGGCACCGGCTTCACCAGCTGCACCAGCACCTAGCGCACCGGCAGCA
 TCTCCAGCAGCCCCTGACCGGCAAGCCCTGCAGCTCCAGCACCGTCAGCACCGCAGCA
 AGCCCAGCTGCTCCTGCTCCAGCGAGCCCAGCAGCGCCAGCTCCTAGTGCCCCCTGCTGCC
 10 TCTCCTGCTGCTCCGGCACCAGCAAGTCCTGCTGCGCCTGCACCGAGTGCTCCGGGCTGCT
 AGTCCTGCCGCACCAGCTCCGGCTAGTCCAGCTGCTCCAGCCCCCTTCAGCTCCGGCAGCT
 TCCCCTGCAGCGCCTGCCCCTGCCAGTCCAGCGGCTCCTGCACCTAGTGCGCCTGCAGCT
 TCACCGGCTGCCCCTGCGCCAGCTTCTCCTGCGGCTCCAGCTCCATCTGCCCCAGCCGCA
 15 TCCCCAGCGGCACCAGCTCCAGCTTCTCCGGCAGCGCCAGCACCTTCTGCGCCTGCCGCA
 TCTCCTGCAGCACCGCGCCTGCGAGTCTGTCAGCTCCTGCTCCTTCAGCCCCCTGCGGCA
 AGTCCAGCAGCACCGCCCCAGCAAGCCCAGCCGCACCAGCACCATCTGCCCCTGACGCA
 CCATTTGTGAACAAGCAGTTTAACTATAAGGACCCGGTGAACGGTGTGGATATCGCGTAT
 20 ATCAAAATCCCGAATGCGGGCCAGATGCAACCAGTCAAGGCGTTCAAGATTCAACAAG
 ATTTGGGTTATTCCGGAACGTGATACCTTACCAATCCGGAAGAAGGCGACTTAAACCCG
 CCGCCAGAAGCCAAACAAGTGCCGGTGAGCTACTATGATAGCACGTATCTTAGCACCGAT
 AATGAAAAAGACAATTACCTGAAGGGCGTGACCAAGTTGTTTCGAGCGCATCTACAGTACC
 25 GACTTAGGCCGCATGTTGTTGACGAGCATCGTTGCGGCTATCCCGTTCTGGGGCGGCTCG
 ACCATTGATACCGAGTTGAAAGTCATTGACACGAACTGTATCAATGTTATCCAACCGGAC
 GGCAGTTATCGCAGCGAGGAGTTAAATTTGGTTCATCATCGGTCCAAGCGCAGATATTATT
 CAGTTCGAATGCAAGAGCTTCGGCCATGAGGTCTTGAATTTGACGCGCAACGGTTACGGC
 30 AGCACCCAATACATCCGCTTTAGCCCGGATTTACCTTTGGCTTCGAGGAGAGCTTGGAG
 GTGGACACCAACCCGCTGTTAGGTGCCGGCAAATTCGCAACCGACCCGGCAGTGACGTTG
 GCGCACGAATTGATTCATGCGGGTCACCGCTTATACGGTATCGCGATCAATCCGAATCGC
 GTCTTTTAAAGTCAATACCAACGCGTACTACGAAATGAGCGGCTTAGAGGTTAGCTTTGAA
 35 GAATTACGCACCTTCGGTGCCACGACGCCAAGTTCATCGACAGCCTGCAGGAAAATGAG
 TTCCGCTTGTACTATTACAATAAATTCAGGACATCGCGAGCACCTTAAATAAAGCAAAG
 AGCATTGTGGGCACCACCGCAAAGCTTGCAGTACATGAAGAACGTATTTAAGGAAAAATAT
 TTGTTGTGCGGAGGATACCAGCGGGAAATTCAGCGTCGATAAGCTGAAATTCGACAAATTG
 40 TATAAAATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGATAACTTCGTCAAGTTTTTTAAGGTGTTA
 AATCGTAAGACCTATTTAACTTTGATAAAGCGGTGTTTAAAATTAATATCGTGCCGAAG
 GTGAATTACACCATCTACGATGGTTTCAATTTACGCAACACGAATCTGGCGGCGAATTTT
 AATGGCCAAAACACCGAAATTAACAACATGAACTTTACGAAGTTAAAGAATTTACGGGC
 45 TTATTTCGAATTCTACAAGTTATTATGCGTGCGCGGCATCATTACCAGCAAGGCAGGTGCG
 GGCAAGTCCTTGGTTCCGCGTGCGCAGCGCCGGCGCGCGCTCAATGATCTGTGTATT
 AAAGTCAATAACTGGGACCTGTTCTTCAGCCGAGCGAGGATAACTTTACCAACGACTTA
 AACAAAGGCGAGGAGATCACGAGCGATACGAACATCGAGGCGCGGAGGAAAATATTAGC
 50 CTGGACCTCATTACAGCAGTACTATCTGACGTTCAATTTTGACAATGAGCCGGAGAACATC
 AGCATTGAAAATCTCAGCAGCGACATCATCGGTCAAGTTGGAAGTATGCCGAACATTGAA
 CGCTTTCCGAACGGCAAAAAATATGAACTGGACAAGTATACCATGTTCCATTACTTACGC
 GCACAGGAATTTGAGCACGGCAAGAGCCGCATTGCGCTGACCAATAGCGTTAACGAGGCC
 55 TTGTTAAATCCGAGCCGTGTCTACACGTTCTTCAGCAGCGATTATGTCAAAAAAGTGAAC
 AAGGCGACCGAAGCCGCGATGTTTTTGGGCTGGGTGAGCAATTGGTTTACGATTTTACC
 GACGAAACCAGCGAGGTGAGCACGACCGACAAAATTGCAGATATCACCATCATCATTCCG
 60 TACATCGGTCCGGCGCTCAATATCGGCAATATGTTATACAAGGACGACTTTGTGGGCGCG

65

CTGATCTTTAGCGGCGCGGTTATCTTATTAGAATTCATCCCGGAGATCGCAATCCCGGTC
 TTGGGCACCTTTGCGTTGGTGAGCTATATCGGAATAAAGTGCTCACGGTCCAAACCATC
 5 GATAACGCGCTCAGCAAGCGTAATGAGAAATGGGACGAGGTTTATAAGTATATCGTGACC
 AACTGGTTAGCAAAAGTCAATACGCAGATCGATCTCATCCGCAAAAAAATGAAAGAAGCC
 TTGGAAAATCAAGCGGAGGCAACCAAAGCCATCATTAATTACCAGTATAACCAATATACC
 GAAGAAGAAAAAACAATATCAACTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAACCTGAACGAG
 10 AGCATTAACAAAGCGATGATTAACATCAACAAGTTCTTGAATCAATGCAGCGTGAGCTAT
 CTCATGAACAGCATGATCCCGTATGGCGTCAAACGCTTGGAAGATTTTGACGCCAGCCTG
 AAAGATGCGCTCCTCAAGTATATTTATGACAACCGCGGCACCCTCATTGGCCAGGTGGAC
 CGCTTGAAGGATAAAGTGAACAATACGCTCAGCACGGATATCCCGTTCCAGCTGAGCAAG
 TACGTCGACAACAGCGCTTACTGAGCACCTTTACCGAGTATATCAAGAACATCATTAAT
 15 ACCAGCATCCTCAACTTGCGCTATGAGAGCAATCACCTGATCGACCTCAGCCGCTACGCC
 AGCAAGATCAACATCGGCAGCAAGGTCAATTTGACCCGATCGATAAGAATCAGATCCAA
 TTGTTTAACTGGAAAGCAGCAAGATCGAGGTTATCTTGAAGAACGCGATTGTGTACAAC
 AGCATGTACGAGAACTTTAGCACGAGCTTCTGGATTCTGATCCCCGAAGTATTTCAATAGC
 20 ATTAGCCTGAATAACGAATATACCATTATCAACTGCATGGAAAATAATAGCGGCTGGAAG
 GTGAGCTTAAATTACGGCGAGATCATTTGGACCTTACAGGATACCCAAGAAATCAAACAG
 CGCGTCGTCTTTAAGTATAGCCAGATGATCAACATCAGCGATTACATCAACCGCTGGATC
 TTCGTGACCATCACCAATAATCGCTTGAATAATAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTG
 25 ATTGATCAAAAACCGATCAGCAATCTCGGTAATATCCATGCCAGCAATAACATCATGTTT
 AAGTTAGACGGTTGCCGCGATACCCACCGCTATATCTGGATCAAGTATTTTAACTTATTT
 GATAAGGAACCAACGAAAAGGAAATTAAGACTTATATGACAATCAGAGCAATAGCGGC
 ATCCTGAAGGATTTCTGGGGCGACTACCTGCAGTACGATAAGCCGTAATATATGTTGAAC
 30 TTGTATGACCCGAACAAATATGTCGATGTGAACAATGTGGGTATTCTGTGGCTATATGTAC
 TTAAAGGGCCCGCGTGCTGATGACCACGAATATTTACTTAAACAGCAGCTTATAC
 CGCGGCACGAAGTTTATTATCAAGAAGTATGCCAGCGGCAACAAGGACAATATCGTCCGC
 AACACGACCGTGTGTATATTAACGTGGTGGTGAAGAATAAAGAGTACCGCTTGGCCACG
 35 AATGCGAGCCAGGCGGGCGTGGAAAAATCTTGAGCGCGTTGGAGATCCCGGACGTCGGC
 AACCTCAGCCAGGTTGTGGTGATGAAGTCTAAAAACGACCAGGGCATCACGAACAAGTGC
 AAAATGAATTTGCAAGATAACAACGGCAACGACATCGGCTTTATTGGTTTTCACCAAGTTC
 AATAACATCGCCAAACTCGTGGCCAGCAATTGGTATAACCGCCAAATTGAACGCAGCAGC
 40 CGCACGCTCGGCTGTAGCTGGGAGTTCATCCCGGTGGACGATGGCTGGGGCGAGCGCCCG
 CTCGGAGATCTGGTGCCACGCGGTTCCGCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTTGGAGC
 CACCCGCAGTTCGAAAAATAA

45 SEQ ID NO 11: PAS100 rBoNT/A (secuencia de ácidos nucleicos)

ATGGGTAGCAGCCATCATCATCACCATCATGGTAGCCTGGTTCCGCGTAGCTCTTCTGCA
 50 AGTCCGGCAGCACCGGCACCGGCTTCACCAGCTGCACCAGCACCTAGCGCACCGGCAGCA
 TCTCCAGCAGCCCCCTGCACCGGCAAGCCCTGCAGCTCCAGCACCGTCAGCACAGCAGCA
 AGCCCAGCTGCTCCTGCTCCAGCGAGCCCAGCAGCGCCAGCTCCTAGTGCCCCTGCTGCC
 TCTCCTGCTGCTCCGGCACAGCAAGTCCTGCTGCGCCTGCACCGAGTGCTCCGGCTGCT
 55 AGTCCTGCCGCACCAGCTCCGGCTAGTCCAGCTGCTCCAGCCCCCTCAGCCCCCTGCAGCA

