



(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2005 051 789.7**  
 (22) Anmeldetag: **28.10.2005**  
 (43) Offenlegungstag: **10.05.2007**  
 (45) Veröffentlichungstag  
 der Patenterteilung: **07.08.2014**

(51) Int Cl.: **C12N 15/12 (2006.01)**  
**C07K 14/435 (2006.01)**

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:  
**ToxoGen GmbH, 30851, Langenhagen, DE**

(74) Vertreter:  
**Dr. Volker Vossius Patentanwälte  
 Partnerschaftsgesellschaft, 81373, München, DE**

(72) Erfinder:  
**Rummel, Andreas, 30826, Garbsen, DE; Mahrhold,  
 Stefan, 30659, Hannover, DE; Binz, Thomas,  
 30539, Hannover, DE; Bigalke, Johannes Wilhelm,  
 30419, Hannover, DE**

(56) Ermittelte Stand der Technik:

**Internet-Recherche am 15.05.2006: www.  
 ncbi.nlm.nih.gov/entrez, Sequenzvergleich von  
 NP\_113781 mit NP\_055794**

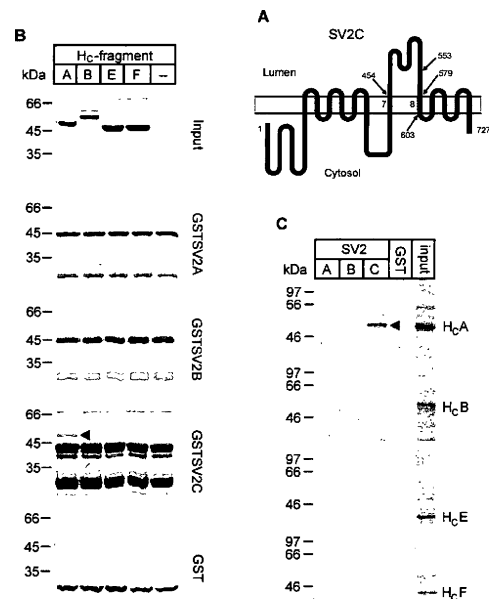
**Internet-Recherche am 15.05.2006: www.  
 ncbi.nlm.nih.gov/entrez, synaptic vesicle  
 glycoprotein 2c (Homo sapiens) Accession  
 Number: NP\_055794**

**Internet-Recherche am 15.05.2006: www.  
 ncbi.nlm.nih.gov/entrez, synaptic vesicle  
 glycoprotein 2c (Rattus norvegicus) Accession  
 Number: NP\_113781**

**JANZ, R. [u.a.]: SV2C is a synaptic vesicle  
 protein with an usually restricted localization:  
 anatomy of a synaptic protein family.  
 Neuroscience (1999) 94 (4) 1279-1290**

(54) Bezeichnung: **Der Botulinus Neurotoxin A Proteinrezeptor und seine Anwendungen**

(57) Hauptanspruch: Polypeptid, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens, wobei das Polypeptid das H<sub>C</sub>-Fragment von Botulinus Neurotoxin A bindet, mit der Maßgabe, dass das Polypeptid nicht das synaptische Glykoprotein 2C aus Homo sapiens, Rattus norvegicus oder Mus musculus ist.



## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Polypeptid, das das von *Clostridium botulinum* gebildete Botulinus Neurotoxin A (BoNT/A) bindet. Dieses Polypeptid ist ein Polypeptid bestehend aus einer Aminosäuresequenz, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C (SV2C) aus *Homo sapiens*, sodass das Polypeptid das H<sub>C</sub>-Fragment von Botulinus Neurotoxin A bindet, mit der Maßgabe, dass das Polypeptid nicht das synaptische Vesikel Glykoprotein 2C aus *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* oder *Mus musculus* ist. Die vorliegende Erfindung bezieht sich desweiteren auf die Peptidabschnitte des SV2C Proteins, welche mit BoNT/A interagieren. Insbesondere bezieht sich die Erfindung auf die Verwendung des Polypeptides und den Peptidabschnitten davon als Antagonist zur Reduktion der Neurotoxizität von BoNT/A, als Hilfsmittel zur Identifikation von Substanzen, welche die Bindung von BoNT/A an Nervenzellen vermindern und zur Detektion von BoNT/A in unterschiedlichen Matrices.

**[0002]** Nervenzellen setzen Transmitterstoffe durch Exozytose frei. Als Exozytose wird die Verschmelzung der Membranen intrazellulärer Vesikel mit der Plasmamembran bezeichnet. Bei diesem Vorgang wird gleichzeitig der vesikuläre Inhalt in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Die Fusion der beiden Membranen wird durch Calcium reguliert, welches mit dem Protein Synaptotagmin reagiert. Zusammen mit anderen Kofaktoren kontrolliert Synaptotagmin den Status von drei so genannten Fusionsproteinen, dem SNAP-25, Synaptobrevin 2 und Syntaxin 1A. Während Syntaxin 1A und Synaptobrevin 2 in die Plasma- bzw. Vesikelmembran integriert sind, ist SNAP-25 nur schwach an die Plasmamembran gebunden. Bei einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration binden die drei Proteine aneinander, wobei sich beide Membranen annähern und anschließend miteinander verschmelzen. Bei cholinergen Neuronen wird Acetylcholin freigesetzt, welches Muskelkontraktionen, Schweißabsonderung und andere cholinerg vermittelte Reaktionen verursacht.

**[0003]** Die oben genannten Fusionsproteine sind die Zielmoleküle (Substrate) der leichten Kette (LC) der clostridiellen Neurotoxine, die von den Bakterien *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* und *C. tetani* gebildet werden.

**[0004]** Das anaerobe, gram-positive Bakterium *C. botulinum* produziert sieben verschiedene Serotypen der clostridiellen Neurotoxine. Diese werden als die Botulinus Neurotoxine (BoNT/A bis BoNT/G) bezeichnet. Hier-von verursachen insbesondere BoNT/A und BoNT/B bei Mensch und Tier eine neuroparalytische Erkrankung, die als Botulismus bezeichnet wird. Die Sporen von *C. botulinum* finden sich im Erdreich, können sich jedoch in unsachgemäß sterilisierten und verschlossenen Nahrungsmittelkonserven aus häuslicher Herstellung entwickeln, auf die viele der Botulismusfälle zurückgeführt werden.

**[0005]** BoNT/A ist die aktivste aller bekannten biologischen Substanzen. Nur etwa 5–6 pg gereinigtes BoNT/A repräsentieren eine MLD (Minimale letale Dosis). Eine Einheit (engl.: Unit, U) von BoNT/A wird als die MLD definiert, die nach intraperitonealer Injektion die Hälfte an weiblichen Swiss Webster-Mäusen im einem Gewicht von jeweils 18–20 g tötet. Sieben immunologisch unterschiedliche BoNT wurden charakterisiert. Sie tragen die Bezeichnungen BoNT/A, B, C1, D, E, F und G und können durch Neutralisation mit Serotyp spezifischen Antikörpern unterschieden werden. Die verschiedenen Serotypen von BoNT unterscheiden sich bei betroffenen Tierarten hinsichtlich der Schwere und Dauer der verursachten Lähmung. So ist z. B. bei der Ratte im Hinblick auf die Lähmung BoNT/A 500 mal stärker wirksam als BoNT/B. Hinzu kommt, dass BoNT/B sich bei Primaten in einer Dosierung von 480 U/kg Körpergewicht als untoxisch erwiesen hat. Dieselbe Menge BoNT/A entspricht der 12fachen letalen Dosis dieses Stoffes bei Primaten. Zum anderen ist bei Mäusen die Lähmungsdauer nach Injektion von BoNT/A 10fach länger als nach Injektion von BoNT/E.

**[0006]** Die BoNT werden zur Behandlung neuromuskulärer Störungen eingesetzt, die durch Hyperaktivität in Skelettmuskeln, verursacht durch pathologisch überaktive periphere Nerven, charakterisiert sind. BoNT/A ist von der U.S. Food and Drug Administration zur Behandlung von Blepharospasmus, Strabismus, Hyperhydrose, Falten und Hemifacialspasmen zugelassen. Verglichen mit BoNT/A besitzen die übrigen BoNT Serotypen offensichtlich eine geringere Wirksamkeit und kürzere Wirkdauer. Klinische Effekte des peripher intramuskulär verabreichten BoNT/A stellen sich für gewöhnlich innerhalb einer Woche ein. Die Dauer der Symptomunterdrückung durch eine einzige intramuskuläre Injektion von BoNT/A beläuft sich im Regelfall auf etwa drei bis sechs Monate.

**[0007]** Die clostridiellen Neurotoxine hydrolysieren spezifisch verschiedene Proteine des Fusionsapparates. BoNT/A, C1 und E spalten SNAP-25, während BoNT/B, D, F, G sowie Tetanus Neurotoxin (TeNT) das vesikel-assoziierte Membranprotein (VAMP) 2 – auch Synaptobrevin 2 genannt – angreifen. BoNT/C1 spaltet außerdem Syntaxin 1A.

**[0008]** Die Clostridien Bakterien setzen die Neurotoxine als einkettige Polypeptide mit jeweils 1251 bis 1315 Aminosäuren frei. Nachfolgend spalten endogene Proteasen jedes dieser Proteine an einer bestimmten Stelle in jeweils 2 Ketten („nicking“), wobei die beiden Ketten jedoch durch eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden bleiben. Diese zweikettigen Proteine werden als Holotoxine bezeichnet (siehe Shone et al. (1985), Eur. J. Biochem. 151, 75–82). Die beiden Ketten haben verschiedene Funktionen. Während das kleinere Teilstück, die leichte Kette (light chain = LC), eine Zn<sup>2+</sup>-abhängige Endoprotease darstellt, ist die größere Einheit (heavy chain = HC) der Transporter der leichten Kette. Durch Behandlung der HC mit Endopeptidasen ergaben sich zwei 50 kDa Fragmente (siehe Gimenez et al. (1993), J. Protein Chem. 12, 351–363). Die amino-terminale Hälfte (H<sub>N</sub>-Fragment) integriert sich bei niedrigem pH-Wert in Membranen und transloziert die LC in das Zytosol der Nervenzelle. Die carboxyl-terminale Hälfte (H<sub>C</sub>-Fragment) bindet an komplexe Polysialoganglioside, die nur in Nervenzellmembranen vorkommen, und an bislang nur teilweise identifizierte Proteinrezeptoren. Dies erklärt die hohe Neuroselektivität der clostridiellen Neurotoxine. Kristallstrukturen bestätigen, dass BoNT/A über drei Domänen verfügt, die mit den drei Schritten des Wirkmechanismus in Einklang gebracht werden können (siehe Lacy et al. (1998), Nat. Struct. Biol. 5, 898–902). Desweiteren lassen diese Daten darauf schließen, dass innerhalb des H<sub>C</sub>-Fragments zwei autonome Untereinheiten (Subdomänen) von jeweils 25 kDa existieren. Der erste Beweis für die Existenz der beiden funktionellen Subdomänen wurde mit der amino-terminalen (H<sub>CN</sub> und der carboxyl-terminalen Hälfte (H<sub>CC</sub>) des H<sub>C</sub>-Fragments des TeNT erbracht, die rekombinant exprimiert wurden und erkennen ließen, dass zwar die H<sub>CC</sub>, nicht aber die H<sub>CN</sub>-Domäne an Neurone bindet (siehe Herreros et al. (2000), Biochem. J. 347, 199–204). Zu einem späteren Zeitpunkt wurde eine einzige Gangliosid-Bindungsstelle innerhalb der H<sub>CC</sub>-Domänen von BoNT/A und B lokalisiert und charakterisiert (siehe Rummel et al. (2004), Mol. Microbiol. 51, 631–643). Der Ort für die Bindung des als Proteinrezeptor für BoNT/B und G identifizierten Synaptotagmins I und II konnte gleichfalls auf den Bereich der H<sub>CC</sub>-Domänen von BoNT/B und G beschränkt werden (siehe Rummel et al. (2004), J. Biol. Chem. 279, 30865–70). BoNT/A zeigt weder in PC12 Zellen noch in in vitro Proteinbindungsstudien eine irgendwie geartete Interaktion mit einem der zurzeit 13 Mitglieder der Synaptotagmin Proteinfamilie.

**[0009]** Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zu Grunde, Mittel und Verfahren zur Beeinflussung der Neurotoxizität von BoNT/A bereitzustellen.

**[0010]** Die Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung eines Polypeptides bestehend aus einer Aminosäuresequenz, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens und dass das Polypeptid das H<sub>C</sub>-Fragment von Botulinus Neurotoxin A bindet, mit der Maßgabe, dass das Polypeptid nicht das synaptische Vesikel Glykoprotein 2C aus Homo sapiens, Rattus norvegicus oder Mus musculus ist. Die vorliegende Erfindung bezieht sich ferner auf die Verwendung des Polypeptides und dessen luminaler Domäne als Antagonist zur Reduktion der Neurotoxizität von BoNT/A, als Hilfsmittel zur Identifikation von Substanzen, welche die Bindung von BoNT/A an Nervenzellen vermindern und zum Nachweis von BoNT/A in unterschiedlichen Matrices.

**[0011]** Mit der vorliegenden Erfindung wird nun synaptisches Vesikelprotein 2C (SV2C) als Rezeptor für BoNT/A vorgestellt.