60

65

5 CCATTTGTGAACAAGCAGTTTAACTATAAGGACCCGGTGAACGGTGTGGATATCGCGTAT
 ATCAAAATCCCGAATGCGGGCCAGATGCAACCAGTCAAGGCGTTCAAGATTCAATAACAAG
 ATTTGGGTATTATCCGGAACGTGATACCTTCACCAATCCGGAAGAAGGCGATTAAATCCG
 CCGCCAGAAGCCAAACAAGTGCCGGTGAGCTACTATGATAGCACGTATCTTAGCACCGAT
 10 AATGAAAAAGACAATTACCTGAAGGGCGTGACCAAGTTGTTTCGAGCGCATCTACAGTACC
 GACTTAGGCCGCATGTTGTTGACGAGCATCGTTTCGCGGTATCCCGTTCTGGGGCGGCTCG
 ACCATTGATACCGAGTTGAAAGTCATTGACACGAACGTATCAATGTTATCCAACCGGAC
 GGCAGTTATCGCAGCGAGGAGTTAAATTTGGTCATCATCGGTCCAAGCGCAGATATTATT
 15 CAGTTCGAATGCAAGAGCTTCGGCCATGAGGTCTTGAATTTGACGCGCAACGGTTACGGC
 AGCACCCAATACATCCGCTTTAGCCCCGATTTCACCTTTGGCTTCGAGGAGAGCTTGGAG
 GTGGACACCAACCCGCTGTTAGGTGCCGGCAAATTCGCAACCGACCCGGCAGTGACGTTG
 GCGCACGAATTGATTCATGCGGGTCACCGCTTATACGGTATCGCGATCAATCCGAATCGC
 20 GTCTTTAAAGTCAATACCAACGCGTACTACGAAATGAGCGGCTTAGAGGTTAGCTTTGAA
 GAATTACGCACCTTCGGTGGCCACGACGCCAAGTTCATCGACAGCCTGCAGGAAAATGAG
 TTCCGCTTGTAATAACAATAAATTCAGGACATCGCGAGCACCTTAAATAAAGCAAAG
 AGCATTGTGGGCACCACCGCAAGCTTGCAGTACATGAAGAACGTATTTAAGGAAAAATAT
 25 TTGTTGTGCGGAGGATACCAGCGGGAAATTCAGCGTCGATAAGCTGAAATTCGACAAATTG
 TATAAAATGCTGACCGAGATTTACACCGAGGATAACTTCGTCAAGTTTTTTAAGGTGTTA
 AATCGTAAGACCTATTTAAACTTTGATAAAGCGGTGTTTAAAATTAATATCGTGCCGAAG
 GTGAATTACACCATCTACGATGGTTTTCAATTTACGCAACACGAATCTGGCGGCGAATTTT
 30 AATGGCCAAAACACCGAAATTAACAACATGAACTTTACGAAGTTAAAGAATTTACCGGGC
 TTATTCTGAATTCTACAAGTTATTATGCGTGCGCGGCATCATTACCAGCAAGGCAGGTGCG
 GGCAAGTCCTTGGTTCCGCGTGCGCAGCGCCGGCGCGGCTCAATGATCTGTGTATT
 AAAGTCAATAACTGGGACCTGTTCTTCAGCCCGAGCGAGGATAACTTTACCAACGACTTA
 35 AACAAAGGCGAGGAGATCACGAGCGATACGAACATCGAGGCGGCGGAGGAAAATATTAGC
 CTGGACCTCATTACAGCAGTACTATCTGACGTTCAATTTTGACAATGAGCCGGAGAACATC
 AGCATTGAAAATCTCAGCAGCGACATCATCGGTGAGTTGGAAGTATGCGCAACATTGAA
 CGCTTTCCGAACGGCAAAAAATATGAACTGGACAAGTATACCATGTTCCATTACTTACGC
 40 GCACAGGAATTTGAGCACGGCAAGAGCCGCATTGCGCTGACCAATAGCGTTAACGAGGCC
 TTGTTAAATCCGAGCCGTGTCTACACGTTCTTCAGCAGCGATTATGTCAAAAAAGTGAAC
 AAGGCGACCGAAGCCGCGATGTTTTTGGGCTGGGTGAGCAATTGGTTTACGATTTTACC
 45 GACGAAACCAGCGAGGTGAGCACGACCGACAAAATTGCAGATATCACCATCATCATTCG
 TACATCGGTCCGGCGCTCAATATCGGCAATATGTTATACAAGGACGACTTTGTGGGCGCG
 CTGATCTTTAGCGGCGCGGTTATCTTATTAGAATTCATCCCGGAGATCGCAATCCCGGTC
 TTGGGCACCTTTGCGTTGGTGAGCTATATCGCGAATAAAGTGCTCACGGTCCAAACCATC
 50 GATAACGCGCTCAGCAAGCGTAATGAGAAATGGGACGAGGTTTATAAGTATATCGTGACC
 AACTGGTTAGCAAAAGTCAATACGCAGATCGATCTCATCCGCAAAAAAATGAAAGAAGCC
 TTGGAAAATCAAGCGGAGGCAACCAAGCCATCATTAATTACCAGTATAACCAATATACC
 GAAGAAGAAAAAACAATATCAACTTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAACTGAACGAG
 55 AGCATTAACAAAGCGATGATTAACATCAACAAGTTCTTGAATCAATGCAGCGTGAGCTAT
 CTCATGAACAGCATGATCCCGTATGGCGTCAAACGCTTGGAAGATTTTGACGCCAGCCTG
 AAAGATGCGCTCCTCAAGTATATTTATGACAACCGCGGCACCCTCATTGGCCAGGTGGAC
 60 CGCTTGAAGGATAAAGTGAACAATACGCTCAGCACGGATATCCCGTTCCAGCTGAGCAAG

65

TACGTCGACAACCAGCGCTTACTGAGCACCTTTACCGAGTATATCAAGAACATCATTAAT
ACCAGCATCCTCAACTTGCGCTATGAGAGCAATCACCTGATCGACCTCAGCCGCTACGCC
AGCAAGATCAACATCGGCAGCAAGGTCAATTTTCGACCCGATCGATAAGAATCAGATCCAA
TTGTTTAACTGGAAAGCAGCAAGATCGAGGTATCTTGAAAGACGCGATTGTGTACAAC
AGCATGTACGAGAACTTTAGCACGAGCTTCTGGATTCTGATCCCGAAGTATTTCAATAGC
ATTAGCCTGAATAACGAATATAACCATTATCAACTGCATGGAAAATAATAGCGGCTGGAAG
GTGAGCTTAAATTACGGCGAGATCATTTGGACCTTACAGGATACCCAAGAAATCAAACAG
CGCGTCGTCTTTAAGTATAGCCAGATGATCAACATCAGCGATTACATCAACCGCTGGATC
TTCGTGACCATCACCAATAATCGCTTGAATAATAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTG
ATTGATCAAAAACCGATCAGCAATCTCGGTAATATCCATGCCAGCAATAACATCATGTTT
AAGTTAGACGGTTGCCGCGATACCCACCGCTATATCTGGATCAAGTATTTTAACTTATTT
GATAAGGAACTCAACGAAAAGGAAATTAAAGACTTATATGACAATCAGAGCAATAGCGGC
ATCCTGAAGGATTTCTGGGGCGACTACCTGCAGTACGATAAGCCGTACTATATGTTGAAC
TTGTATGACCCGAACAAATATGTCGATGTGAACAATGTGGGTATTCTGTGGCTATATGTAC
TTAAAGGGCCCGCGTGGTAGCGTGATGACCACGAATATTTACTTTAAACAGCAGCTTATAC
CGCGGCACGAAGTTTATTATCAAGAAGTATGCCAGCGGCAACAAGGACAATATCGTCCGC
AACACGACCGTGTGTATATTAACGTGGTGGTGAAGAATAAAGAGTACCGCTTGGCCACG
AATGCGAGCCAGGCGGGCGTGGA AAAAATCTTGAGCGCGTTGGAGATCCCGGACGTCGGC
AACCTCAGCCAGGTGTGGTGATGAAGTCTAAAAACGACCAGGGGCATCACGAACAAGTGC
AAAATGAATTTGCAAGATAACAACGGCAACGACATCGGCTTTATTGGTTTTTACCAGTTC
AATAACATCGCCAAACTCGTGGCCAGCAATTGGTATAACCGCCAAATTGAACGCAGCAGC
CGCACGCTCGGCTGTAGCTGGGAGTTCATCCCGGTGGACGATGGCTGGGGCGAGCGCCCCG
CTCGGAGATCTGGTGCCACGCGGTTCCGCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTTGGAGC
CACCCGCAAGTTCGAAAAATAA

SEQ ID NO 12: VPASA100

[illegible]

SEQ ID NO 13: VAPSA100

[illegible]

SEQ ID NO 14: VPASA100-rBoNT/A (secuencia de aminoácidos)

`MGSSHHHHHGHSLVPRSVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAPFVNKQF
VPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAVPASAFVNKQF
NYKD PVNGVDIAYIKIPNAGQM QPVKA FKIH NKIWVIPERD TFTNP EEGDL NPPPEAKQ VPV
SY YDSTY LSTDNE KDNYLKGVT KLFER IYST DLGRML LTSIVR GIPFWGG STIDTELKV IDT
NCINVIQP DGSY RSEELNLVII GPSADIIQE CKSFGHEVL NLTRNGYGSTQYIRFS PDFTF
GFEE SLEVDT NP LLGAGKFATDP AVTLA HELIH AGHR LYGIA INPN RVFKVNTN AYYEMSGL`

5 EVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFK
 EKYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVP
 KVNYYTIYDGFNLNNTNLAANFNGQNTTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKAGAG
 10 KSLVPRGSAGAGALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDL
 IQQYYLTFFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFE
 HGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVS
 15 TTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSY
 IANKVLTQVQIDNALSQRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAI
 INYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRL
 EDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYI
 20 KNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAI
 VYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVS LNYGEIIWTLQDTQEIK
 QRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPI SNLGNIHASNNIMFK
 LDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSN SGILKDFWGDYLYDKPYMYMLNLYD
 25 PNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRV
 YINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDN
 NGNDIGFIGFHQFNNAKLVASNWNQRQIERSSRTLGC SWEFIPVDDGWGERPLGDLVPRGS
 ANSSSVDKLWSHPQFEK

SEQ ID NO 15: VAPSA100-rBoNT/A (secuencia de aminoácidos)

30 MGSSHHHHHHGSLVPRSVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSA
 VAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSAVAPSA
 NYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWVIPERDFTFNPEEGDLNPPPEAKQVPV
 35 SYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDT
 NCINVIQPDGSYRSEELNLVII GPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTF
 GFEESELEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGL
 EVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFK
 40 EKYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVP
 KVNYYTIYDGFNLNNTNLAANFNGQNTTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKAGAG
 KSLVPRGSAGAGALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDL
 IQQYYLTFFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFE
 45 HGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVS
 TTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSY
 IANKVLTQVQIDNALSQRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAI
 INYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRL
 50 EDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYI
 KNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAI
 VYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVS LNYGEIIWTLQDTQEIK
 QRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPI SNLGNIHASNNIMFK
 55 LDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSN SGILKDFWGDYLYDKPYMYMLNLYD
 PNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRV
 YINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDN
 60 NGNDIGFIGFHQFNNAKLVASNWNQRQIERSSRTLGC SWEFIPVDDGWGERPLGDLVPRGS
 ANSSSVDKLWSHPQFEK

Listado de Secuencias

<110> merz pharma gmbh & co. Kgaa

5 <120> nuevas neurotoxinas costridiales recombinantes con mayor duración del efecto

<130> 111553p502pc

<160> 15

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 20

15

<212> prt

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia_i de pas20

20

<400> 1

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

25

Ser Ala Pro Ala
20

<210> 2

30

<211> 20

<212> prt

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Secuencia_ii de pas20

<400> 2

Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

40

Ala Ala Pro Ser
20

<210> 3

45

<211> 20

<212> prt

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> Secuencia_iii de pas20

<400> 3

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala
1 5 10 15

55

Ser Pro Ser Ser
20

60

<210> 4

<211> 20

<212> prt

<213> Secuencia artificial

65

ES 2 784 911 T3

ES 2 784 911 T3

<220>

<223> PAS200 rBONT/A: Secuencia de proteína

5 Met Gly Ser Ser His His His His His Gly Ser Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Ser Ser Ser Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala
20 25 30

10 Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala
35 40 45

15 Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala
50 55 60

Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala
65 70 75 80

20 Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser
85 90 95

25 Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala
100 105 110

Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala
115 120 125

30 Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala
130 135 140

35 Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala
145 150 155 160

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser
165 170 175

40 Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala
180 185 190

Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala
195 200 205

45 Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Pro Phe Val Asn
210 215 220

ES 2 784 911 T3

Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr
 225 230 235 240
 5 Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys
 245 250 255
 Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn
 260 265 270
 10 Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro
 275 280 285
 15 Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp
 290 295 300
 Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr
 305 310 315 320
 20 Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe
 325 330 335
 25 Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn
 340 345 350
 Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu
 355 360 365
 30 Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys
 370 375 380
 35 Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly
 385 390 395 400
 Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu
 405 410 415
 40 Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe
 420 425 430
 Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly
 435 440 445
 45 His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val
 450 455 460
 50 Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu
 465 470 475 480
 Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu
 485 490 495
 55
 60
 65

ES 2 784 911 T3

Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile
 500 505 510
 5 Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser
 515 520 525
 Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu
 530 535 540
 10 Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu
 545 550 555 560
 15 Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe
 565 570 575
 Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val
 580 585 590
 20 Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly
 595 600 605
 Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn
 610 615 620
 25 Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly
 625 630 635 640
 30 Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser
 645 650 655
 Lys Ala Gly Ala Gly Lys Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Ala Gly Ala
 660 665 670
 35 Gly Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe
 675 680 685
 40 Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu
 690 695 700
 Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser
 705 710 715 720
 45 Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu
 725 730 735
 50 Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln
 740 745 750
 Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr
 755 760 765
 55
 60
 65

ES 2 784 911 T3

Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe
 770 775 780
 5 Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala
 785 790 795 800
 Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val
 805 810 815
 10 Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val
 820 825 830
 15 Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr
 835 840 845
 Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro
 850 855 860
 20 Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala
 865 870 875 880
 25 Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile
 885 890 895
 Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn
 900 905 910
 30 Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn
 915 920 925
 Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala
 930 935 940
 35 Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala
 945 950 955 960
 40 Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr
 965 970 975
 Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp
 980 985 990
 45 Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn
 995 1000 1005
 50 Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn
 1010 1015 1020
 Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala
 1025 1030 1035

ES 2 784 911 T3

	Ser	Leu	Lys	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Asn	Arg	Gly
		1040					1045					1050			
5	Thr	Leu	Ile	Gly	Gln	Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Asp	Lys	Val	Asn	Asn
		1055					1060					1065			
	Thr	Leu	Ser	Thr	Asp	Ile	Pro	Phe	Gln	Leu	Ser	Lys	Tyr	Val	Asp
		1070					1075					1080			
10	Asn	Gln	Arg	Leu	Leu	Ser	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr	Ile	Lys	Asn	Ile
		1085					1090					1095			
15	Ile	Asn	Thr	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Arg	Tyr	Glu	Ser	Asn	His	Leu
		1100					1105					1110			
	Ile	Asp	Leu	Ser	Arg	Tyr	Ala	Ser	Lys	Ile	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys
		1115					1120					1125			
20	Val	Asn	Phe	Asp	Pro	Ile	Asp	Lys	Asn	Gln	Ile	Gln	Leu	Phe	Asn
		1130					1135					1140			
25	Leu	Glu	Ser	Ser	Lys	Ile	Glu	Val	Ile	Leu	Lys	Asn	Ala	Ile	Val
		1145					1150					1155			
	Tyr	Asn	Ser	Met	Tyr	Glu	Asn	Phe	Ser	Thr	Ser	Phe	Trp	Ile	Arg
		1160					1165					1170			
30	Ile	Pro	Lys	Tyr	Phe	Asn	Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Asn	Glu	Tyr	Thr
		1175					1180					1185			
35	Ile	Ile	Asn	Cys	Met	Glu	Asn	Asn	Ser	Gly	Trp	Lys	Val	Ser	Leu
		1190					1195					1200			
	Asn	Tyr	Gly	Glu	Ile	Ile	Trp	Thr	Leu	Gln	Asp	Thr	Gln	Glu	Ile
		1205					1210					1215			
40	Lys	Gln	Arg	Val	Val	Phe	Lys	Tyr	Ser	Gln	Met	Ile	Asn	Ile	Ser
		1220					1225					1230			
45	Asp	Tyr	Ile	Asn	Arg	Trp	Ile	Phe	Val	Thr	Ile	Thr	Asn	Asn	Arg
		1235					1240					1245			
	Leu	Asn	Asn	Ser	Lys	Ile	Tyr	Ile	Asn	Gly	Arg	Leu	Ile	Asp	Gln
		1250					1255					1260			
50	Lys	Pro	Ile	Ser	Asn	Leu	Gly	Asn	Ile	His	Ala	Ser	Asn	Asn	Ile
		1265					1270					1275			
	Met	Phe	Lys	Leu	Asp	Gly	Cys	Arg	Asp	Thr	His	Arg	Tyr	Ile	Trp
		1280					1285					1290			

ES 2 784 911 T3

	Ile	Lys	Tyr	Phe	Asn	Leu	Phe	Asp	Lys	Glu	Leu	Asn	Glu	Lys	Glu
		1295					1300					1305			
5	Ile	Lys	Asp	Leu	Tyr	Asp	Asn	Gln	Ser	Asn	Ser	Gly	Ile	Leu	Lys
		1310					1315					1320			
	Asp	Phe	Trp	Gly	Asp	Tyr	Leu	Gln	Tyr	Asp	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Met
		1325					1330					1335			
10	Leu	Asn	Leu	Tyr	Asp	Pro	Asn	Lys	Tyr	Val	Asp	Val	Asn	Asn	Val
		1340					1345					1350			
15	Gly	Ile	Arg	Gly	Tyr	Met	Tyr	Leu	Lys	Gly	Pro	Arg	Gly	Ser	Val
		1355					1360					1365			
	Met	Thr	Thr	Asn	Ile	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ser	Leu	Tyr	Arg	Gly	Thr
		1370					1375					1380			
20	Lys	Phe	Ile	Ile	Lys	Lys	Tyr	Ala	Ser	Gly	Asn	Lys	Asp	Asn	Ile
		1385					1390					1395			
25	Val	Arg	Asn	Asn	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	Asn	Val	Val	Val	Lys	Asn
		1400					1405					1410			
	Lys	Glu	Tyr	Arg	Leu	Ala	Thr	Asn	Ala	Ser	Gln	Ala	Gly	Val	Glu
		1415					1420					1425			
30	Lys	Ile	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	Ile	Pro	Asp	Val	Gly	Asn	Leu	Ser
		1430					1435					1440			
35	Gln	Val	Val	Val	Met	Lys	Ser	Lys	Asn	Asp	Gln	Gly	Ile	Thr	Asn
		1445					1450					1455			
	Lys	Cys	Lys	Met	Asn	Leu	Gln	Asp	Asn	Asn	Gly	Asn	Asp	Ile	Gly
		1460					1465					1470			
40	Phe	Ile	Gly	Phe	His	Gln	Phe	Asn	Asn	Ile	Ala	Lys	Leu	Val	Ala
		1475					1480					1485			
45	Ser	Asn	Trp	Tyr	Asn	Arg	Gln	Ile	Glu	Arg	Ser	Ser	Arg	Thr	Leu
		1490					1495					1500			
	Gly	Cys	Ser	Trp	Glu	Phe	Ile	Pro	Val	Asp	Asp	Gly	Trp	Gly	Glu
		1505					1510					1515			
50	Arg	Pro	Leu	Gly	Asp	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala	Asn	Ser	Ser
		1520					1525					1530			
55	Ser	Val	Asp	Lys	Leu	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	Glu	Lys		
		1535					1540					1545			

ES 2 784 911 T3

<210> 9
 <211> 1446
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PAS100 rBoNT/A: Secuencia de proteína

<400> 9

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

ES 2 784 911 T3

	225		230		235		240
5	Thr	Ile	Asp	Thr	Glu 245	Leu	Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val 250 255
	Ile	Gln	Pro	Asp	Gly	Ser Tyr Arg Ser	Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile 260 265 270
10	Ile	Gly	Pro	Ser	Ala	Asp	Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly 275 280 285
15	His	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr 290 295 300
	Ile	Arg	Phe	Ser	Pro	Asp	Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu 305 310 315 320
20	Val	Asp	Thr	Asn	Pro	Leu	Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro 325 330 335
	Ala	Val	Thr	Leu	Ala	His	Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr 340 345 350
25	Gly	Ile	Ala	Ile	Asn	Pro	Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala 355 360 365
30	Tyr	Tyr	Glu	Met	Ser	Gly	Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr 370 375 380
	Phe	Gly	Gly	His	Asp	Ala	Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu 385 390 395 400
35	Phe	Arg	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu 405 410 415
40	Asn	Lys	Ala	Lys	Ser	Ile	Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met 420 425 430
	Lys	Asn	Val	Phe	Lys	Glu	Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly 435 440 445
45	Lys	Phe	Ser	Val	Asp	Lys	Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu 450 455 460
50	Thr	Glu	Ile	Tyr	Thr	Glu	Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu 465 470 475 480
	Asn	Arg	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn 485 490 495
55	Ile	Val	Pro	Lys	Val	Asn	Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg

ES 2 784 911 T3

	500							505					510				
5	Asn	Thr	Asn 515	Leu	Ala	Ala	Asn	Phe 520	Asn	Gly	Gln	Asn	Thr 525	Glu	Ile	Asn	
	Asn	Met 530	Asn	Phe	Thr	Lys	Leu 535	Lys	Asn	Phe	Thr	Gly 540	Leu	Phe	Glu	Phe	
10	Tyr 545	Lys	Leu	Leu	Cys	Val 550	Arg	Gly	Ile	Ile	Thr 555	Ser	Lys	Ala	Gly	Ala 560	
	Gly	Lys	Ser	Leu	Val 565	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala 570	Gly	Ala	Gly	Ala	Leu 575	Asn	
15	Asp	Leu	Cys	Ile 580	Lys	Val	Asn	Asn	Trp 585	Asp	Leu	Phe	Phe	Ser 590	Pro	Ser	
20	Glu	Asp	Asn 595	Phe	Thr	Asn	Asp	Leu 600	Asn	Lys	Gly	Glu	Glu 605	Ile	Thr	Ser	
	Asp	Thr 610	Asn	Ile	Glu	Ala	Ala 615	Glu	Glu	Asn	Ile	Ser 620	Leu	Asp	Leu	Ile	
25	Gln 625	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Thr 630	Phe	Asn	Phe	Asp	Asn 635	Glu	Pro	Glu	Asn	Ile 640	
30	Ser	Ile	Glu	Asn	Leu 645	Ser	Ser	Asp	Ile	Ile 650	Gly	Gln	Leu	Glu	Leu 655	Met	
	Pro	Asn	Ile	Glu 660	Arg	Phe	Pro	Asn	Gly 665	Lys	Lys	Tyr	Glu	Leu 670	Asp	Lys	
35	Tyr	Thr	Met 675	Phe	His	Tyr	Leu	Arg 680	Ala	Gln	Glu	Phe	Glu 685	His	Gly	Lys	
40	Ser	Arg 690	Ile	Ala	Leu	Thr	Asn 695	Ser	Val	Asn	Glu	Ala 700	Leu	Leu	Asn	Pro	
	Ser 705	Arg	Val	Tyr	Thr	Phe 710	Phe	Ser	Ser	Asp	Tyr 715	Val	Lys	Lys	Val	Asn 720	
45	Lys	Ala	Thr	Glu	Ala 725	Ala	Met	Phe	Leu	Gly 730	Trp	Val	Glu	Gln	Leu 735	Val	
	Tyr	Asp	Phe	Thr 740	Asp	Glu	Thr	Ser	Glu 745	Val	Ser	Thr	Thr	Asp 750	Lys	Ile	
50	Ala	Asp	Ile 755	Thr	Ile	Ile	Ile	Pro 760	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala 765	Leu	Asn	Ile	
55	Gly	Asn	Met	Leu	Tyr	Lys	Asp	Asp	Phe	Val	Gly	Ala	Leu	Ile	Phe	Ser	
60																	
65																	

ES 2 784 911 T3

[illegible]

ES 2 784 911 T3

	1040		1045	-----	1050	
5	Lys Asn 1055	Ala Ile Val Tyr	Asn 1060	Ser Met Tyr Glu	Asn 1065	Phe Ser Thr
	Ser Phe 1070	Trp Ile Arg Ile	Pro 1075	Lys Tyr Phe Asn	Ser 1080	Ile Ser Leu
10	Asn Asn 1085	Glu Tyr Thr Ile	Ile 1090	Asn Cys Met Glu	Asn 1095	Asn Ser Gly
15	Trp Lys 1100	Val Ser Leu Asn	Tyr 1105	Gly Glu Ile Ile	Trp 1110	Thr Leu Gln
	Asp Thr 1115	Gln Glu Ile Lys	Gln 1120	Arg Val Val Phe	Lys 1125	Tyr Ser Gln
20	Met Ile 1130	Asn Ile Ser Asp	Tyr 1135	Ile Asn Arg Trp	Ile 1140	Phe Val Thr
25	Ile Thr 1145	Asn Asn Arg Leu	Asn 1150	Asn Ser Lys Ile	Tyr 1155	Ile Asn Gly
	Arg Leu 1160	Ile Asp Gln Lys	Pro 1165	Ile Ser Asn Leu	Gly 1170	Asn Ile His
30	Ala Ser 1175	Asn Asn Ile Met	Phe 1180	Lys Leu Asp Gly	Cys 1185	Arg Asp Thr
	His Arg 1190	Tyr Ile Trp Ile	Lys 1195	Tyr Phe Asn Leu	Phe 1200	Asp Lys Glu
35	Leu Asn 1205	Glu Lys Glu Ile	Lys 1210	Asp Leu Tyr Asp	Asn 1215	Gln Ser Asn
40	Ser Gly 1220	Ile Leu Lys Asp	Phe 1225	Trp Gly Asp Tyr	Leu 1230	Gln Tyr Asp
	Lys Pro 1235	Tyr Tyr Met Leu	Asn 1240	Leu Tyr Asp Pro	Asn 1245	Lys Tyr Val
45	Asp Val 1250	Asn Asn Val Gly	Ile 1255	Arg Gly Tyr Met	Tyr 1260	Leu Lys Gly
50	Pro Arg 1265	Gly Ser Val Met	Thr 1270	Thr Asn Ile Tyr	Leu 1275	Asn Ser Ser
	Leu Tyr 1280	Arg Gly Thr Lys	Phe 1285	Ile Ile Lys Lys	Tyr 1290	Ala Ser Gly
55	Asn Lys	Asp Asn Ile Val Arg	Asn Asn Asp Arg Val	Tyr Ile Asn		

ES 2 784 911 T3

		1295					1300						1305			
5	Val	Val 1310	Val	Lys	Asn	Lys	Glu 1315	Tyr	Arg	Leu	Ala	Thr 1320	Asn	Ala	Ser	
	Gln	Ala 1325	Gly	Val	Glu	Lys	Ile 1330	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu 1335	Ile	Pro	Asp	
10	Val	Gly 1340	Asn	Leu	Ser	Gln	Val 1345	Val	Val	Met	Lys	Ser 1350	Lys	Asn	Asp	
	Gln	Gly 1355	Ile	Thr	Asn	Lys	Cys 1360	Lys	Met	Asn	Leu	Gln 1365	Asp	Asn	Asn	
15	Gly	Asn 1370	Asp	Ile	Gly	Phe	Ile 1375	Gly	Phe	His	Gln	Phe 1380	Asn	Asn	Ile	
20	Ala	Lys 1385	Leu	Val	Ala	Ser	Asn 1390	Trp	Tyr	Asn	Arg	Gln 1395	Ile	Glu	Arg	
	Ser	Ser 1400	Arg	Thr	Leu	Gly	Cys 1405	Ser	Trp	Glu	Phe	Ile 1410	Pro	Val	Asp	
25	Asp	Gly 1415	Trp	Gly	Glu	Arg	Pro 1420	Leu	Gly	Asp	Leu	Val 1425	Pro	Arg	Gly	
30	Ser	Ala 1430	Asn	Ser	Ser	Ser	Val 1435	Asp	Lys	Leu	Trp	Ser 1440	His	Pro	Gln	
	Phe	Glu 1445	Lys													

35 <210> 10
 <211> 4641
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> PAS200 rBONT/A: Secuencia de ADN
 <400> 10

45	atgggcagca gccatcatca tcaccatcat ggtagcctgg ttccgcgtag ctcttctgca	60
	agtccggcag caccggcacc ggcttcacca gctgcaccag cacctagcgc accggcagca	120
	tctccagcag cccctgcacc ggcaagccct gcagctccag caccgtcagc accagcagca	180
50	agcccagctg ctctgtctcc agcgagccca gcagcgccag ctctagtgc ccctgctgcc	240
	tctcctgctg tcccggcacc agcaagtcct gctgcgctg caccgagtgc tccggctgct	300
	agtcttgccg caccagctcc ggctagtcca gctgctccag ccccttcagc tccggcagct	360
55	tccccctgcag cgcttgcccc tgccagtcca gcggctcctg cacctagtgc gcctgcagct	420
	tcaccggctg cccctgcgcc agcttctcct gcggctccag ctccatctgc cccagccgca	480

60

65

ES 2 784 911 T3

	tccccagcgg caccagctcc agctttctccg gcagcgccag cacctttctgc gcctgccgca	540
	tctcctgcag caccagcgcc tgcgagtcct gcagctcctg ctcccttcagc ccctgcggca	600
5	agtccagcag caccagcccc agcaagccca gccgcaccag caccatctgc ccctgcagca	660
	ccattttgtga acaagcagtt taactataag gacccggtga acggtgtgga tatcgcgtat	720
	atcaaaatcc cgaatgcggg ccagatgcaa ccagtcaagg cgttcaagat tcataacaag	780
10	at ttgggtta ttccggaacg tgataccttc accaatccgg aagaaggcga cttaaaccg	840
	ccgccagaag ccaaacaagt gccggtgagc tactatgata gcacgtatct tagcaccgat	900
	aatgaaaaag acaattacct gaagggcgtg accaagttgt tcgagcgcac ctacagtacc	960
15	gacttaggcc gcatgttggt gacgagcatc gttcgcggta tcccgttctg gggcggctcg	1020
	accattgata ccgagttgaa agtcattgac acgaactgta tcaatgttat ccaaccggac	1080
	ggcagttatc gcagcgagga gttaaatttg gtcacatcgc gtccaagcgc agatattatt	1140
	cagttcgaat gcaagagctt cggccatgag gtcttgaatt tgacgcgcaa cggttacggc	1200
20	agcacccaat acatccgctt tagcccggat ttcacctttg gcttcgagga gagcttgag	1260
	gtggacacca acccgctgtt aggtgccggc aaattcgcaa ccgaccggc agtgacgttg	1320
	gcgcacgaat tgattcatgc gggtcaccgc ttatacggta tcgcgatcaa tccgaatcgc	1380
25	gtctttaaag tcaataccea cgcgtactac gaaatgagcg gcttagaggt tagctttgaa	1440
	gaattacgca ccttcggtgg ccacgacgcc aagttcatcg acagcctgca ggaaaatgag	1500
	ttccgcttgt actattacaa taaattcaag gacatcgca gcaccttaa taaagcaaag	1560
30	agcattgtgg gcaccaccgc aagcttgca tacaatgaaga acgtatttaa ggaaaaatat	1620
	ttgttgcgag aggataccag cgggaaattc agcgtcgata agctgaaatt cgacaaattg	1680
	tataaaatgc tgaccgagat ttacaccgag gataacttcg tcaagttttt taagggtgta	1740
35	aatcgtaaga cctatttaaa ctttgataaa gcggtgttta aaattaatat cgtgccgaag	1800
	gtgaattaca ccatctacga tggtttcaat ttacgcaaca cgaatctggc ggcgaatttt	1860
	aatggccaaa acaccgaaat taacaacatg aactttacga agttaaagaa tttcacgggc	1920
40	ttattcgaat tctacaagtt attatgcgtg cgcggcatca ttaccagcaa ggcagggtgcg	1980
	ggcaagtcct tggttccgag tggcagcgcc ggcgccggcg cgctcaatga tctgtgtatt	2040
	aaagtcaata actgggacct gttcttcagc ccgagcgagg ataactttac caacgactta	2100
45	aacaaaggcg aggagatcac gagcgatacg aacatcgagg cggcggagga aaatattagc	2160
	ctggacctca ttcagcagta ctatctgacg ttcaattttg acaatgagcc ggagaacatc	2220
	agcattgaaa atctcagcag cgacatcatc ggtcagttgg aactgatgcc gaacattgaa	2280
50	cgctttccga acggcaaaaa atatgaactg gacaagtata ccatgttcca ttacttacgc	2340
	gcacaggaat ttgagcacgg caagagccgc attgcgctga ccaatagcgt taacgaggcc	2400
	ttgttaaadc cgagccgtgt ctacacgttc ttcagcagcg attatgtcaa aaaagtgaac	2460
55	aaggcgaccg aagccgcgat gtttttgggc tgggtcgagc aattggttta cgattttacc	2520
60		
65		