**[0012]** In Studien konnte der Erfinder zeigen, dass weder Synaptophysin, Synaptoporin, Synaptogyrin I & III, synaptisches Vesikel Glykoprotein 2A (SV2A) noch synaptisches Vesikel Glykoprotein 2B (SV2B) als Proteinrezeptor für BoNT/A fungieren. Allerdings konnte eine Bindung von BoNT/A an SV2C gezeigt werden.

**[0013]** In einer Ligand-Rezeptor-Studie wurden die luminalen Domänen der Proteine Synaptophysin, Synaptoporin, Synaptogyrin I & III, SV2A, SV2B und SV2C subkloniert und als Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsprotein rekombinant in E. coli exprimiert und isoliert. Die H<sub>C</sub>-Fragmente der sieben BoNTs und von TeNT wurden sowohl rekombinant in E. coli exprimiert als auch mit <sup>35</sup>S-Methionin in vitro translatiert. Die Affinität der H<sub>C</sub>-Fragmente an die luminalen Domänen der oben aufgeführten GST-Fusionsproteine wurde in Glutathion-S-Transferase-(GST)-Pull-down Experimenten bestimmt. In Anwesenheit von GST-SV2C Derivaten wurde die Inhibition der Neurotoxizität von BoNT/A und BoNT/B am isolierten Nerv-Muskel-Präparat der Maus (Hemi-Diaphragma-Assay HDA), welches das physiologische Ziel der clostridiellen Neurotoxine darstellt, analysiert.

**[0014]** Insbesondere die luminale Domäne von SV2C (Aminosäuren 454–579) stellt das Fragment zur Interaktion mit BoNT/A dar. Das isolierte 125mer Peptid der luminalen Domäne kann ohne Gangliosid mit dem H<sub>C</sub>-Fragment von BoNT/A interagieren. Durch die Interaktion des SV2C Peptids mit BoNT/A wird dessen Rezeptorbindungsstelle belegt und die Wechselwirkung mit in der Membran eingelagerten SV2C blockiert. Im Detail beinhaltet die vorliegende Erfindung ein 125mer Peptid, das die luminale Domäne von SV2C umfasst, oder ein Peptid, welches aus einer Aminosäuresequenz mit mindestens 80% Identität zur luminalen Domäne

von SV2C besteht oder welches posttranslational modifiziert ist. Diese Agenzien können eingesetzt werden zur spezifischen Bindung an das H<sub>C</sub>-Fragment von BoNT/A. Dadurch wird die Rezeptorbindungsstelle von BoNT/A belegt und dessen physiologische Interaktion mit dem in der Plasmamembran vorhandenen SV2C inhibiert. Somit kann eine akute Intoxikation mit BoNT/A abgewendet werden. Weiterhin können diese Agenzien in kompetitiven Bindungsstudien zur Suche nach anderen Molekülen, die sich ebenfalls in die Rezeptorbindungsstelle im H<sub>C</sub>-Fragment von BoNT/A einlagern und somit als Antagonisten wirken, eingesetzt werden. Durch eine Markierung der Agenzien z. B. mit Fluorophoren oder speziellen Erkennungssequenzen oder einer Immobilisierung an Feststoffphasen kann nach Bindung dieser Agenzien an BoNT/A jenes direkt spezifisch nachgewiesen werden. Damit ergibt sich die Möglichkeit, BoNT/A spezifisch in unterschiedlichen Umgebungen und Matrices zu detektieren.

**[0015]** SV2C ist ein Glykoprotein aus Nervenzellen und neuroendokrinen Zellen (als Übersichtsartikel: Janz, R. und Südhof T. C., *Neuroscience* 94 (1999), 1279–1290). Es besteht aus 727 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 86 kDa und ist mit 12 Transmembrandomänen in die Membran synaptischer Vesikel eingelagert. Der ca. 160 Aminosäuren lange Aminoterminus und der 11 Aminosäuren kurze Carboxylterminus befinden sich ebenso im Zytosol wie ein 90 Aminosäuren langer Abschnitt zwischen den Transmembrandomänen 6 und 7. Intravesikulär findet sich lediglich zwischen den Transmembrandomänen 7 und 8 ein 125 Aminosäuren langer Bereich (Aminosäuren 454–579), die intravesikuläre oder luminale Domäne (LD), welche drei putative N-Glykosylierungsstellen und zwei putative Disulfidbrücken enthält. Die Rolle von SV2C als Ionen- bzw. Zuckertransporter in synaptischen Vesikel hat sich nicht bestätigt, aber eine von der Phosphorylierung des Aminoterminus abhängige Interaktion der drei SV2 Isoformen mit denen des Synaptotagmins deutet daraufhin, dass über SV2 die Menge an freiem Synaptotagmin zur Bindung von Ca<sup>2+</sup> und nachfolgender Initiation der Exozytose beeinflusst wird.

**[0016]** Durch Exozytose fusioniert die Membran der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Plasmamembran, wodurch sich die synaptischen Vesikelproteine kurzzeitig auch in der präsynaptischen Membran befinden. Dadurch sind die intravesikulären Domänen der synaptischen Vesikelproteine extrazellulär exponiert. Die Bindung des H<sub>C</sub>-Fragments von BoNT/A an die zahlreich vorkommenden komplexen Polysialoganglioside auf der Nervenzelloberfläche reicht zur Aufnahme des Neurotoxins allein nicht aus. Aber durch die Akkumulation der BoNT/A Moleküle auf der Nervenzelloberfläche können diese lateral in der Membran diffundieren, und die Wahrscheinlichkeit des produktiven Zusammentreffens mit dem selten exponierten Proteinrezeptor ist erhöht. Im Fall von SV2C wird die 125 Aminosäuren große luminale Domäne nach Vesikelfusion extrazellulär exponiert und steht somit für BoNT/A als Proteinrezeptor zur Verfügung. Da sich das Neurotoxin aufgrund der Gangliosidbindung recht dicht oberhalb der Membran aufhält, stehen analog zur BoNT/B/G-Synaptotagmin Interaktion bevorzugt die ca. 30 ersten und letzten Aminosäuren der luminalen Domäne als Rezeptor zur Verfügung. Nach Aufnahme des Rezeptor-Neurotoxin Komplexes in das Endosom wird dieses angesäuert, die Translokationsdomäne inseriert in die endosomale Membran und transloziert die partiell entfaltete LC ins Zytosol, wo diese im finalen Schritt ihr spezifisches Substrat spaltet. Der Zyklus der Komplexbildung und -dissoziation der Fusionsproteine wird unterbrochen und somit die Ausschüttung von Acetylcholin gehemmt. Als Folge hiervon werden gestreifte Muskeln gelähmt, und Schweißdrüsen stellen ihre Sekretion ein. Die Wirkdauer der einzelnen BoNT Serotypen ist verschieden und hängt von der Präsenz intakter LC im Zytosol ab.