ES 2 784 911 T3

	gacgaaacca gcgaggtag cagcaccgac aaaattgcag atatcaccat catcattccg	2580
	tacatcggtc cggcgctcaa tatcggaat atgttataca aggacgactt tgtgggcgcg	2640
5	ctgatcttta gcggcgcggt tatcttatta gaattcatcc cggagatcgc aatccccggtc	2700
	ttgggcacct ttgcgttggt gagctatata gcgaataaag tgctcacggt ccaaaccatc	2760
	gataacgcgc tcagcaagcg taatgagaaa tgggacgagg ttataagta tatcgtgacc	2820
10	aactggttag caaaagtcaa tacgcagatc gatctcatcc gcaaaaaaat gaaagaagcc	2880
	ttggaaaatc aagcggaggc aaccaaagcc atcattaatt accagtataa ccaatatacc	2940
	gaagaagaaa aaaacaatat caacttcaat atcgatgatt tgagcagcaa actgaacgag	3000
	agcattaaca aagcgatgat taacatcaac aagtcttga atcaatgcag cgtgagctat	3060
15	ctcatgaaca gcatgatccc gtatggcgtc aaacgcttgg aagattttga cgccagcctg	3120
	aaagatgcgc tcctcaagta tatttatgac aaccgcggca ccttcattgg ccagggtggac	3180
	cgcttgaagg ataaagtga caatacgtc agcacggata tcccgttcca gctgagcaag	3240
20	tacgtcgaca accagcgctt actgagcacc ttaccgagt atatacaaga catcattaat	3300
	accagcatcc tcaacttgcg ctatgagagc aatcacctga tcgacctcag ccgctacgcc	3360
	agcaagatca acatcggcag caaggtcaat ttcgacccga tcgataagaa tcagatccaa	3420
25	ttgtttaacc tggaaagcag caagatcgag gtatcttga agaacgcgat tgtgtacaac	3480
	agcatgtacg agaactttag cagagcttc tggattcgta tccgaagta tttcaatagc	3540
	attagcctga ataacgaata taccattatc aactgcatgg aaaataatag cggctggaag	3600
30	gtgagcttaa attacggcga gatcatttgg accttacagg ataccaaga aatcaaacag	3660
	cgcgtcgtct ttaagtatag ccagatgatc aacatcagcg attacatcaa ccgctggatc	3720
	ttcgtgacca tcaccaataa tcgcttgaat aatagcaaga ttacatcaa tggctcgctt	3780
35	attgatcaaa aaccgatcag caatctcggg aatatccatg ccagcaataa catcatgttt	3840
	aagttagacg gttgccgcga taccaccgc tatatctgga tcaagtattt taacttattt	3900
	gataaggaac tcaacgaaa ggaaattaaa gacttatatg acaatcagag caatagcggc	3960
40	atcctgaagg atttctgggg cgactacctg cagtacgata agccgtacta tatgttgaac	4020
	ttgtatgacc cgaacaaata tgtcgatgtg aacaatgtgg gtattcgtgg ctatatgtac	4080
	ttaaagggcc cgcgtggtag cgtgatgacc acgaatattt acttaaacag cagcttatac	4140
45	cgcggcacga agtttattat caagaagtat gccagcggca acaaggacaa tatcgtccgc	4200
	aacaacgacc gtgtgtatat taacgtggtg gtgaagaata aagagtaccg cttggccacg	4260
	aatgcgagcc aggcgggct ggaaaaatc ttgagcgcgt tggagatccc ggacgtcggc	4320
50	aacctcagcc aggttgtggt gatgaagtct aaaaacgacc agggcatcac gaacaagtgc	4380
	aaaatgaatt tgcaagataa caacggcaac gacatcggct ttattggttt tcaccagttc	4440
	aataacatcg ccaactcgt ggccagcaat tggataaacc gccaaattga acgcagcagc	4500
55	cgcacgctcg gctgtagctg ggagttcatc ccggtggacg atggctgggg cgagcgccc	4560
	ctcggagatc tggtgccacg cggttccgcg aattcgagct ccgtcgacaa gctttggagc	4620
	cacccgcagt tcgaaaaata a	4641
60	<210> 11	
	<211> 4341	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65		

ES 2 784 911 T3

<220>

<223> PAS100 rBoNT/A: Secuencia de ADN

<400> 11

5	atgggtagca gccatcatca tcaccatcat ggtagcctgg ttccgcgtag ctcttctgca	60
	agtccggcag caccggcacc ggcttcacca gctgcaccag cacctagcgc accggcagca	120
	tctccagcag cccctgcacc ggcaagccct gcagctccag caccgtcagc accagcagca	180
10	agcccagctg ctcttgcctc agcgagccca gcagcgccag ctcttagtgc ccctgctgcc	240
	tctcctgctg tcccggcacc agcaagtcct gctgcgcctg caccgagtgc tccggctgct	300
	agtcttgccg caccagctcc ggctagtcca gctgctccag ccccttcagc ccctgcagca	360
15	ccatttgtga acaagcagtt taactataag gacccggtga acgggtgtgga tatcgcgat	420
	atcaaaatcc cgaatgcggg ccagatgcaa ccagtcaagg cgttcaagat tcataacaag	480
	atttgggtta ttccggaacg tgataccttc accaatccgg aagaaggcga tttaaatccg	540
20	ccgccagaag ccaacaagt gccggtgagc tactatgata gcacgtatct tagcaccgat	600
	aatgaaaaag acaattacct gaagggcgtg accaagttgt tcgagcgcat ctacagtacc	660
	gacttaggcc gcatgttggt gacgagcatc gttcgcggta tcccgttctg gggcggctcg	720
25	accattgata ccgagttgaa agtcattgac acgaactgta tcaatgttat ccaaccggac	780
	ggcagttatc gcagcgagga gttaaatttg gtcattcatc gtccaagcgc agatattatt	840
	cagttcgaat gcaagagctt cggccatgag gtcttgaatt tgacgcgcaa cggttacggc	900
30	agcacccaat acatccgctt tagcccgat ttcaccttg gcttcgagga gagcttggag	960
	gtggacacca acccgctggt aggtgccggc aaattcgcaa ccgacccggc agtgacgttg	1020
	gcgcacgaat tgattcatgc gggtcaccgc ttatacggta tcgcgatcaa tccgaatcgc	1080
35	gtcttttaaag tcaataccaa cgcgtactac gaaatgagcg gcttagaggt tagctttgaa	1140
	gaattacgca ccttcggtgg ccacgacgcc aagttcatcg acagcctgca ggaaaaatgag	1200
	ttccgcttgt actattacaa taaattcaag gacatcgca gcaccttaa taaagcaaag	1260
	agcattgtgg gcaccaccgc aagcttgca tacatgaaga acgtatttaa ggaaaaatat	1320
40	ttgttgctcg aggataccag cgggaaattc agcgtcgata agctgaaatt cgacaaattg	1380
	tataaaatgc tgaccgagat ttacaccgag gataacttcg tcaagttttt taaggtgtta	1440
	aatcgtaaga cctattttaa ctttgataaa gcggtgttta aaattaatat cgtgccgaag	1500
45	gtgaattaca ccatctacga tggtttcaat ttacgcaaca cgaatctggc ggcgaatttt	1560
	aatggccaaa acaccgaat taacaacatg aactttacga agttaaagaa tttcacgggc	1620
50		
55		
60		
65		

ES 2 784 911 T3

	ttattcgaat tctacaagtt attatgctg cgcggcatca ttaccagcaa ggcaggtgcg	1680
	ggcaagtcc tggttccgcg tggcagcgcc ggcgccggcg cgctcaatga tctgtgtatt	1740
5	aaagtcaata actgggacct gttcttcagc ccgagcgagg ataactttac caacgactta	1800
	aacaaaggcg aggagatcac gagcgatacg aacatcgagg cggcggagga aaatattagc	1860
	ctggacctca ttcagcagta ctatctgacg ttcaattttg acaatgagcc ggagaacatc	1920
10	agcattgaaa atctcagcag cgacatcatc ggtcagttgg aactgatgcc gaacattgaa	1980
	cgctttccga acggcaaaaa atatgaactg gacaagtata ccatgttcca ttacttacgc	2040
	gcacaggaat ttgagcacgg caagagccgc attgcgctga ccaatagcgt taacgaggcc	2100
	ttgttaaadc cgagccgtgt ctacacgttc ttcagcagcg attatgtcaa aaaagtgaac	2160
15	aaggcgaccg aagccgcat gtttttgggc tgggtcgagc aattggttta cgattttacc	2220
	gacgaaacca gcgaggtgag cagcaccgac aaaattgcag atatcaccat catcattccg	2280
	tacatcggtc cggcgctcaa tatcggaat atgttatata aggacgactt tgtgggcgcg	2340
20	ctgatcttta gcggcgcggt tatcttatta gaattcatcc cggagatcgc aatcccggtc	2400
	ttgggcacct ttgcgttggt gagctatata gcgaataaag tgctcacggt ccaaaccatc	2460
	gataacgcgc tcagcaagcg taatgagaaa tgggacgagg ttataagta tatcgtgacc	2520
25	aactggttag caaaagtcaa tacgcagatc gatctcatcc gcaaaaaaat gaaagaagcc	2580
	ttggaaaadc aagcggaggc aaccaaagcc atcattaatt accagtataa ccaatatacc	2640
	gaagaagaaa aaaacaatat caacttcaat atcgatgatt tgagcagcaa actgaacgag	2700
30	agcattaaca aagcgatgat taacatcaac aagtcttga atcaatgcag cgtgagctat	2760
	ctcatgaaca gcatgatccc gtatggcgtc aaacgcttgg aagattttga cgccagcctg	2820
	aaagatgcgc tcctcaagta tatttatgac aaccgcggca ccctcattgg ccaggtggac	2880
35	cgcttgaagg ataaagtga caatacgctc agcacggata tcccgttcca gctgagcaag	2940
	tacgtcgaca accagcgctt actgagcacc ttaccgagt atatcaagaa catcattaat	3000
	accagcatcc tcaacttgcg ctatgagagc aatcacctga tcgacctcag ccgctacgcc	3060
40	agcaagatca acatcggcag caaggtcaat ttcgacccga tcgataagaa tcagatccaa	3120
	ttgtttaacc tggaaagcag caagatcgag gttatcttga agaacgcgat tgtgtacaac	3180
	agcatgtacg agaactttag cagcagcttc tggattcgta tcccgaagta tttcaatagc	3240
45	attagcctga ataacgaata taccattatc aactgcatgg aaaataatag cggctggaag	3300
	gtgagcttaa attacggcga gatcatttgg accttacagg ataccaaga aatcaaacag	3360
	cgcgtcgtct ttaagtatag ccagatgatc aacatcagcg attacatcaa ccgctggatc	3420
50	ttcgtgacca tcaccaataa tcgcttgaat aatagcaaga ttacatcaa tggctcgttg	3480
	attgatcaaa aaccgatcag caatctcggg aatatccatg ccagcaataa catcatgttt	3540
	aagttagacg gttgccgcga taccaccgcg tatatctgga tcaagtattt taacttattt	3600
55	gataaggaac tcaacgaaaa ggaaattaaa gacttatatg acaatcagag caatagcggc	3660
60		
65		