**[0017]** Dass bevorzugt die cholinerge Transmission blockiert wird, kann damit erklärt werden, dass die HC in der Peripherie in das Neuron eindringt. Zentrale Synapsen werden durch die Blut-Hirn-Schranke geschützt, die von Proteinen nicht überwunden werden kann.

**[0018]** Nachfolgend werden Begriffe definiert, wie sie in Zusammenhang mit der vorliegenden Anmeldung zu verstehen sind.

**[0019]** Das rekombinant hergestellte Botulinus Neurotoxin A (BoNT/A) aus *E. coli*, welches u. a. die zum nativen Botulinus Neurotoxin A identische Aminosäuresequenz beinhaltet, verhält sich pharmakologisch identisch wie das native BoNT/A und wird rekombinantes Botulinus Neurotoxin Wildtyp genannt. Das rekombinant hergestellte H<sub>C</sub>-Fragment von BoNT/A besitzt die gleiche Aminosäuresequenz wie das korrespondierende native H<sub>C</sub>-Fragment und die gleichen Bindungseigenschaften wie das native BoNT/A. Die erwähnten Nervenzellen sind cholinerge Motoneurone. Vorzugsweise bindet das BoNT/A spezifisch an die Plasmamembran assoziierte Moleküle, Transmembranproteine, synaptische Vesikelproteine, ein Protein der SV2 Familie, vorzugsweise SV2C, besonders bevorzugt die luminale Domäne von SV2C. Die Bindung wird vorzugsweise in vitro bestimmt. Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung durch Verwendung von GST-Pulldown Experimenten, die im Detail in den Beispielen ausgeführt sind.

**[0020]** Die Sequenz von SV2C ist für jedermann aus Datenbanken erhältlich. Die Sequenz ID für SV2C aus Homo sapiens lautet u. a. GenBank NP\_055794, für SV2C aus Rattus norvegicus u. a. GenBank NP\_113751, für SV2C aus Mus musculus u. a. GenBank XP\_127490.

**[0021]** Der Ausdruck „Polypeptid“ bedeutet in diesem Zusammenhang Aminosäurepolymere aus wenigstens zwei Monomereinheiten. Die Monomere können hierbei natürlich oder nicht natürlich vorkommende Aminosäuren sein. Bevorzugt weist ein Polypeptid wenigstens 10 Aminosäuremonomere auf. Die einzelnen Aminosäuren können hierbei modifiziert sein. Die Modifikationen können natürlichen Ursprungs sein (z. B. posttranslational) oder synthetisch eingeführt werden wie z. B. Glykosylierung, Di- und Oligomerisierung, und Modifikationen der Cys-Reste.

**[0022]** „% Identität“ bedeutet erfindungsgemäß % Identität auf Protein-Ebene, die mittels bekannter Verfahren, z. B. der computergestützten Sequenzvergleiche (BLAST) Basic Local Alignment Search Tool, S. F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403–410. Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Identität erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen. Sofern Sequenzpaare miteinander verglichen werden, können auch die Programme GAP (Devereux, J. et al., Nucleic Acids Res. 12812) =: 387 (1987) und BestFit verwendet werden. Generell ist die Verwendung von Standardparametern möglich, besonders bevorzugt sind diese:

Algorithmus: Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443–453 (1970)

Vergleichsmatrix: BLOSUM 62 aus Henikoff und Henikoff, PNAS USA 89 (1992), 10915–10919

Lücken-Wert (Gap Penalty): 12

Lückenlängen-Wert (Gap Length Penalty): 4

**[0023]** Der Ausdruck „Antikörper“ schließt klassische Antikörper, single-chain-Antikörper und Antikörperfragmente ein. Bevorzugte Fragmente sind hierbei F(ab)<sub>2</sub> und F(ab).

**[0024]** Der Ausdruck „Zusammensetzung“ schließt neben Gemischen auch Fusionsproteine ein. Das in der Zusammensetzung enthaltene Polypeptid kann in Form eines Konjugates vorliegen. Hierbei sind Konjugate mit Farbstoffen, Eisenpartikeln, Epitopen wie Flag oder HA-Tag, Crosslinker, Affinitätspeptide oder radioaktive Isotope bevorzugt.

**[0025]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die Aminosäuresequenz des Polypeptides zu mindestens 80% identisch ist mit der Aminosäuresequenz des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens. Besonders bevorzugt ist die Aminosäuresequenz, die zu mindestens 90% identisch ist mit der Aminosäuresequenz des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens. Insbesondere bevorzugt ist die Aminosäuresequenz, die zu mindestens 95% identisch mit der Aminosäuresequenz des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens.

**[0026]** Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Aminosäuresequenz des Polypeptides zu mindestens 70% identisch mit der Aminosäuresequenz der luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens. Bevorzugt ist die Aminosäuresequenz, die zu mindestens 80% identisch mit der Aminosäuresequenz der luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens ist. Ferner bevorzugt ist die Aminosäuresequenz, die zu mindestens 90% identisch ist mit der Aminosäuresequenz der luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens. Besonders bevorzugt ist die Aminosäuresequenz, die zu mindestens 95% identisch mit der Aminosäuresequenz der luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens. Insbesondere ist das Polypeptid das isolierte Polypeptid der luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens, wobei das isolierte Polypeptid das H<sub>C</sub>-Fragment von Botulinus Neurotoxin A bindet.

**[0027]** Die vorliegende Erfindung stellt ferner Nukleinsäuren bereit, die das erfindungsgemäße Polypeptid kodieren. Ferner werden erfindungsgemäß Vektoren bereitgestellt, die die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten und zur Replikation und optional Expression unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors in einer geeigneten Wirtszelle. Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Polypeptides bereitgestellt, umfassend das rekombinante Expressieren einer das Polypeptid kodierenden Nukleinsäure in einer geeigneten Wirtszelle und gegebenenfalls Isolieren des hergestellten Polypeptides in an sich bekannter Weise.

**[0028]** Die kodierende Nukleinsäure kann hierbei RNA, DNA oder Gemische davon darstellen. Die Nukleinsäure kann ferner im Hinblick auf ihre Nukleaseresistenz modifiziert sein wie z. B. durch Einfügung von

Phosphorothioat-Bindungen. Die Nukleinsäure kann aus einer Ausgangs-Nukleinsäure hergestellt werden, wobei die Ausgangs-Nukleinsäure z. B. durch Klonierung aus genomischen oder cDNA-Banken zugänglich ist. Weiterhin kann die Nukleinsäure direkt durch Festphasensynthese hergestellt werden. Geeignete Verfahren sind dem Fachmann bekannt. Sofern von einer Ausgangs-Nukleinsäure ausgegangen wird, kann z. B. durch ortsgerichtete Mutagenese eine zielgerichtete Veränderung durchgeführt werden, die auf Aminosäure-Ebene zu wenigstens einer Addition, Insertion, Deletion und/oder Substitution führt. Die Nukleinsäure wird sodann in operativer Weise mit einem geeigneten Promotor verbunden. Geeignete Promotoren für die Expression in bekannten Expressionssystemen sind dem Fachmann bekannt. Die Wahl des Promotors hängt hierbei vom zur Expression verwendeten Expressionssystem ab. Generell sind konstitutive Promotoren bevorzugt, jedoch sind auch induzierbare Promotoren verwendbar. Das so hergestellte Konstrukt umfasst wenigstens einen Teil eines Vektors, insbesondere regulatorische Elemente, wobei der Vektor beispielsweise ausgewählt ist aus  $\lambda$ -Derivaten, Adenoviren, Baculoviren, Vacciniaviren, SV40-Viren und Retroviren. Der Vektor ist vorzugsweise zur Expression der Nukleinsäure in einer gegebenen Wirtszelle fähig.

**[0029]** Ferner stellt die Erfindung Wirtszellen bereit, die den Vektor enthalten und die zur Expression des Vektors geeignet sind. Im Stand der Technik sind zahlreiche prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme bekannt, wobei die Wirtszellen beispielsweise ausgewählt sind aus prokaryontischen Zellen wie *E. coli* oder *B. subtilis*, aus eukaryontischen Zellen wie *S. cerevisiae* und *P. pastoris* oder auch höheren eukaryontischen Zellen wie Insektenzellen oder Säugerzellen.

**[0030]** Das Peptid bzw. Polypeptid kann auch direkt durch Synthese oder Fragmentkondensation erhalten werden. Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann bekannt.

**[0031]** Das Peptid bzw. Polypeptid wird nachfolgend aufgereinigt. Hierbei kommen dem Fachmann bekannte Verfahren zum Einsatz, wie z. B. Chromatographie-Verfahren oder Elektrophorese.

**[0032]** Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Zusammensetzung bereitgestellt, die wenigstens ein erfindungsgemäßes Polypeptid umfasst. Die Zusammensetzung kann hierbei als Gemisch oder als Konjugat vorliegen. Das Polypeptid kann beispielsweise mit Farbstoffmolekülen oder Trägern konjugiert sein.

**[0033]** Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Antikörper oder ein Fragment davon bereitgestellt, der/das an die Aminosäuresequenz, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz der luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus *Homo sapiens*, bindet. Der Antikörper kann monoklonal oder polyklonal sein. Monoklonale Antikörper können gemäß dem Fachmann bekannten Verfahren durch Immunisieren von Versuchstieren wie Mäusen und nachfolgendem Isolieren und Screening von Hybridoma hergestellt werden.

**[0034]** Vorzugsweise ist der Antikörper fähig, die Bindung des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C an Botulinus Neurotoxin zu blockieren. Dies kann in bekannten kompetitiven Assays wie Radioimmunoassays oder ELISAs nachgewiesen werden.

**[0035]** Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine pharmazeutische Zusammensetzung bereitgestellt, die wenigstens ein erfindungsgemäßes Polypeptid und/oder wenigstens einen erfindungsgemäßen Antikörper umfasst. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann optional einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, ein Verdünnungsmittel und/oder Additiv enthalten. Die pharmazeutische Zusammensetzung ist zur oralen, intravenösen, subkutanen, intramuskulären und topischen Verabreichung geeignet.

**[0036]** Die pharmazeutische Zusammensetzung wird zur Behandlung bei Botulismus, nach Überdosierung bei therapeutischer Behandlung oder kosmetischer Anwendung von BoNT/A, Intoxikation oder zur Prophylaxe angegeben.

**[0037]** Beschrieben hierin wird ein Verfahren zur Reduktion der Neurotoxizität von BoNT/A in Säugetieren bereitgestellt, umfassend das Verabreichen eines Agens an das Säugetier, wobei das Agens die Bindung von BoNT/A an eine mindestens zu 70% identische Aminosäuresequenz zur luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus *Homo sapiens* um wenigstens 10% vermindert, vorzugsweise um wenigstens 50%, insbesondere um wenigstens 80% vermindert.

**[0038]** Das Agens kann hierbei durch das nachstehend beschriebene Screening-Verfahren bestimmt werden.

**[0039]** Bevorzugt wird dem Säugetier ein Polypeptid gegeben, welches eine mindestens zu 70% identische Aminosäuresequenz zur luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C (SV2C) aus Homo sapiens aufweist und welches die Bindung von BoNT/A an SV2C vermindert.

**[0040]** Weiterhin bevorzugt wird dem Säugetier ein Antikörper gegeben, welcher die Bindung von BoNT/A an eine mindestens zu 70% identische Aminosäuresequenz zur luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens vermindert.

**[0041]** Weiterhin bevorzugt wird dem Säugetier ein Agens gegeben, welches die Expression der luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens vermindert. Das Agens kann hierbei ein antisense-Molekül sein. Verfahren zur Herstellung von antisense-Molekülen sind dem Fachmann bekannt.

**[0042]** Das Verfahren kann zur Reduktion der Neurotoxizität von BoNT/A bei Botulismus, nach Überdosierung bei therapeutischer Behandlung oder kosmetischer Anwendung von BoNT/A, Intoxikation oder zur Prophylaxe verwendet werden.

**[0043]** Vorzugsweise ist das Säugetier Homo sapiens.

**[0044]** Beschrieben hierin wird ein Verfahren zur Identifizierung eines Agens, welches die Bindung von BoNT/A an die luminal Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens vermindert, umfassend:

- (a) das Inkontaktbringen eines Agens mit einer Lösung aus BoNT/A und GST-SV2C (454–579)
- (b) Bestimmen der Menge an gebundenem GST-SV2C (454–579)
- (c) Auswählen des Agens, das die an GST-SV2C (454–579) gebundene Menge von BoNT/A verringert.

**[0045]** Das Screening kann hierbei z. B. mit chemischen Bibliotheken (chemical libraries) durchgeführt werden. Weiterhin werden auch Banken aus DNA und/oder RNA-Molekülen in Erwägung gezogen.

**[0046]** Vorzugsweise ist die luminal Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens in eine Plasmamembran einer Zelle eingelagert. Hierbei sind geeignete Zellen neuroendokrine Zellen wie PC 12, Neuroblastoma-Zellen wie 2A, und Hybridoma-Zellen aus embryonalem Hirngewebe wie NT2.