ES 2 784 911 T3

atcctgaagg atttctgggg cgactacctg cagtacgata agccgtacta tatgttgaac 3720
 ttgtatgacc cgaacaaata tgtcgatgtg aacaatgtgg gtattcgtgg ctatatgtac 3780
 ttaaaggggc cgctgtgtag cgtgatgacc acgaatattt acttaaacag cagcttatac 3840
 5 cgcggcacga agtttattat caagaagtat gccagcggca acaaggacaa tatcgtccgc 3900
 aacaacgacc gtgtgtatat taacgtggtg gtgaagaata aagagtaccg cttggccacg 3960
 10 aatgcbagcc aggcgggctg ggaaaaaatc ttgagcgcgt tggagatccc ggacgtcggc 4020
 aacctcagcc aggttgtggt gatgaagtct aaaaacgacc agggcatcac gaacaagtgc 4080
 aaaatgaatt tgcaagataa caacggcaac gacatcggct ttattggttt tcaccagttc 4140
 15 aataacatcg ccaaactcgt ggccagcaat tggataaacc gccaaattga acgcagcagc 4200
 cgcacgctcg gctgtagctg ggagttcatc ccggtggacg atggctgggg cgagcgcccc 4260
 ctcggagatc tggtgccacg cggttccgcg aattcgagct ccgtcgacaa gctttggagc 4320
 caccgcagc tcaaaaaata a 4341
 20
 <210> 12
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia de VPASA100
 30
 <400> 12
 Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val
 1 5 10 15
 35 Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro
 20 25 30
 Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala
 35 40 45
 40 Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser
 50 55 60
 45 Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala
 65 70 75 80
 Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val
 85 90 95
 50 Pro Ala Ser Ala
 100
 <210> 13
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Secuencia de VAPSA100
 60
 <400> 13
 65

ES 2 784 911 T3

Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val
1 5 10 15

Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala
5 20 25 30

Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro
35 40 45

Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser
10 50 55 60

Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala
15 65 70 75 80

Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val
85 90 95

Ala Pro Ser Ala
20 100

<210> 14
<211> 1443
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VPASA100 rBONT/A: Secuencia de proteína

<400> 14

Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Ser Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Ser Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala
20 25 30

Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val
35 40 45

Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro
50 55 60

Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala
65 70 75 80

Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser
85 90 95

Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala

ES 2 784 911 T3

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

ES 2 784 911 T3

	370		375			380												
5	His 385	Asp	Ala	Lys	Phe	Ile 390	Asp	Ser	Leu	Gln	Glu 395	Asn	Glu	Phe	Arg	Leu 400		
	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Lys 405	Phe	Lys	Asp	Ile	Ala 410	Ser	Thr	Leu	Asn	Lys 415	Ala		
10	Lys	Ser	Ile	Val 420	Gly	Thr	Thr	Ala	Ser 425	Leu	Gln	Tyr	Met	Lys 430	Asn	Val		
	Phe	Lys	Glu 435	Lys	Tyr	Leu	Leu	Ser 440	Glu	Asp	Thr	Ser	Gly 445	Lys	Phe	Ser		
15	Val	Asp 450	Lys	Leu	Lys	Phe	Asp 455	Lys	Leu	Tyr	Lys	Met 460	Leu	Thr	Glu	Ile		
20	Tyr 465	Thr	Glu	Asp	Asn	Phe 470	Val	Lys	Phe	Phe	Lys 475	Val	Leu	Asn	Arg	Lys 480		
	Thr	Tyr	Leu	Asn	Phe 485	Asp	Lys	Ala	Val	Phe 490	Lys	Ile	Asn	Ile	Val 495	Pro		
25	Lys	Val	Asn	Tyr 500	Thr	Ile	Tyr	Asp	Gly 505	Phe	Asn	Leu	Arg	Asn 510	Thr	Asn		
30	Leu	Ala	Ala 515	Asn	Phe	Asn	Gly	Gln 520	Asn	Thr	Glu	Ile	Asn 525	Asn	Met	Asn		
	Phe	Thr 530	Lys	Leu	Lys	Asn	Phe 535	Thr	Gly	Leu	Phe	Glu 540	Phe	Tyr	Lys	Leu		
35	Leu 545	Cys	Val	Arg	Gly	Ile 550	Ile	Thr	Ser	Lys	Ala 555	Gly	Ala	Gly	Lys	Ser 560		
40	Leu	Val	Pro	Arg	Gly 565	Ser	Ala	Gly	Ala	Gly 570	Ala	Leu	Asn	Asp	Leu 575	Cys		
	Ile	Lys	Val	Asn 580	Asn	Trp	Asp	Leu	Phe 585	Phe	Ser	Pro	Ser	Glu 590	Asp	Asn		
45	Phe	Thr	Asn 595	Asp	Leu	Asn	Lys	Gly 600	Glu	Glu	Ile	Thr	Ser 605	Asp	Thr	Asn		
50	Ile	Glu 610	Ala	Ala	Glu	Glu	Asn 615	Ile	Ser	Leu	Asp	Leu 620	Ile	Gln	Gln	Tyr		
	Tyr 625	Leu	Thr	Phe	Asn	Phe 630	Asp	Asn	Glu	Pro	Glu 635	Asn	Ile	Ser	Ile	Glu 640		
55	Asn	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	Ile	Gly	Gln	Leu	Glu	Leu	Met	Pro	Asn	Ile		

ES 2 784 911 T3

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

ES 2 784 911 T3

	915		920		925											
5	Arg 930	Leu	Glu	Asp	Phe	Asp	Ala 935	Ser	Leu	Lys	Asp	Ala 940	Leu	Leu	Lys	Tyr
	Ile 945	Tyr	Asp	Asn	Arg	Gly 950	Thr	Leu	Ile	Gly	Gln 955	Val	Asp	Arg	Leu	Lys 960
10	Asp	Lys	Val	Asn	Asn 965	Thr	Leu	Ser	Thr	Asp 970	Ile	Pro	Phe	Gln	Leu 975	Ser
15	Lys	Tyr	Val	Asp 980	Asn	Gln	Arg	Leu	Leu 985	Ser	Thr	Phe	Thr	Glu 990	Tyr	Ile
	Lys	Asn	Ile 995	Ile	Asn	Thr	Ser	Ile 1000	Leu	Asn	Leu	Arg	Tyr	Glu 1005	Ser	Asn
20	His	Leu 1010	Ile	Asp	Leu	Ser	Arg 1015	Tyr	Ala	Ser	Lys	Ile 1020	Asn	Ile	Gly	
	Ser	Lys 1025	Val	Asn	Phe	Asp	Pro 1030	Ile	Asp	Lys	Asn	Gln 1035	Ile	Gln	Leu	
25	Phe	Asn 1040	Leu	Glu	Ser	Ser	Lys 1045	Ile	Glu	Val	Ile	Leu 1050	Lys	Asn	Ala	
30	Ile	Val 1055	Tyr	Asn	Ser	Met	Tyr 1060	Glu	Asn	Phe	Ser	Thr 1065	Ser	Phe	Trp	
	Ile	Arg 1070	Ile	Pro	Lys	Tyr	Phe 1075	Asn	Ser	Ile	Ser	Leu 1080	Asn	Asn	Glu	
35	Tyr	Thr 1085	Ile	Ile	Asn	Cys	Met 1090	Glu	Asn	Asn	Ser	Gly 1095	Trp	Lys	Val	
40	Ser	Leu 1100	Asn	Tyr	Gly	Glu	Ile 1105	Ile	Trp	Thr	Leu	Gln 1110	Asp	Thr	Gln	
	Glu	Ile 1115	Lys	Gln	Arg	Val	Val 1120	Phe	Lys	Tyr	Ser	Gln 1125	Met	Ile	Asn	
45	Ile	Ser 1130	Asp	Tyr	Ile	Asn	Arg 1135	Trp	Ile	Phe	Val	Thr 1140	Ile	Thr	Asn	
50	Asn	Arg 1145	Leu	Asn	Asn	Ser	Lys 1150	Ile	Tyr	Ile	Asn	Gly 1155	Arg	Leu	Ile	
	Asp	Gln 1160	Lys	Pro	Ile	Ser	Asn 1165	Leu	Gly	Asn	Ile	His 1170	Ala	Ser	Asn	
55	Asn	Ile	Met	Phe	Lys	Leu	Asp	Gly	Cys	Arg	Asp	Thr	His	Arg	Tyr	
60																
65																

ES 2 784 911 T3

	1175	1180	1185
5	Ile Trp 1190	Ile Lys Tyr Phe Asn 1195	Leu Phe Asp Lys Glu 1200
	Lys Glu 1205	Ile Lys Asp Leu Tyr 1210	Asp Asn Gln Ser Asn 1215
10	Leu Lys 1220	Asp Phe Trp Gly Asp 1225	Tyr Leu Gln Tyr Asp 1230
	Tyr Met 1235	Leu Asn Leu Tyr Asp 1240	Pro Asn Lys Tyr Val 1245
15	Asn Val 1250	Gly Ile Arg Gly Tyr 1255	Met Tyr Leu Lys Gly 1260
	Ser Val 1265	Met Thr Thr Asn Ile 1270	Tyr Leu Asn Ser Ser 1275
20	Gly Thr 1280	Lys Phe Ile Ile Lys 1285	Lys Tyr Ala Ser Gly 1290
25	Asn Ile 1295	Val Arg Asn Asn Asp 1300	Arg Val Tyr Ile Asn 1305
	Lys Asn 1310	Lys Glu Tyr Arg Leu 1315	Ala Thr Asn Ala Ser 1320
30	Val Glu 1325	Lys Ile Leu Ser Ala 1330	Leu Glu Ile Pro Asp 1335
35	Leu Ser 1340	Gln Val Val Val Met 1345	Lys Ser Lys Asn Asp 1350
	Thr Asn 1355	Lys Cys Lys Met Asn 1360	Leu Gln Asp Asn Asn 1365
40	Ile Gly 1370	Phe Ile Gly Phe His 1375	Gln Phe Asn Asn Ile 1380
45	Val Ala 1385	Ser Asn Trp Tyr Asn 1390	Arg Gln Ile Glu Arg 1395
	Thr Leu 1400	Gly Cys Ser Trp Glu 1405	Phe Ile Pro Val Asp 1410
50	Gly Glu 1415	Arg Pro Leu Gly Asp 1420	Leu Val Pro Arg Gly 1425
55	Ser Ser 1430	Ser Val Asp Lys Leu Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys	

60 <210> 15
 <211> 1443
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65

ES 2 784 911 T3

<220>

<223> VAPSA100 rBONT/A: Secuencia de proteína

<400> 15

5 Met Gly Ser Ser His His His His His Gly Ser Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

10 Ser Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala
20 25 30

15 Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val
35 40 45

20 Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala
50 55 60

25 Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro
65 70 75 80

30 Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser
85 90 95

35 Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala Val Ala Pro Ser Ala
100 105 110

40 Val Ala Pro Ser Ala Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp
115 120 125

45 Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly
130 135 140

50 Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val
145 150 155 160

55 Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn
165 170 175

60 Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr
180 185 190

65 Tyr Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr
195 200 205

70 Lys Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu
210 215 220

ES 2 784 911 T3

Thr Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp
 225 230 235 240
 5 Thr Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro
 245 250 255
 Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro
 260 265 270
 10 Ser Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val
 275 280 285
 15 Leu Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe
 290 295 300
 Ser Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr
 305 310 315 320
 20 Asn Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr
 325 330 335
 25 Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala
 340 345 350
 Ile Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu
 355 360 365
 30 Met Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly
 370 375 380
 35 His Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu
 385 390 395 400
 Tyr Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala
 405 410 415
 40 Lys Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val
 420 425 430
 Phe Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser
 435 440 445
 45 Val Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile
 450 455 460
 50 Tyr Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys
 465 470 475 480
 Thr Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro
 485 490 495