**[0047]** Weiterhin bevorzugt wird die durch die Gegenwart des Agens verminderte Bindung von BoNT/A an das synaptische Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens nachgewiesen durch eine verringerte Neurotoxizität des BoNT/A im Maus Hemidiaphragma Test.

**[0048]** Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Nachweis von BoNT/A aus Clostridium botulinum in einer beliebigen Probe bereitgestellt, umfassend:

- (a) Immobilisieren eines Polypeptides an einer Festphase, wobei das Polypeptid eine mindestens zu 70% identische Aminosäuresequenz zur luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens aufweist und welches die Bindung von BoNT/A an SV2C vermindert;
- (b) Inkontaktbringen des immobilisierten Polypeptides mit einer Probe unter Bedingungen, die Bindung von BoNT/A an das Polypeptid erlauben;
- (c) Eluieren des BoNT/A-Polypeptid-Komplexes; und
- (d) Nachweisen des Komplexes oder seiner Bestandteile.

**[0049]** Das Immobilisieren kann beispielsweise durch BrCN-Kopplung des Polypeptides an für Chromatographiezwecke bekannte Materialien wie Sepharose erfolgen. Die Bedingungen, die die Bindung von BoNT/A an das Polypeptid erfolgen können durch Routine-Versuche bestimmt werden. Die Bedingungen sind so zu wählen, dass keiner der Bindungspartner denaturiert. Das Eluieren kann beispielsweise durch Konkurrenz oder Veränderung der pH- und/oder Salzbedingungen erfolgen. Der Komplex oder seine Bestandteile können beispielsweise durch SDS-PAGE aufgetrennt werden.

**[0050]** Das folgende Beispiel dient lediglich dem Zwecke der Verdeutlichung und sollte nicht als begrenzend angesehen werden.

**[0051] Fig. 1:** Das H<sub>C</sub>-Fragment von BoNT/A interagiert mit SV2C. (A) Schematische Darstellung der synaptischen Vesikel Glykoproteine. (B, C) GST-Fusionproteine immobilisiert an GT-Sepharosekügelchen, werden

mit rekombinanten (B) or <sup>35</sup>S-markierten (C) BoNT H<sub>C</sub>-Fragmenten in der Gegenwart von Gangliosiden inkubiert. An der Festphase gebundene H<sub>C</sub>-Fragmente werden durch SDS-PAGE und Coomassie Blau Färbung oder Autoradiography nachgewiesen.

**[0052] Fig. 2:** BoNT/A H<sub>C</sub>-Fragment bindet an die intravesiculäre Region benachbart zur Transmembrandomäne 8 von SV2C. GST-Fusionsproteine immobilisiert an GT-Sepharosekügelchen, werden mit rekombinanten BoNT H<sub>C</sub>-Fragmenten in der Gegenwart von Gangliosiden inkubiert. An der Festphase gebundene H<sub>C</sub>-Fragmente werden durch SDS-PAGE und Coomassie Blau Färbung oder immunchemisch nachgewiesen.

## Material und Methoden

### Plasmidkonstruktion und Herstellung rekombinanter Proteine

**[0053]** Plasmide für die *F. coli* Expression von volle Länge BoNT/A und B bzw. rekombinanten H<sub>C</sub>-Fragmenten von BoNT/A-G und TeNT mit carboxyl-terminalen StrepTag zur Affinitätsaufreinigung bzw. zur *in vitro* Transkription/Translation mit <sup>35</sup>S-Methionin wurden durch PCR-Verfahren mit geeigneten Primern, BoNT/A-G und TeNT kodierender cDNA und dem Expressionsvektor pQe3 (Qiagen AG) bzw. pSP72 (Promega) als Ausgangsvektor erzeugt.

**[0054]** cDNA Abschnitte, die die intravesikulären Segmente der verschiedenen synaptischen Vesikel Protein kodieren, wurden in den Vektor pGEX-4T3 unter Benutzung entsprechender Oligonukleotide und einer embryonalen Maus cDNA-Bank (GST-Syo-157-218, GST-Syg-I-45-98) oder von Plasmiden mit entsprechender cDNA als Vorlage kloniert: GST-Syg-I-127-169 (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH; www.rzpd.de; ID IRAKp961C072Q), GST-SV2A-468-618 (RZPD-ID IRAKp961O24100Q), GST-Syo-22-103 (Ratte; T. C. Südhof, Dallas), GST-Syg-III-46-88 und GST-Syg-III-128-168 (Maus; T. C. Südhof, Dallas), GST-SV2B-413-560 (Ratte; S. Bajjalieh, Seattle), und GST-SV2C-454-603 (Ratte; R. Janz, Houston). Ein das Hybrid GST-SV2-C/A kodierende Plasmid beinhaltet die Aminosäuren 454–553 von SV2C und 568–594 von SV2A und wurde ebenfalls mit den entsprechenden Oligonukleotiden per PCR generiert. Die Nukleinsäuresequenzen sämtlicher Plasmide wurden durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Die rekombinanten H<sub>C</sub>-Fragmente wurden im *E. coli*-Stamm M15 [pRep4] (Qiagen) während einer zehnstündigen Induktion bei Raumtemperatur hergestellt und an einer StrepTactin-Matrix (IBA GmbH) gemäß den Herstellerempfehlungen aufgereinigt. Die aus *E. coli* BL21 erhaltenen GST-Fusionsproteine wurden mit Hilfe von auf Sepharosekügelchen immobilisierten Glutathion isoliert. Fraktionen, die die gewünschten Proteine enthielten, wurden vereinigt und gegen Tris-NaCl-Triton-Puffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, pH 7,2) bzw. Krebs-Ringer Puffer (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM Glukose) dialysiert.

**[0055]** <sup>35</sup>S-markierte H<sub>C</sub>-Fragmente wurden *in vitro* aus pSP72 Derivaten, die stromabwärts vom carboxyl-terminalen Kodon des Neurotoxins linearisiert wurden, unter Benutzung des Reticulozytenlysatsystems (Promega, Mannheim) und L-<sup>35</sup>S-Methionin (840 kBq, > 37 TBq/mmol; Amersham Biosciences) in einem Ansatz von 2 µl synthetisiert

### GST-Pull-down Assay

**[0056]** GST-Fusionsproteine (jeweils 0,15 nmol), die auf 10 µl GT-Sepharose-Kügelchen immobilisiert waren, wurden mit H<sub>C</sub>-Fragmenten (0,1 nmol) in Abwesenheit oder Gegenwart eines Rinderhirn-Gangliosid-Gemisches (18% GM1, 55% GD1a, 10% GT1b, 2% sonstige Ganglioside; Calbiochem; 20 µg jeweils) in einem Gesamtvolumen von 100 µl Tris-NaCl-Triton-Puffer für 3 h bei 4°C inkubiert. Die Kügelchen wurden durch Zentrifugation gesammelt, der Überstand entfernt und die separierten Kügelchen jeweils dreimal mit 160 µl des gleichen Puffers gewaschen. Die gewaschenen Pellet-Fraktionen wurden in SDS-Probenpuffer aufgekocht und zusammen mit den Überstandfraktionen durch SDS-PAGE und Coomassie Blaufärbung, Autoradiography oder Immunoblotting untersucht.

### Maus Hemidiaphragma Assay (HDA)

**[0057]** Der Maus Hemidiaphragma Assay (HDA) wurde durchgeführt wie unter Habermann (Habermann E, Dreyer F, Bigalke H (1980) Tetanus toxin blocks the neuromuscular transmission *in vitro* like botulinum A toxin. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 311: 33–40) beschrieben. Der Nervus phrenicus wurde mit einem Hertz stimuliert und die Kontraktionsamplitude kontinuierlich mittels Kraftmesser und der VitroDat Online Software (FMI GmbH, Seeheim-Ober Beerbach,) aufgezeichnet. Nach Zugabe des BoNTs wurde die Zeit gemes-

sen, in der die Kontraktionsamplitude auf 50% des Ausgangswertes abfällt (Paralytische Halbzeit). Volle Länge scBoNT/A Wildtyp wurde mindestens dreifach in folgenden Endkonzentrationen gemessen: 24,3 pM, 72,8 pM, 223 pM, und 728 pM. An diese Konzentrations-Wirkungsbeziehung wurde eine Potenzfunktion angenähert:  $y(A) = 225,87x^{-0,2573}$  ( $R^2 = 0,9627$ ). In gleicher Weise wurde die Konzentrations-Wirkungsbeziehung  $y(B) = 423,59x^{-0,297}$  ( $R^2 = 0,983$ ) für volle Länge scBoNT/B Wildtyp mit folgenden Endkonzentrationen erstellt: 100 pM, 300 pM, 1000 pM, und 3000 pM. Für die Inhibitionstudien wurden scBoNT/A (223 pM) und scBoNT/B (1000 pM) entweder mit GST-SV2C-454-579 oder GST-SV2-C/A (Endkonzentration 4,7 oder 11,2  $\mu$ M) gemischt, 15 min bei 20°C inkubiert und dem HDA zugefügt. Anhand der Potenzfunktionen wurden die z. T. verlängerten paralytischen Halbzeiten in entsprechend niedrigere Neurotoxindosen umgerechnet und als % Toxizität ausgedrückt.

### Ergebnisse

**[0058]** Die luminalen Domänen und die carboxyl-terminalen Transmembrandomänen der Proteine Synaptophysin, Synaptoporin, Synaptogyrin I & III, Synaptotagmin II, SV2A, SV2B und SV2C wurden subkloniert und als Gluthathion-S-Transferase(GST)-Fusionsprotein rekombinant in *E. coli* exprimiert und isoliert. Die H<sub>C</sub>-Fragmente der sieben BoNTs und von Tetanus Neurotoxin (TeNT) wurden sowohl rekombinant in *E. coli* exprimiert als auch mit <sup>35</sup>S-Methionin *in vitro* translatiert. Die Affinität der H<sub>C</sub>-Fragmente an die luminalen Domänen der oben aufgeführten GST-Fusionsproteine wurde in Gluthathion-S-Transferase-(GST)-Pull-down Experimenten bestimmt. Hierzu wurde das jeweilige GST-Fusionsprotein mit unterschiedlichen H<sub>C</sub>-Fragmenten inkubiert und eine Phasentrennung durchgeführt. Freies He-Fragment verblieb im separierten Überstand, während gebundenes BoNT H<sub>C</sub>-Fragment in der Festphase zusammen mit dem GST-Fusionsprotein nachweisbar war. Der Ersatz der rekombinanten H<sub>C</sub>-Fragmente durch <sup>35</sup>S-markierte H<sub>C</sub>-Fragmente sowie von volle Länge BoNT/A ergab im GST-Pull-down Experimenten im Vergleich zum H<sub>C</sub>-Fragment von BoT/A dieselben Ergebnisse.

Tabelle 1: Die intravesikuläre Domain von SV2C blockiert die Aktivität von BoNT/A im HDA.

BoNT	BoNT [pM]	Inhibitor <sup>a</sup>	Inhibitor [ $\mu$ M]	Paral. Halbwertszeit $t_{1/2}$ <sup>b</sup> [mm]	Toxizität versus reinem BoNT [%]		Inhibition [%]
BoNT/A	223	kein		50 $\pm$ 7	100		
BoNT/A	223	SV2C-454-579	4,7	72 $\pm$ 3	25,1 $\pm$	1,0	75
BoNT/A	223	SV2C-454-579	11,2	83 $\pm$ 8	14,6 $\pm$	1,5	85
BoNT/A	1000	kein		57 $\pm$ 6	100		
BoNT/A	1000	SV2C-454-579	4,7	56 $\pm$ 13	105,1 $\pm$	24,8	0
BoNT/A	1000	SV2C-454-579	11,2	60 $\pm$ 7	86,6 $\pm$	9,7	14
BoNT/A	223	SV2-C/A	4,7	51 $\pm$ 4	100,0 $\pm$	1,0	0
BoNT/A	223	SV2-C/A	11,2	51 $\pm$ 5	100,0 $\pm$	1,0	0

<sup>a</sup> Inhibitoren wurden als GST-Fusionsproteine eingesetzt

<sup>b</sup> Mittelwerte  $\pm$  S. D. (n = 3–9)

<sup>c</sup> Volle Länge scBoNT/A Wildtyp wurde mindestens dreifach in folgenden Endkonzentrationen gemessen: 24,3 pM, 72,8 pM, 223 pM, und 728 pM. An diese Konzentrations-Wirkungsbeziehung wurde eine Potenzfunktion angenähert:  $y(A) = 225,87x^{-0,2573}$  ( $R^2 = 0,9627$ ). In gleicher Weise wurde die Konzentrations-Wirkungsbeziehung  $y(B) = 423,59x^{-0,297}$  ( $R^2 = 0,983$ ) für volle Länge scBoNT/B Wildtyp mit folgenden Endkonzentrationen erstellt: 100 pM, 300 pM, 1000 pM, und 3000 pM.

**[0059]** Dabei wurde herausgefunden, dass keines der acht H<sub>C</sub>-Fragmente von BoNT/A, B, C, D, E, F, G und TeNT an die luminalen Domänen von Synaptophysin, Synaptoporin, Synaptogyrin I & III, SV2A und SV2B unabhängig von der Anwesenheit von komplexen Gangliosiden bindet. Wie bereits bekannt binden die H<sub>C</sub>-Fragmente von BoNT/B und G an die luminal Domäne von Synaptotagmin II, nicht aber das H<sub>C</sub>-Fragment von BoNT/A. Einzig das rekombinante als auch das <sup>35</sup>S-markierte H<sub>C</sub>-Fragment sowie das volle Länge BoNT/

A binden spezifisch an die an GST fusionierte luminale Domäne von SV2C unabhängig von der Anwesenheit von komplexen Gangliosiden. Alle anderen H<sub>C</sub>-Fragmente zeigen keine Interaktion mit SV2C (**Fig. 1**).

**[0060]** Weiterhin wurde gezeigt, dass die Bindung des H<sub>C</sub>-Fragments von BoNT/A an die luminale Domäne von SV2C nach Verkürzung um die Transmembrandomäne 8 (GST-SV2C 454–579) schwächer ist (**Fig. 2**). Eine carboxyl-terminale Deletion um 20 Aminosäuren (GST-SV2C 454–553) und weitere Verkürzungen führten zum Erliegen der Wechselwirkung mit BoNT/A. Auch amino-terminale Deletionen verhinderten die Bindung von BoNT/A an die GST-SV2C Fusionsproteine.

**[0061]** Die GST-Fusionsproteine der zu SV2C homologen SV2A und SV2B zeigten weder mit noch ohne carboxyl-terminaler Transmembrandomäne Bindung an BoNT/A. Die Generation eines Hybrids bestehend aus GST, den Aminosäuren 454–554 von SV2C und den Aminosäuren 568–594 von SV2A wies ebenfalls keinerlei Interaktion mit BoNT/A H<sub>C</sub>-Fragment mehr auf.

### Patentansprüche

1. Polypeptid, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens, wobei das Polypeptid das H<sub>C</sub>-Fragment von Botulinus Neurotoxin A bindet, mit der Maßgabe, dass das Polypeptid nicht das synaptische Glykoprotein 2C aus Homo sapiens, Rattus norvegicus oder Mus musculus ist.

2. Polypeptid gemäß Anspruch 1, wobei die Aminosäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist mit der Aminosäuresequenz des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens.

3. Polypeptid gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei die Aminosäuresequenz zu mindestens 90% identisch ist mit der Aminosäuresequenz des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens.

4. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Aminosäuresequenz zu mindestens 95% identisch ist mit der Aminosäuresequenz des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens.

5. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Aminosäuresequenz zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz der luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens.

6. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Aminosäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist mit der Aminosäuresequenz der luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens.

7. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Aminosäuresequenz zu mindestens 90% identisch ist mit der Aminosäuresequenz der luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens.

8. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Aminosäuresequenz zu mindestens 95% identisch ist mit der Aminosäuresequenz der luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens.

9. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Polypeptid das isolierte Polypeptid der luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens ist, wobei das isolierte Polypeptid das H<sub>C</sub>-Fragment von Botulinus Neurotoxin A bindet.

10. Nukleinsäure kodierend ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, zur Verwendung zur Expression eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9.

11. Vektor enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 und ferner einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor, wobei die für das Polypeptid kodierende Nukleinsäure unter der Kontrolle des Promotors steht.

12. Wirtszelle enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 und/oder einen Vektor gemäß Anspruch 11.

13. Verfahren zur Herstellung des Polypeptides nach einem der Ansprüche 1 bis 10 umfassend das rekombinante Expressieren einer das Polypeptid kodierenden Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 und/oder eines Vektors gemäß Anspruch 11 in einer geeigneten Wirtszelle und gegebenenfalls Isolieren des hergestellten Polypeptides in an sich bekannter Weise.

14. Zusammensetzung umfassend wenigstens ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9.

15. Antikörper oder ein Fragment davon, der/das an die Aminosäuresequenz, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz der luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens, bindet.

16. Antikörper gemäß Anspruch 15, wobei der Antikörper die Bindung des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C an Botulinus Neurotoxin blockiert.

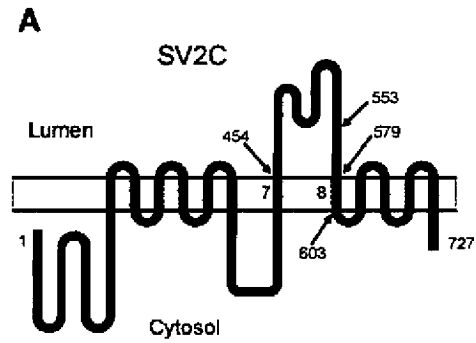
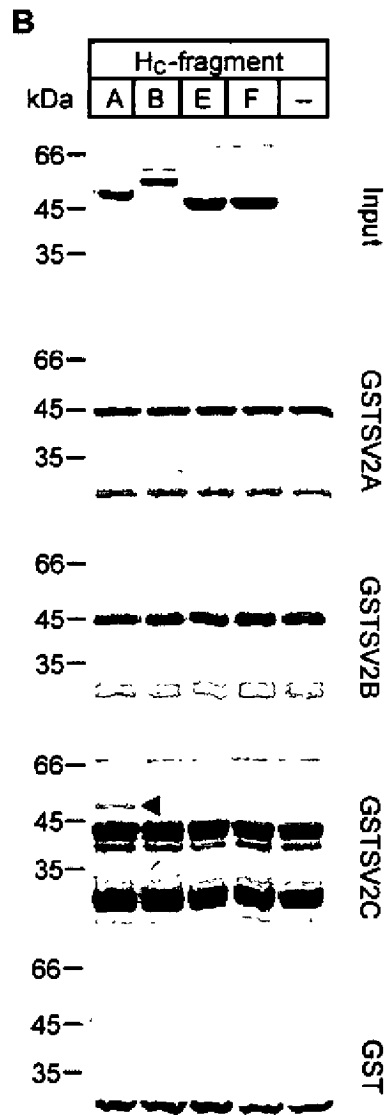
17. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend wenigstens ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 und/oder wenigstens einen Antikörper gemäß Anspruch 15 oder 16.

18. Verfahren zum Nachweis von BoNT/A aus Clostridium botulinum in einer beliebigen Probe, umfassend:  
(a) Immobilisieren eines Polypeptides an einer Festphase, wobei das Polypeptid eine mindestens zu 70% identische Aminosäuresequenz zur luminalen Domäne (Aminosäuren 454–579) des synaptischen Vesikel Glykoproteins 2C aus Homo sapiens aufweist und welches die Bindung von BoNT/A an SV2C vermindert;  
(b) Inkontaktbringen des immobilisierten Polypeptides mit einer Probe unter Bedingungen, die Bindung von BoNT/A an das Polypeptid erlauben;  
(c) Eluieren des BoNT/A-Polypeptid-Komplexes; und  
(d) Nachweisen des Komplexes oder seiner Bestandteile.

Es folgen 2 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1



Figur 2