ES 2 784 911 T3

Lys Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn
 500 505 510
 5 Leu Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn
 515 520 525
 Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu
 530 535 540
 10 Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Ala Gly Ala Gly Lys Ser
 545 550 555 560
 Leu Val Pro Arg Gly Ser Ala Gly Ala Gly Ala Leu Asn Asp Leu Cys
 565 570 575
 15 Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn
 580 585 590
 20 Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn
 595 600 605
 Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr
 610 615 620
 25 Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu
 625 630 635 640
 30 Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile
 645 650 655
 Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met
 660 665 670
 35 Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His Gly Lys Ser Arg Ile
 675 680 685
 40 Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val
 690 695 700
 Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr
 705 710 715 720
 45 Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe
 725 730 735
 50 Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile
 740 745 750
 Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met
 755 760 765
 55
 60
 65

ES 2 784 911 T3

Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val
770 775 780

5 Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr
785 790 795 800

Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr
805 810 815

10 Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr
820 825 830

15 Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp
835 840 845

Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala
850 855 860

20 Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu
865 870 875 880

25 Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn
885 890 895

Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln
900 905 910

30 Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys
915 920 925

35 Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr
930 935 940

Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys
945 950 955 960

40 Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser
965 970 975

Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr Phe Thr Glu Tyr Ile
980 985 990

45 Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Glu Ser Asn
995 1000 1005

50 His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser Lys Ile Asn Ile Gly
1010 1015 1020

Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn Gln Ile Gln Leu
1025 1030 1035

55

60

65

ES 2 784 911 T3

Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu Lys Asn Ala
 1040 1045 1050
 5 Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser Phe Trp
 1055 1060 1065
 Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn Glu
 1070 1075 1080
 10 Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
 1085 1090 1095
 Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln
 1100 1105 1110
 15 Glu Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn
 1115 1120 1125
 20 Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn
 1130 1135 1140
 Asn Arg Leu Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile
 1145 1150 1155
 25 Asp Gln Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn
 1160 1165 1170
 30 Asn Ile Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr
 1175 1180 1185
 Ile Trp Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu
 1190 1195 1200
 35 Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile
 1205 1210 1215
 40 Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr
 1220 1225 1230
 Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn
 1235 1240 1245
 45 Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly
 1250 1255 1260
 50 Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg
 1265 1270 1275
 Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp
 1280 1285 1290

ES 2 784 911 T3

	Asn	Ile	Val	Arg	Asn	Asn	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	Asn	Val	Val	Val
	1295						1300					1305			
5	Lys	Asn	Lys	Glu	Tyr	Arg	Leu	Ala	Thr	Asn	Ala	Ser	Gln	Ala	Gly
	1310						1315					1320			
	Val	Glu	Lys	Ile	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	Ile	Pro	Asp	Val	Gly	Asn
	1325						1330					1335			
10	Leu	Ser	Gln	Val	Val	Val	Met	Lys	Ser	Lys	Asn	Asp	Gln	Gly	Ile
	1340						1345					1350			
	Thr	Asn	Lys	Cys	Lys	Met	Asn	Leu	Gln	Asp	Asn	Asn	Gly	Asn	Asp
15	1355						1360					1365			
	Ile	Gly	Phe	Ile	Gly	Phe	His	Gln	Phe	Asn	Asn	Ile	Ala	Lys	Leu
	1370						1375					1380			
20	Val	Ala	Ser	Asn	Trp	Tyr	Asn	Arg	Gln	Ile	Glu	Arg	Ser	Ser	Arg
	1385						1390					1395			
	Thr	Leu	Gly	Cys	Ser	Trp	Glu	Phe	Ile	Pro	Val	Asp	Asp	Gly	Trp
25	1400						1405					1410			
	Gly	Glu	Arg	Pro	Leu	Gly	Asp	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala	Asn
	1415						1420					1425			
30	Ser	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	Leu	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	Glu	Lys
	1430						1435					1440			
35															
40															
45															
50															
55															
60															
65															

REIVINDICACIONES

1. Una neurotoxina clostridial recombinante que comprende un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, en donde dicho segmento de proteína consiste en la secuencia de aminoácidos $(Xaa)_x-[(P,A,S)_y-(Xaa)]_z(P,A,S)_y-(Xaa)_x$, en donde Xaa es un residuo de aminoácido seleccionado independientemente de cualquier residuo de aminoácido de origen natural, siempre y cuando al menos un Xaa en $[(P,A,S)_y-(Xaa)]_z$ es diferente de un residuo de alanina, serina o prolina; (P,A,S) representa un residuo de aminoácido seleccionado independientemente de un residuo de alanina (A), uno de serina (S) y uno de prolina (P); x es un número seleccionado independientemente de 0 y 1; y es un número seleccionado independientemente de 3 y 4; y z es 9 o más.
2. La neurotoxina clostridial recombinante de conformidad con la reivindicación 1, en donde Xaa es valina.
3. La neurotoxina clostridial recombinante de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde z es un número entre 9 y 750.
4. La neurotoxina clostridial recombinante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho segmento de proteína comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en entre 50 y 3000 residuos de aminoácidos, más particularmente entre 60 y 500 residuos de aminoácidos, más particularmente entre 70 y 260 residuos de aminoácidos, más particularmente entre 80 y 240 residuos de aminoácidos, más particularmente entre 90 y 220 residuos de aminoácidos, particularmente 100 residuos de aminoácidos, 150 residuos de aminoácidos o 200 residuos de aminoácidos.
5. La neurotoxina clostridial recombinante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los residuos de prolina comprendidos en dicho segmento de proteína constituyen más del 4 % y menos del 40 % de los aminoácidos de dicho segmento de proteína.
6. La neurotoxina clostridial recombinante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho segmento de proteína comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: $(VPASA)_{20}$ (SEQ ID NO: 12) y $(VAPSA)_{20}$ (SEQ ID NO: 13); o versiones circulares permutadas o (a) multímero(s) de estas secuencias como un todo o partes de estas secuencias, particularmente $(VPASA)_{20}$ (SEQ ID NO: 12).
7. La neurotoxina clostridial recombinante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho segmento de proteína se inserta en (i) el extremo N terminal de la cadena ligera de dicha neurotoxina clostridial recombinante; (ii) el extremo C terminal de la cadena ligera de dicha neurotoxina clostridial recombinante; (iii) el extremo N terminal de la cadena pesada de dicha neurotoxina clostridial recombinante; o (iv) el extremo C terminal de la cadena pesada de dicha neurotoxina clostridial recombinante, particularmente en el extremo N terminal de la cadena ligera de dicha neurotoxina clostridial recombinante.
8. La neurotoxina clostridial recombinante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la secuencia de dicha neurotoxina clostridial se selecciona de la secuencia de (i) una neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A, B, C, D, E, F y G, particularmente una neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A, C y E, más particularmente una neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A, o (ii) de la secuencia de una variante funcional de una neurotoxina de *Clostridium botulinum* de (i), o (iii) de la secuencia de una neurotoxina de *Clostridium botulinum* quimérica, en donde la cadena ligera y la cadena pesada de la neurotoxina clostridial son de diferentes serotipos de neurotoxina clostridial; particularmente en donde dicha neurotoxina clostridial recombinante tiene una cadena ligera y una cadena pesada comprendidas en la secuencia de aminoácidos como se encuentra en SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15.
9. La neurotoxina clostridial recombinante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el uso en el tratamiento de una enfermedad que requiere una mejor quimiodesnervación, en donde la neurotoxina clostridial recombinante provoca una desnervación más duradera con respecto a una neurotoxina clostridial idéntica sin dicho segmento de proteína.
10. Una composición farmacéutica que comprende la neurotoxina clostridial recombinante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
11. El uso de la neurotoxina clostridial recombinante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el tratamiento cosmético.
12. Un método para la generación de una neurotoxina clostridial recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende la etapa de obtener una secuencia de ácidos nucleicos recombinante que codifica una neurotoxina clostridial precursora monocatenaria recombinante mediante la inserción de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, en donde (i) dicho segmento de proteína consiste en la secuencia de aminoácidos $(Xaa)_x-[(P,A,S)_y-$

(Xaa)-]_z(P,A,S)_y-(Xaa)_x, en donde Xaa es un residuo de aminoácido seleccionado independientemente de cualquier residuo de aminoácido de origen natural, siempre y cuando al menos un Xaa en [(P,A,S)_y-(Xaa)-]_z sea diferente de un residuo de alanina, serina o prolina; (P,A,S) representa un residuo de aminoácido seleccionado independientemente de un residuo de alanina (A), uno de serina (S) y uno de prolina (P); x es un número seleccionado independientemente de 0 y 1; y es un número seleccionado independientemente de 3 y 4; y z es 9 o más; en donde (ii) dicho segmento de proteína consiste en residuos de alanina, serina y prolina; o en donde (iii) dicho segmento de proteína comprende una pluralidad de repeticiones de aminoácidos, en donde dichas repeticiones consisten en residuos de Ala, Ser y Pro y en donde no más de seis residuos de aminoácidos consecutivos son idénticos en una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una neurotoxina clostridial parental.

13. Un precursor de neurotoxina clostridial monocatenaria recombinante para una neurotoxina clostridial bicatenaria unida por disulfuro, que comprende una cadena ligera de neurotoxina clostridial funcionalmente activa, una cadena pesada de neurotoxina funcionalmente activa, una región de bucle que une el extremo C terminal de la cadena ligera con el extremo N terminal de la cadena pesada, y un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, en donde (i) dicho segmento de proteína consiste en la secuencia de aminoácidos (Xaa)_x[(P,A,S)_y-(Xaa)-]_z(P,A,S)_y-(Xaa)_x, en donde Xaa es un residuo de aminoácido seleccionado independientemente de cualquier residuo de aminoácido de origen natural, siempre y cuando al menos un Xaa en [(P,A,S)_y-(Xaa)-]_z es diferente de un residuo de alanina, serina o prolina; (P,A,S) representa un residuo de aminoácido seleccionado independientemente de un residuo de alanina (A), uno de serina (S) y uno de prolina (P); x es un número seleccionado independientemente de 0 y 1; y es un número seleccionado independientemente de 3 y 4; y z es 9 o más; en donde (ii) dicho segmento de proteína consiste en residuos de alanina, serina y prolina; o en donde (iii) dicho segmento de proteína comprende una pluralidad de repeticiones de aminoácidos, en donde dichas repeticiones consisten en residuos de Ala, Ser y Pro y en donde no más de seis residuos de aminoácidos consecutivos son idénticos.
14. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la neurotoxina clostridial monocatenaria recombinante de conformidad con la reivindicación 13.
15. Un método para obtener la secuencia de ácidos nucleicos de conformidad con la reivindicación 14, que comprende la etapa de insertar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un segmento de proteína que consiste en al menos 50 residuos de aminoácidos, en donde (i) dicho segmento de proteína consiste en la secuencia de aminoácidos (Xaa)_x[(P,A,S)_y-(Xaa)-]_z(P,A,S)_y-(Xaa)_x, en donde Xaa es un residuo de aminoácido seleccionado independientemente de cualquier residuo de aminoácido de origen natural, siempre y cuando al menos un Xaa en [(P,A,S)_y-(Xaa)-]_z es diferente de un residuo de alanina, serina o prolina; (P,A,S) representa un residuo de aminoácido seleccionado independientemente de un residuo de alanina (A), uno de serina (S) y uno de prolina (P); x es un número seleccionado independientemente de 0 y 1; y es un número seleccionado independientemente de 3 y 4; y z es 9 o más; en donde (ii) dicho segmento de proteína consiste en residuos de alanina, serina y prolina; o en donde (iii) dicho segmento de proteína comprende una pluralidad de repeticiones de aminoácidos, en donde dichas repeticiones consisten en residuos de Ala, Ser y Pro y en donde no más de seis residuos de aminoácidos consecutivos son idénticos en una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una neurotoxina clostridial parental.

Figura 1:

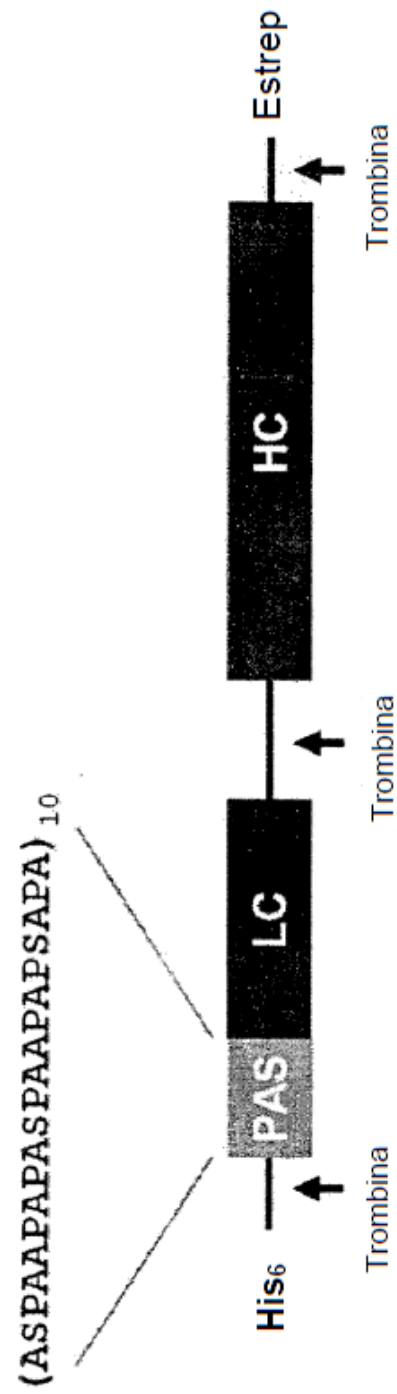


Figura 2:

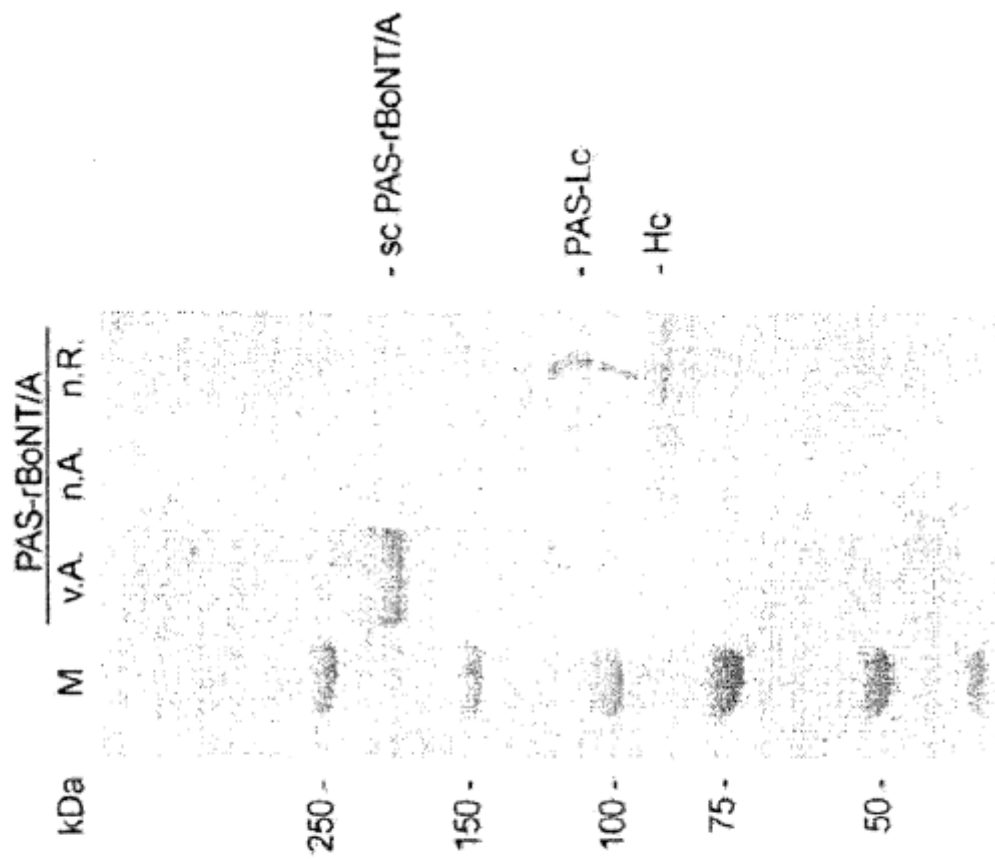


Figura 3:

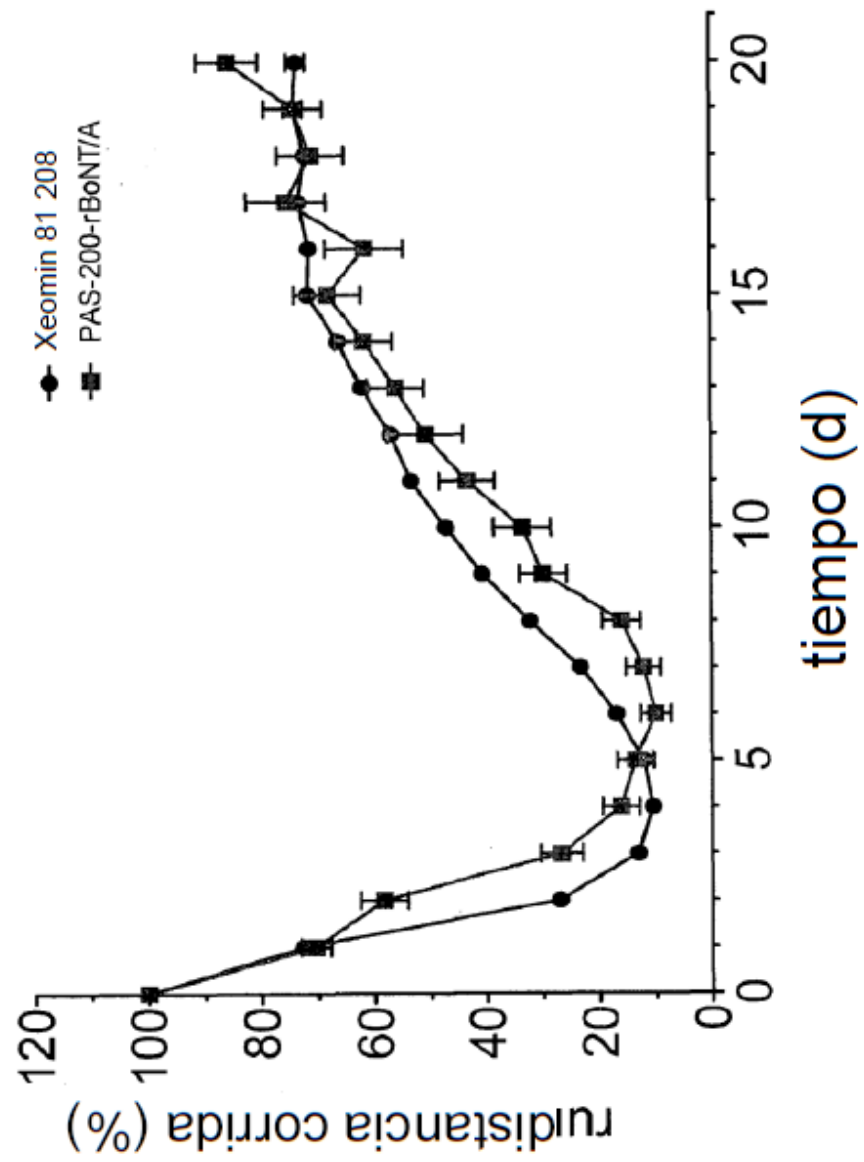


Figura 4:

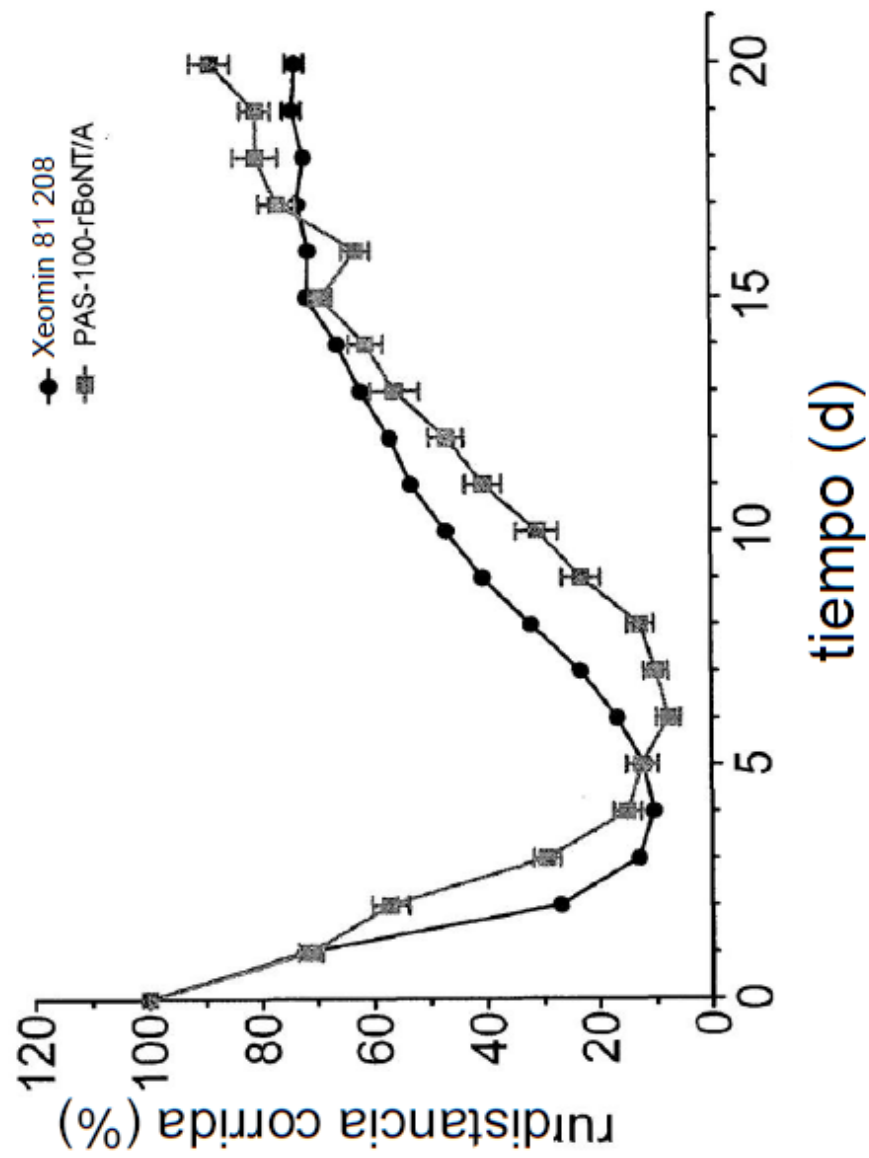


Figura 5:

