

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 687**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/52**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2011** **E 16193811 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024** **EP 3162894**

54 Título: **Métodos para la fabricación de polipéptidos procesados proteolíticamente**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.07.2024**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RUMMEL, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 974 687 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

Métodos para la fabricación de polipéptidos procesados proteolíticamente

En la presente memoria se describen un nuevo polipéptido proteolíticamente activo y diversos usos del polipéptido en métodos de detección y fabricación.

5 Clostridium botulinum y Clostridium tetani producen neurotoxinas muy potentes, es decir, neurotoxinas botulínicas (BoNTs) y neurotoxina tetánica (TeNT), respectivamente. Estas neurotoxinas clostridiales (CNTs) se unen específicamente a las células neuronales e interrumpen la liberación de neurotransmisores. El Clostridium botulinum secreta siete serotipos antigénicamente distintos, denominados A a G de la neurotoxina botulínica (BoNT). Todos los serotipos, junto con la neurotoxina tetánica relacionada (TeNT) secretada por Clostridium tetani, son Zn<sup>2+</sup>-  
10 endoproteasas que bloquean la exocitosis sináptica mediante proteínas de escisión implicadas en la formación del complejo SNARE que controla la fusión de la membrana celular. Las CNTs provocan la parálisis muscular flácida que se observa en el botulismo y el tétanos. Además, se ha demostrado que la actividad de CNT afecta la secreción glandular. Estos efectos fisiológicos de las CNTs sobre la actividad muscular y glandular se utilizan cada vez más en diversas aplicaciones terapéuticas y cosméticas. La neurotoxina botulínica de serotipo A (BoNT/A) fue aprobada para uso humano en los Estados Unidos en 1989 para el tratamiento del estrabismo, el blefaroespasma y otros trastornos.  
15 Está disponible comercialmente como una preparación de proteína de toxina botulínica A, por ejemplo, con el nombre comercial BOTOX (Allergan Inc.) y con el nombre comercial DYSPORT (Ipsen Ltd). Para la aplicación terapéutica, se inyecta directamente en el músculo que se va a tratar un complejo que comprende la neurotoxina y proteínas bacterianas adicionales. A pH fisiológico, la toxina se libera del complejo proteico (Eisele et al. 2011, Toxicon 57(4):555-65.) y se produce el efecto farmacológico deseado. Una preparación de BoNT/A mejorada que está libre de proteínas complejantes está disponible con los nombres comerciales XEOMIN o Bocouture (Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt/Alemania). El efecto de la BoNT es sólo temporal, razón por la cual normalmente se requiere la administración repetida de BoNT para mantener el efecto terapéutico.

25 Cada CNT se sintetiza inicialmente como un polipéptido monocatenario inactivo. En el caso de BoNT, el polipéptido de la neurotoxina tiene un peso molecular de aproximadamente 150 kDa. El procesamiento postraduccional de este polipéptido monocatenario implica una proteólisis limitada en una región expuesta llamada bucle (véase tabla 1) y la formación de un puente disulfuro cercano. La neurotoxina bicatenaria activa consiste en dos productos de escisión resultantes de la hidrólisis proteolítica del polipéptido precursor monocatenario: una cadena ligera N-terminal de aproximadamente 50 kDa y una cadena pesada de aproximadamente 100 kDa unidas por un enlace disulfuro. Las CNTs consisten estructuralmente en tres dominios, es decir, la cadena ligera catalítica, la cadena pesada que abarca el dominio de translocación (mitad N-terminal) y el dominio de unión al receptor (mitad C-terminal) (cf. Krieglstein 1990, Eur J Biochem 188: 39; Krieglstein 1991, Eur J Biochem 202: 41; Krieglstein 1994, J Protein Chem 13: 49; Lacy et al., 1998, Nat. Struct. Biol. 5(10):898-902). Dependiendo del número de sitios de escisión presentes en la cadena sencilla entre los restos de aminoácidos que forman el dominio catalítico y los restos de aminoácidos que forman el dominio de translocación, la actividad de la endopeptidasa puede dar lugar a dos grandes productos de escisión, es decir, la cadena ligera y pesada y, además, péptidos cortos característicos que representan la antigua región del bucle, uniendo en la cadena sencilla de la neurotoxina lo que se convertirá en la cadena ligera y pesada (véase tabla 1, a continuación).

40 La purificación de las CNTs de la solución de fermentación es un desafío particular, ya que las neurotoxinas están contenidas en ella como una mezcla de polipéptidos sin procesar, parcialmente procesados y completamente procesados, todos los cuales tienen propiedades bioquímicas y físicas muy similares. Las neurotoxinas parcialmente procesadas generalmente se generan si la actividad endoproteolítica ha hidrolizado el enlace peptídico entre la cadena ligera y el bucle, mientras que el enlace peptídico entre el bucle y el extremo N-terminal de la cadena pesada todavía está intacto. Además, también se puede crear una neurotoxina parcialmente procesada si la actividad endoproteolítica ha liberado el péptido del bucle de la cadena pesada, mientras que el enlace peptídico entre el péptido de bucle y el extremo C-terminal de la cadena ligera aún no se ha hidrolizado. Dependiendo de las condiciones de fermentación y del tipo de neurotoxina, el polipéptido completamente procesado que está desprovisto del péptido del bucle puede estar contaminado significativamente, con entre un 5 % y un 90 % de polipéptido parcialmente procesado o sin procesar. Sin embargo, en algunos casos, la neurotoxina está principalmente sin procesar y, antes de su uso terapéutico, es necesario tratarla con una endopeptidasa para volverse biológicamente activa.

55 La técnica anterior describe varios intentos de tratar neurotoxinas clostridiales con proteasas heterólogas para reducir la cantidad de proteína precursora sin procesar o parcialmente procesada. La proteasa más utilizada para la activación de las neurotoxinas clostridiales, tripsina, aunque es útil para activar las neurotoxinas clostridiales de los serotipos B (BoNT/B) y E (BoNT/E) (DasGupta & Sugiyama 1972, Biochem. Biophys. Res. Commun. 48: 108-112; Kozaki et al., 1974, Infect. Inmun. 10: 750-756) parece producir productos secundarios, presumiblemente por acción proteolítica cerca del extremo C-terminal de la subunidad pesada de BoNT/A y, por lo tanto, parece destruir la unión de la toxina a su receptor celular (Shone et al., 1985, Eur. J. Biochem. 151: 75-82). En teoría, se esperan productos de escisión más específicos a partir de proteasas endógenas, aisladas a partir del huésped nativo, tal como C. botulinum que produce BoNT/A. En consecuencia, se han realizado varios intentos para aislar a partir de la célula huésped nativa la proteasa endógena implicada en la activación proteolítica de las neurotoxinas clostridiales. Dekleva & DasGupta (Dekleva & DasGupta, 1989, Biochem. Biophys. Res. Commun. 162: 767-772) purificaron a partir de cultivos de C. botulinum que

5 producen BoNT/A, una fracción capaz de escindir proteolíticamente BoNT/A en una subunidad pesada y una ligera. Estudios posteriores de los mismos autores caracterizaron aún más la proteasa endógena aislada de *C. botulinum* (Dekleva & DasGupta, 1990, J. Bact. 172: 2498-2503) y revelaron una proteína de 62 kDa, compuesta por un polipéptido de 15,5 kDa y un polipéptido de 48 kDa. Sin embargo, la observación de una fragmentación considerable de las CNTs después de una exposición limitada a la proteína de 62 kDa de Dekleva & DasGupta sugiere que la proteasa aislada puede no ser la enzima proteolítica no identificada responsable de la activación de las CNTs en cultivos de células clostridiales y durante la infección. De hecho, otros han sugerido recientemente que Clostripain, también denominado clostridiopeptidasa B (Mitchel & Harrington, 1968, JBC 243: 4683-4692), podría estar implicada en la activación específica de CNTs (Sebahia et al., 2007, Genome Res. 17(7): 1082-1092; documento de Patente WO2009/014854). Curiosamente, la estructura y la especificidad del sustrato de esta enzima recuerdan a las de la alfa-clostripaína secretada por *Clostridium histolyticum* (Dargatz et al. 1993), cuyo homólogo (74% de identidad de aminoácidos) está presente en *C. botulinum* (CBO1920). La alfa-clostripaína de *C. histolyticum* es una cisteína endopeptidasa con especificidad estricta por el enlace arginilo. Se sintetiza como una prepro-enzima inactiva que sufre una escisión autocatalítica para generar polipéptidos de 15,4 y 43 kDa, que se asocian para formar una enzima activa heterodimérica (Dargatz et al. 1993). Tanto la alfa-clostripaína de *C. histolyticum* como la proteasa de 62 kDa de *C. botulinum* requieren un agente reductor y calcio para tener plena actividad y ser susceptibles a los mismos inhibidores de la proteasa. Estos datos sugieren fuertemente que el *C. botulinum* ortólogo de alfa-clostripaína (CBO1920) es la proteasa endógena responsable del corte proteolítico de la neurotoxina de *C. botulinum*. Un gen que codifica la clostripaína (CPE0846) también está presente en *C. perfringens*, y se ha descubierto que está regulado positivamente por el sistema de dos componentes VirR/VirS (Shimizu et al. 2002b). Kozaki et al (1985), FEMS Microbiology Letters, 27, 2, 149-154 describen la activación de toxinas derivadas de *Clostridium botulinum* de tipo B y E con proteasas específicas de lisina. Estey et al (2009), Journal of Pharmaceutical Sciences, 98, 9, 2994-3012 describen la evaluación de la degradación química de una vacuna de proteína recombinante trivalente contra la neurotoxina botulínica mediante mapeo del péptido LysC y espectrometría de masas MALDI-TOF. El documento de Patente US 2010/022751 A1 describe fragmentos de toxina recombinante.

Sin embargo, hasta el día de hoy, faltan más pruebas experimentales concluyentes y todavía no está disponible en la técnica una proteasa capaz de convertir eficientemente las CNTs precursoras monocatenarias en productos de escisión maduros auténticos, es decir, la neurotoxina bicatenaria.

30 Los medios y métodos para reducir la cantidad de polipéptidos de neurotoxinas sin procesar y/o parcialmente procesados y mejorar así la calidad de las preparaciones de neurotoxinas son muy deseables, pero aún no están disponibles. Por tanto, el problema técnico subyacente a la presente invención puede verse como la provisión de medios y métodos para mejorar la fabricación de polipéptidos de neurotoxinas cumpliendo con las necesidades antes mencionadas. El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y a continuación en la presente memoria.

35 En la presente memoria se describe un polipéptido proteolíticamente activo que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1. En la presente memoria se describe un polipéptido proteolíticamente activo que consiste en una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1. En la presente memoria se describe un polipéptido proteolíticamente activo que consiste en una secuencia polipeptídica como se muestra en SEQ ID NO: 40 1.

El término "polipéptido proteolíticamente activo" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a la función catalítica del polipéptido de la presente invención y significa que el polipéptido de la presente invención es capaz de hidrolizar un enlace peptídico. Un "polipéptido proteolíticamente activo" puede referirse a un polipéptido que es capaz de hidrolizar un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NOs: 4 a 25. El término "polipéptido proteolíticamente inactivo" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a la función catalítica del polipéptido de la presente invención y significa que el polipéptido de la presente invención es incapaz de hidrolizar un enlace peptídico.

El experto puede determinar si un polipéptido según la definición de secuencia mencionada en la presente memoria es un polipéptido descrito en la presente memoria, probando la actividad proteolítica de dicho polipéptido. Un ensayo o sistema de prueba para determinar la actividad proteolítica comprende poner en contacto un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1 con un sustrato de prueba. Un sustrato de prueba es generalmente un polipéptido que se sabe que es escindible mediante un polipéptido descrito en la presente memoria. En la presente memoria se describe un sustrato de prueba que es una CNT tal como BoNT o un fragmento de la misma. El sustrato de prueba puede ser, por ejemplo, BoNT sin escindir/sin procesar, denominado en la presente memoria como "scBoNT" y puede ser, por ejemplo, del serotipo A, B, C1, D, E, F o G (por ejemplo, "scBoNT/A", "scBoNT/B", etc.) o el sustrato de prueba puede ser una neurotoxina tetánica. Alternativamente, el sustrato de prueba puede ser un fragmento de una neurotoxina clostridial, comprendiendo dicho fragmento una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NOs: 4 a 25. El fragmento puede ser un polipéptido de 50 o más restos de aminoácidos o un péptido de hasta 49 restos de aminoácidos. Tal y como se utiliza en toda la presente memoria descriptiva, el término "polipéptido" se refiere a moléculas con 50 o más restos de aminoácidos, mientras que el término "péptido" se refiere a moléculas con 2 a 49 restos de aminoácidos. El sustrato de prueba puede ser un fragmento de neurotoxina soluble llamado LH<sub>N</sub> que

comprende el polipéptido de cadena ligera, la región peptídica del bucle expuesto y la mitad N-terminal del polipéptido de cadena pesada, el dominio de translocación H<sub>N</sub>. El sustrato de prueba puede ser o puede comprender un péptido seleccionado de una cualquiera de SEQ ID NOs: 4 a 25 (véase la tabla 1). El sustrato de prueba puede ser una neurotoxina quimérica que comprende restos de aminoácidos derivados de dos o más serotipos.

- 5 Un ensayo para determinar la actividad proteolítica normalmente comprendería una etapa de determinar el grado de conversión del sustrato de prueba en su(s) producto(s) de escisión. La observación de uno o más productos de escisión generados después de poner en contacto el polipéptido con el sustrato de prueba o la observación de un aumento en la cantidad de productos de escisión es indicativo de la actividad proteolítica del polipéptido. Dicha etapa de determinación puede implicar comparar el sustrato y el(los) producto(s) de escisión. Dicha comparación puede implicar determinar la cantidad de sustrato y/o la cantidad de uno o más productos de escisión y también puede implicar calcular la proporción de sustrato y producto(s) de escisión. Además, el ensayo para determinar la actividad proteolítica puede comprender una etapa de comparar una muestra de prueba con una muestra de referencia, en donde la muestra de referencia comprende normalmente (a) un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1 y que se sabe que es proteolíticamente activo y (b) un sustrato de prueba que se sabe que es escindible por el polipéptido de (a). El ensayo para determinar la actividad proteolítica puede comprender separar el sustrato y el(los) producto(s) de escisión mediante electroforesis o mediante cromatografía en columna y, opcionalmente, un análisis espectrométrico. Puede ser conveniente marcar el sustrato de prueba con una o más etiquetas para detectar más fácilmente la disminución del sustrato de prueba y/o el aumento de producto(s). El término "etiqueta", tal y como se utiliza en la presente memoria, significa un marcador detectable e incluye, por ejemplo, etiqueta radioactiva, anticuerpo, etiqueta fluorescente. La cantidad de sustrato de prueba y/o producto de escisión puede determinarse, por ejemplo, mediante métodos de autorradiografía o espectrometría, incluyendo métodos basados en la transferencia de resonancia de energía entre al menos dos etiquetas. Alternativamente, se pueden utilizar para la detección métodos inmunológicos tales como la transferencia de Western o ELISA. Un ensayo preferido para determinar la actividad proteolítica de un polipéptido mostrado en la presente memoria se describe a continuación en los Ejemplos. Un polipéptido puede ser proteolíticamente activo si más del 20 %, preferiblemente más del 95 % del sustrato de prueba se convierte en productos de escisión tales como la cadena ligera y la cadena pesada en 120 min a 37°C usando un tampón seleccionado de Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 o PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Se aplican las mismas condiciones si el sustrato de prueba no es una neurotoxina de longitud completa sino, en lugar de eso, por ejemplo, un fragmento de la neurotoxina de longitud completa o un derivado de la neurotoxina. Es evidente que en este caso los productos de escisión serán diferentes. Sin embargo, el experto puede cuantificar los productos de escisión correspondientes. Normalmente, en el ensayo se pueden usar 100 ng de polipéptido proteolíticamente activo y una relación molar de 1:100 con respecto al sustrato. Se puede tomar una muestra a intervalos para seguir la actividad catalítica a lo largo del tiempo. El ensayo puede modificarse, por ejemplo, mediante el uso de múltiples cantidades del polipéptido proteolíticamente activo.
- 35 SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia polipeptídica de un polipéptido proteolíticamente inactivo derivado de una cepa ATCC 3502 de *Clostridium botulinum*, número de acceso a GenBank: "CAL82988.1", que tiene una longitud de aminoácidos de 581 restos. SEQ ID NO: 1 muestra un derivado proteolíticamente activo de SEQ ID NO: 2, que carece de los restos de aminoácidos 1 a 248 de SEQ ID NO: 2.

40 El término "polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1" se refiere a un polipéptido que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1. Además, el término se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1. Dicho polipéptido puede tener aminoácidos adicionales, por ejemplo en una posición interna o en el extremo N- o C-terminal a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 o en una posición interna o en el extremo N- o C-terminal a una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica con la secuencia de SEQ ID NO: 1, en donde una metionina puede estar presente en el extremo N-terminal del polipéptido. Además, el término se refiere a un polipéptido que carece de uno o más restos de aminoácidos, por ejemplo en una posición interna o en el extremo N o C-terminal de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 o en una posición interna o en el extremo N- o C-terminal de una secuencia que es al menos 50 % idéntica en secuencia a la SEQ ID NO: 1.

50 El término "identidad de secuencia" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a la determinación de la identidad entre una secuencia de aminoácidos de referencia y una secuencia de consulta en donde las secuencias están alineadas de modo que se obtenga la coincidencia de orden más alto, y que se pueda calcular usando técnicas publicadas o métodos codificados en programas informáticos tales como por ejemplo BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul 1990, J Mol Biol 215: 403). Los valores de porcentaje de identidad se calculan en un aspecto sobre la secuencia de aminoácidos entera. La identidad de secuencia se puede calcular sobre una longitud de secuencia de hasta 50 restos de aa, hasta 100 aa, hasta 150 aa, hasta 250 aa, 300 aa, 350 aa, 400 aa, 450 aa, 500 aa o 550 restos de aa. La identidad de secuencia se puede calcular sobre al menos 50 restos de aa, al menos 100 aa, al menos 150 aa o al menos 250 restos de aa. La identidad de secuencia se puede determinar en toda la longitud de SEQ ID NO: 1 o 2, es decir, sobre una longitud de 333aa o 581aa, respectivamente. El experto dispone de una serie de programas basados en una variedad de algoritmos para comparar diferentes secuencias. En este contexto, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman dan resultados especialmente fiables. Para llevar a cabo los alineamientos de secuencia y calcular los valores de identidad de secuencia mencionados en la presente memoria, se utilizó el

programa disponible comercialmente DNASTAR Lasergene MegAlign versión 7.1.0 basado en el algoritmo Clustal W sobre la región de secuencia entera con las siguientes configuraciones: Parámetros de alineación por pares: Penalización de espacio : 10,00, penalización por longitud del espacio: 0,10, matriz de pesos de proteínas Gonnet 250, que, a menos que se especifique lo contrario, siempre se utilizará como configuración estándar para alineamientos de secuencias.

El término "al menos 50% de identidad de secuencia" tal y como se usa en la presente memoria significa al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o 100%.

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

En la presente memoria se describe un polipéptido proteolíticamente activo que abarca un polipéptido que comprende restos de aminoácidos adicionales en el extremo N- o C-terminal y/o en una posición interna de la cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 1 o una de una secuencia polipeptídica que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1. Estos restos de aminoácidos adicionales pueden comprender hasta 5, hasta 10 o incluso hasta 200, 300 o hasta 400 restos de aminoácidos consecutivos. Los restos de aminoácidos adicionales pueden funcionar como inhibidores de la actividad proteolítica. Los restos de aminoácidos adicionales pueden eliminarse mediante una proteasa. Pueden excluirse los restos adicionales que inhiben la actividad proteolítica del polipéptido. Los restos de aminoácidos adicionales pueden estar flanqueados por uno o más sitios de escisión de proteasa. La secuencia de aminoácidos adicional puede funcionar como una etiqueta detectable y/o permitir la unión a un soporte sólido.

En la presente memoria se describe una cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 1 o una de una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1 que se modifica mediante el intercambio de uno o más restos de aminoácidos. El término "intercambiar", tal y como se utiliza en la presente memoria, significa sustituir un aminoácido por un aminoácido diferente. Por ejemplo, se pueden reemplazar hasta 1 aa, 2aa, 3aa, 4aa, 5aa, 6aa, 7aa, 8aa, 9aa, 10aa, 15aa, 20aa o hasta 50aa dentro de la secuencia polipeptídica. Los intercambios pueden implicar cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, con el objetivo, por ejemplo, de aumentar o disminuir la unión del sustrato o la actividad proteolítica del polipéptido descrito en la presente memoria.

En la presente memoria se describe un polipéptido proteolíticamente activo que abarca un polipéptido que es capaz de hidrolizar un sustrato en dos o más productos de escisión nativos. En la presente memoria se describe un polipéptido que hidroliza el sustrato en dos o más productos de escisión que difieren de los productos de escisión nativos. El término "productos de escisión nativos" o "productos nativos" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a productos que son idénticos en la secuencia de aminoácidos cuando se comparan con productos generados a partir del mismo sustrato en cultivos de células de tipo nativo, a partir de los cuales se origina el sustrato. En la presente memoria se describe un producto de escisión que es la neurotoxina bicatenaria de una neurotoxina botulínica o de la neurotoxina tetánica, se describe en la presente memoria una neurotoxina bicatenaria que es una neurotoxina aislada de *C. botulinum* de serotipo A, B, C1, D, E, F o G. En otra divulgación más, dicha neurotoxina bicatenaria es una neurotoxina bicatenaria nativa.

**Tabla 1** muestra el precursor, la neurotoxina bicatenaria nativa de TeNT y de BoNT/A-G e identifica el bucle expuesto que comprende la secuencia de aminoácidos escindida por el polipéptido descrito en la presente memoria.

Toxina	bucle expuesto	LC	H <sub>N</sub>	H <sub>CN</sub>	H <sub>CC</sub>
BoNT/A1	SEQ ID NO: 4	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A2	SEQ ID NO: 5	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A3	SEQ ID NO: 6	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A3	SEQ ID NO: 7	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A4	SEQ ID NO: 8	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A5	SEQ ID NO: 9	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A6	SEQ ID NO: 5	M1-K438	A449-N872	I873-S1093	N1094-L1297
BoNT/A7	SEQ ID NO: 10	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/B1	SEQ ID NO: 11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B2	SEQ ID NO: 12	M1-R441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B3	SEQ ID NO: 12	M1-R441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B4bv	SEQ ID NO: 11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B5nP	SEQ ID NO: 13	M1-K441	V442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B6	SEQ ID NO: 11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/C1	SEQ ID NO: 14	M1-R444	T450-I868	N869-L1092	Q1093-E1291
BoNT/CD	SEQ ID NO: 14	M1-R444	T450-I868	N869-Q1083	I1084-E1280
BoNT/D	SEQ ID NO: 15	M1-K442	D446-I864	N865-Q1079	I1080-E1276
BoNT/CC	SEQ ID NO: 16	M1-R442	D446-I864	N865-L1088	Q1089-E1285
BoNT/E1-E5	SEQ ID NO: 17	M1-K419	S424-I847	K848-P1067	N1068-K1252
BoNT/E6	SEQ ID NO: 18	M1-K419	S424-I847	K848-P1067	N1068-K1252
BoNT/F1	SEQ ID NO: 19	M1-R435	A440-I866	K867-P1085	D1086-N1278
BoNT/F2	SEQ ID NO: 20	M1-R435	Q440-I866	K867-P1088	D1089-E1280
BoNT/F3	SEQ ID NO: 20	M1-R435	Q440-I866	K867-P1088	D1089-E1279
BoNT/F4	SEQ ID NO: 21	M1-R435	A440-I866	K867-P1085	D1086-E1277
BoNT/F5	SEQ ID NO: 22	M1-K434	P440-I863	K864-P1085	D1086-E1277

BoNT/F6	SEQ ID NO: 19	M1-R435	A440-1866	K867-P1088	D1089-E1275
BoNT/F7	SEQ ID NO: 23	M1-K427	N432-1857	I858-P1076	D1077-E1268
BoNT/G	SEQ ID NO: 24	M1-K442	S447-1865	S866-S1086	S1087-E1297
TeNT	SEQ ID NO: 25	M1-R449	T456-K883	S884-L1109	S1110-D1315

Debe entenderse que las definiciones y explicaciones de los términos anteriores y siguientes se aplican mutatis mutandis para todos los aspectos descritos en esta memoria descriptiva a menos que se indique lo contrario.

5 El polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria es adecuado para diversas aplicaciones. Una aplicación comercialmente relevante es su uso en la producción de neurotoxinas terapéuticas, tales como aquellas aisladas de *C. botulinum*. Actualmente, los cultivos celulares de *C. botulinum* utilizados para la preparación de preparados disponibles comercialmente de neurotoxina botulínica están contaminados con cantidades significativas de neurotoxina parcialmente procesada y/o sin procesar, las cuales perjudican negativamente, es decir, reducen la actividad específica de estas composiciones farmacéuticas. Utilizando el polipéptido proteolíticamente activo o  
10 activado descrito en la presente memoria, por ejemplo después de la lisis de *C. botulinum*, ahora será posible tratar composiciones que comprendan neurotoxina sin procesar y/o parcialmente procesada y, de este modo, convertir estos contaminantes en neurotoxina completamente procesada. En consecuencia, los productos comerciales pueden proporcionarse con una mayor actividad específica de la neurotoxina, en donde se puede reducir la cantidad total de proteína bacteriana, reduciendo aún más el riesgo de formación de anticuerpos del paciente.

15 En la presente memoria se describe una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente invención y, opcionalmente, elementos reguladores. El término "elementos reguladores", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a elementos reguladores de la expresión génica, incluyendo la transcripción y la traducción, e incluye elementos tales como caja TATA, promotor, potenciador, sitio de unión a ribosomas, secuencia Shine-Dalgarno, región IRES, señal de poliadenilación, estructura de protección de terminales y similares. Dicho elemento regulador puede comprender uno o más elementos reguladores heterólogos o uno o más elementos reguladores homólogos. Un "elemento regulador homólogo" es un elemento regulador de una célula de tipo nativo, de la cual se deriva la molécula de ácido nucleico de la presente invención, que está implicada en la regulación de la expresión génica de la molécula de ácido nucleico o el polipéptido en dicha célula de tipo nativo.  
20 En la presente memoria se describen moléculas de ácido nucleico que comprenden elementos reguladores heterólogos. El término "elemento regulador heterólogo" es un elemento regulador que no está implicado en la regulación de la expresión génica de la molécula de ácido nucleico o el polipéptido en dicha célula de tipo nativo. También se abarcan elementos reguladores para la expresión inducible, tales como promotores inducibles. La molécula de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, hnRNA, mRNA, RNA, DNA, PNA, LNA y/o moléculas de ácido nucleico modificadas. La molécula de ácido nucleico puede ser circular, lineal, integrada en un genoma o episomal.  
30 También se incluyen concatémeros que codifican proteínas de fusión que comprenden tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez polipéptidos de la presente invención. Además, la molécula de ácido nucleico puede contener secuencias que codifican secuencias señal para el transporte intracelular tales como señales para el transporte a un compartimento intracelular o para el transporte a través de la membrana celular.

35 Se enseña un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria. Un vector puede ser adecuado para la expresión *in vitro* y/o *in vivo* del polipéptido descrito en la presente memoria. El vector puede ser un vector para la expresión génica transitoria y/o estable. En la presente memoria se describe un vector que comprende además elementos reguladores y/o marcadores de selección. En la presente memoria se describe un vector de origen viral, de origen fago o de origen bacteriano.

40 En la presente memoria se describe una célula que comprende la molécula de ácido nucleico o el vector enseñado en la presente memoria. El término "célula", tal y como se utiliza en la presente memoria, abarca células procarióticas y/o eucariotas adecuadas para expresar dicha molécula de ácido nucleico o dicho vector y, en particular, el polipéptido descrito en la presente memoria. Dicha célula puede ser una célula huésped que no expresa el polipéptido descrito en la presente memoria o un homólogo del mismo. El término "homólogo" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1. Sin embargo, también se describen en la presente memoria células, en particular células de tipo nativo, que expresan el polipéptido descrito en la presente memoria o un homólogo del mismo.  
45 La célula descrita en la presente memoria puede seleccionarse de *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* y *C. tetani*. La célula puede ser *C. botulinum* de serotipo A, B o F. La célula puede ser la cepa Hall (ATCC 3502) de *C. botulinum*. La célula puede ser la cepa ATCC 19397 productora de BoNT/A, también conocida como NCTC 4587 y NCTC 7272 de *C. botulinum*. La célula puede ser la cepa NCTC 2916 de *C. botulinum* productora de BoNT/A. Dicha célula puede ser las cepas Kyoto-F y Mauritius/NCTC 9837 de *C. botulinum* productoras de BoNT/A2. Dicha célula puede ser la cepa Loch Maree/NCTC 2012 de *C. botulinum* productora de BoNT/A3 A254. Dicha célula puede ser la cepa CDC657  
50

y B de *C. botulinum* productora de BoNT/A4. Dicha célula puede ser la cepa H04402 065 de *C. botulinum* productora de BoNT/A5 y B3'. Dicha célula puede ser la cepa Okra/NCTC 7273 de *C. botulinum* productora de BoNT/B1. Dicha célula puede ser la cepa CDC4013/NCTC 12265 de *C. botulinum* productora de BoNT/B y F. Dicha célula puede ser la cepa Langeland/NCTC 10281 de *C. botulinum* productora de BoNT/F1. Dicha célula puede ser *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium acetobutylicum*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. thermoproteolyticus*, *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli* o una célula de levadura. El polipéptido descrito en la presente memoria puede modificarse dentro de la célula (es decir, glicosilado, fosforilado, procesado por proteasas, etc.). La modificación también incluye la adición de cofactores no proteicos, incluyendo iones metálicos. En la presente memoria se describen las células que comprenden el polipéptido proteolíticamente inactivo descrito anteriormente, cualquier producto polipeptídico intermedio, así como el polipéptido proteolíticamente activo final descrito en la presente memoria. También se describen en la presente memoria células que comprenden un inductor de la expresión del polipéptido descrito en la presente memoria. Dicho inductor de la expresión puede ser una molécula de ácido nucleico o un polipéptido o una entidad química, incluyendo una pequeña entidad química, que tiene el efecto de aumentar la cantidad o actividad del polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria en cultivos celulares o lisados de los mismos. El inductor de la expresión puede, por ejemplo, aumentar la transcripción o traducción de una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido descrito en la presente memoria. Alternativamente, el inductor de la expresión puede ser un compuesto capaz de activar el polipéptido proteolíticamente inactivo SEQ ID NO:2 o un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:2. En la presente memoria se describe una célula que comprende un inductor que es un polipéptido proteolíticamente activo capaz de eliminar restos de aminoácidos inhibidores del extremo N-terminal de dicho polipéptido. El inductor puede expresarse, por ejemplo, mediante medios recombinantes conocidos por el experto en la técnica. Alternativamente, el inductor puede aislarse de una célula, por ejemplo, una célula clostridial.

En la presente memoria se enseña el uso de la molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria para la fabricación del polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria.

Un método para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente activo, que comprende las etapas de: (a) sintetizar químicamente o traducir a partir de una secuencia de nucleótidos un polipéptido, que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1; y (b) purificar el polipéptido de la etapa (a.) se describe en la presente memoria.

El término "síntesis química" significa sintetizar polipéptidos por medios químicos. Dichos métodos se revisan, por ejemplo, en Nilsson et al., Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2005. 34:91-118. El término "purificar el polipéptido" significa eliminar de una mezcla que comprende el polipéptido descrito en la presente memoria compuestos distintos de dicho polipéptido. El término también significa eliminar el polipéptido descrito en la presente memoria de una mezcla que comprende compuestos distintos de dicho polipéptido. El término puede significar separar el polipéptido proteolíticamente activo de su precursor proteolíticamente inactivo.

El ácido nucleico puede traducirse en una célula o en un sistema sin células. El experto en la materia dispone de varios sistemas para la traducción sin células. En la presente memoria se describe la traducción en un sistema de traducción de proteínas sin células que comprende lisado de reticulocitos de conejo, lisado de germen de trigo, lisado de *E. coli* u otros lisados celulares, por ejemplo lisados generados a partir de *C. botulinum* y similares. También se describe en la presente memoria la traducción del polipéptido descrito en la presente memoria a partir de la secuencia de nucleótidos o el vector descrito en la presente memoria. La transcripción puede estar regulada o controlada por uno o más elementos reguladores heterólogos o por elementos reguladores homólogos. También se describe en la presente memoria la traducción en una célula de tipo nativo, es decir, una célula aislada de la naturaleza, tal como cualquier aislado conocido de *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* y *C. tetani*. Dicha célula puede ser la cepa Hall de *C. botulinum* (ATCC 3502). El experto dispone de diversos medios y métodos estándar para introducir una molécula de ácido nucleico o un vector en la célula y para expresar el polipéptido descrito en la presente memoria como proteína recombinante en una célula. Además, el experto conoce muchas técnicas estándar para aislar polipéptidos a partir de células o lisados celulares o de sistemas de expresión sin células (por ejemplo, Recombinant DNA Principles and Methodologies, J. Green, Marcel Dekker Inc., 1998; The Condensed Protocols: From Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al, Cold Spring Harbor Laboratory, 2006; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 2000). Cualquiera de estos medios y métodos se puede utilizar en los métodos descritos en la presente memoria.

El primer polipéptido descrito en la presente memoria puede traducirse a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido proteolíticamente activo. SEQ ID NO: 26 es un ejemplo de dicha molécula de ácido nucleico. Alternativamente, dicha molécula de ácido nucleico puede codificar un polipéptido precursor que es proteolíticamente inactivo pero que puede convertirse en el polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. SEQ ID NO: 27 es un ejemplo de dicha molécula de ácido nucleico. El precursor proteolíticamente inactivo también se denomina "BoNTHhidrolasa inactiva", abreviado iBH. Este polipéptido proteolíticamente inactivo puede, por ejemplo, activarse durante o después de la traducción o poniendo en contacto, por ejemplo, dicho polipéptido proteolíticamente inactivo con una proteasa capaz de eliminar los restos de aminoácidos inactivantes en el extremo N-terminal del polipéptido proteolíticamente inactivo. Un ejemplo de un polipéptido proteolíticamente inactivo es el polipéptido representado por SEQ ID NO: 2. Otro ejemplo es un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene

al menos un 50 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 2. El término "restos de aminoácidos inactivantes en el extremo N-terminal" en un aspecto se refiere a los primeros 248 restos de aa de dicho polipéptido. Este término puede referirse a un fragmento de hasta restos de 10aa, 50aa, 100aa, 150aa, 200aa, 250aa de dicho polipéptido. Cualquiera de estos polipéptidos es útil en el método para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. Se aísla, por ejemplo, una proteasa capaz de eliminar los restos de aminoácidos inactivantes del extremo N-terminal de este polipéptido, por ejemplo, de *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium baratii* y *Clostridium tetani* se describe en la presente memoria. En la presente memoria se describe una proteasa capaz de eliminar dicho aminoácido inactivante proporcionando un lisado fraccionado o no fraccionado de dichas células. Los restos de aminoácidos inactivantes se pueden eliminar poniendo en contacto el polipéptido proteolíticamente inactivo con dicho lisado e incubando hasta que el polipéptido proteolíticamente inactivo se transforme en el polipéptido proteolíticamente activo.

En la presente memoria se describe un método en donde el polipéptido se traduce en una célula. La célula puede ser una célula procariótica o eucariota. En la presente memoria se describe una célula seleccionada de *E. coli*, *B. subtilis* o levadura. También se describe en la presente memoria la traducción del polipéptido descrito en la presente memoria en una célula de tipo nativo, es decir, una célula aislada de la naturaleza, tal como cualquier aislado conocido de *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium baratii* y *Clostridium tetani*. Dicha célula puede ser la cepa Hall de *C. botulinum* (ATCC 3502). Dicha célula puede ser la célula descrita anteriormente en la presente memoria.

Los productos de traducción obtenidos mediante el método pueden purificarse por diversos medios, todos los cuales son conocidos por el experto en la técnica (por ejemplo, Recombinant DNA Principles and Methodologies, J. Green, Marcel Dekker Inc., 1998; The Condensed Protocols: From Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al, Cold Spring Harbor Laboratory, 2006; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 2000). Los métodos típicos de purificación del polipéptido descrito en la presente memoria pueden implicar el giro del lisado celular, la precipitación de proteínas con sulfato amónico, la resuspensión de proteínas, la centrifugación de las proteínas resuspendidas, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de exclusión por tamaño, la cromatografía de interacción hidrófoba y similares. Pueden resultar útiles varias combinaciones de dichas etapas, en diferente orden, para purificar el polipéptido. En los Ejemplos se describe un método para purificar el polipéptido.

En una descripción, la etapa de purificación comprende la unión del polipéptido a un soporte sólido. El término "soporte sólido" se refiere a una matriz que abarca, por ejemplo, sílice, dextrano reticulado, poliacrilamida reticulada o agarosa reticulada y similares. También se incluyen polipéptidos particulares, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, polietilenglicol (PEG), dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita. Un soporte sólido puede ser una matriz de polisacárido seleccionada del grupo que consiste en sefarsa, sefadex, agarosa, sefacel, microcelulosa y perlas de alginato. Dicho soporte sólido puede consistir en perlas de vidrio y/o matrices polipeptídicas.

En una descripción, el soporte sólido está unido al anticuerpo descrito en la presente memoria. El término "unido" significa en una descripción unido de manera estable o asociado de manera estable. En otra descripción, unido incluye interacciones tales como enlaces indirectos o directos, no reversibles o reversibles, físicos y químicos, electrostáticos y/o covalentes. En una descripción, el anticuerpo está unido covalentemente, ya sea directamente o mediante una molécula enlazadora, al soporte sólido. El anticuerpo puede unirse a dicho soporte sólido mediante un enlazador, que incluye compuestos moleculares pequeños y moléculas enlazadoras peptídicas (o polipeptídicas). El soporte sólido puede tener prácticamente cualquier configuración o disposición estructural posible siempre que el anticuerpo acoplado sea capaz de unirse a su antígeno. Así, la matriz o soporte sólido puede ser esférico, como en una perla, o cilíndrico, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o en la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser irregular o plana, tal como una lámina o una tira de prueba.

Dicho anticuerpo unido al soporte sólido se puede utilizar, por ejemplo, en un método de fabricación o en un método de diagnóstico. Dicho método de fabricación puede comprender una etapa de cromatografía de afinidad, en donde dicha cromatografía de afinidad se basa en un anticuerpo unido a un soporte sólido. Dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. Dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido proteolíticamente inactivo descrito en la presente memoria.

En la presente memoria se describe un método para fabricar el polipéptido proteolíticamente activo que comprende purificar el polipéptido a partir de una mezcla que contiene componentes adicionales. La purificación puede basarse, por ejemplo, en la polaridad, carga eléctrica y tamaño. Por lo tanto, el método puede comprender una o más etapas de separación seleccionadas del grupo que consiste en: HPLC de fase normal, HPLC de fase reversa, cromatografía de interacción hidrófila (HILIC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), incluyendo la cromatografía de intercambio aniónico y la cromatografía de intercambio catiónico, la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y la cromatografía por permeación en gel (GPC).

En la presente memoria se describe una purificación que comprende las etapas de: (a) separación mediante cromatografía de intercambio aniónico; (b) separación mediante cromatografía de exclusión por tamaño; (c) separación mediante cromatografía de interacción hidrófoba; y (d) separación mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

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

5 En la presente memoria se describe una composición que comprende el polipéptido proteolíticamente activo. Usando el método descrito en la presente memoria, es posible fabricar un polipéptido proteolíticamente activo, que está sustancialmente libre de polipéptido proteolíticamente inactivo. En otras palabras, el método proporciona un polipéptido proteolíticamente activo y una composición que no comprende contaminación sustancial con la proteína precursora inactiva del polipéptido. Se considera que una composición no contiene contaminación sustancial o que está sustancialmente libre de polipéptido precursor proteolíticamente inactivo si, usando un método de detección basado en la transferencia Western, se puede detectar menos del 5% de precursor proteolíticamente inactivo, en donde dicho 5% se refiere a la cantidad de precursor proteolíticamente inactivo en relación con la suma de polipéptido proteolíticamente activo e inactivo. Dicha composición puede ser sustancialmente pura y comprender al menos un 50% de polipéptido proteolíticamente activo, en donde dicho 50% se refiere a la cantidad de precursor proteolíticamente activo en relación con la cantidad total de proteína contenida en la composición. Dicha composición sustancialmente pura puede comprender al menos el 75%, 80%, 90% o al menos el 98% de polipéptido proteolíticamente activo.

15 En la presente memoria se describe un polipéptido que se puede obtener a partir del método para la fabricación de un polipéptido proteolíticamente activo tal y como se describe en la presente memoria anteriormente y como se ilustra en los Ejemplos. En la presente memoria se describe un polipéptido proteolíticamente activo que es un polipéptido proteolíticamente activo con la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 1. En la presente memoria se describe un polipéptido proteolíticamente activo que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1. En la presente memoria se describe un polipéptido proteolíticamente activo que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1. El término "polipéptido que se puede obtener", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere en un aspecto a un polipéptido que se traduce a partir del ácido nucleico descrito en la presente memoria. El polipéptido puede sufrir posteriormente modificaciones postraduccionales tales como acilación, alquilación, amidación, adición de aminoácidos, eliminación de aminoácidos, glicosilación, oxidación, S-glutacionilación, fosforilación, sulfatación, procesamiento proteolítico y similares. Además, el polipéptido puede unirse a un ion metálico tal como  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ . Preferiblemente, dicho ion metálico es  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$ .

25 En la presente memoria se enseña un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido descrito en la presente memoria. El término "anticuerpo" tal y como se usa en la presente memoria abarca un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo humano, humanizado, primatizado o quimerizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo sintético, derivados modificados química o enzimáticamente, un fragmento de uno cualquiera de dichos anticuerpos o aptámeros que consiste en ácidos nucleicos naturales y/o modificados químicamente. Los fragmentos de dichos anticuerpos incluyen fragmentos  $\text{F}(\text{ab}')_2$ ,  $\text{F}(\text{ab})$ ,  $\text{Fv}$  o  $\text{scFv}$  o derivados modificados química o enzimáticamente de uno cualquiera de estos fragmentos.

35 En una descripción, el anticuerpo se unirá específicamente al polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria o su precursor proteolíticamente inactivo. Un anticuerpo que es específico para el polipéptido proteolíticamente activo reacciona de forma cruzada con el polipéptido proteolíticamente inactivo descrito en la presente memoria. En la presente memoria se describe un anticuerpo capaz de discriminar entre el polipéptido proteolíticamente activo y su precursor inactivo. En otra descripción, el epítipo para el cual dicho anticuerpo es específico se localiza en una región de aminoácidos que está presente en el polipéptido proteolíticamente inactivo pero no en el polipéptido proteolíticamente activo. Por ejemplo, dicho epítipo puede ser un epítipo de una región polipeptídica que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 248 de un polipéptido que comprende la secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 2.

45 En la presente memoria se describe un epítipo formado por restos de aminoácidos localizados en el extremo N-terminal del aminoácido 249 de un polipéptido que comprende la secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 2. Dicho epítipo puede eliminarse del polipéptido proteolíticamente inactivo descrito en la presente memoria mediante procesamiento proteolítico.

50 En una descripción, el epítipo para el cual el anticuerpo es específico es un epítipo localizado en el extremo N-terminal de un polipéptido que comprende la secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1. El término "N-terminal", tal y como se usa en esta descripción, se refiere a una región del polipéptido que comprende los 50 restos de aminoácidos N-terminales de dicha secuencia polipeptídica, preferiblemente los 25 restos de aminoácidos N-terminales de dicha secuencia polipeptídica. En una descripción particular, el término se refiere a los 14 restos de aminoácidos N-terminales. El término "epítipo", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere al determinante antigénico que es reconocido por el anticuerpo descrito en la presente memoria. En una descripción, el epítipo es un epítipo lineal, en otra descripción el epítipo es un epítipo conformacional. En una descripción particular, el determinante antigénico consiste en un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal del polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria, en donde dicho péptido puede tener una longitud de aminoácidos de 7 a 14, preferiblemente de 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 restos de aminoácidos.

El término "se une específicamente" o "que se une específicamente a" en una descripción significa que el anticuerpo no reacciona de forma cruzada en un grado significativo con otros epítomos ni en el polipéptido descrito en la presente memoria ni en otros polipéptidos en general. La especificidad del epítomo es una característica importante del anticuerpo. La especificidad del anticuerpo con respecto al polipéptido proteolíticamente activo versus proteolíticamente inactivo será, en un aspecto, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %. La unión específica puede probarse mediante diversas técnicas bien conocidas que incluyen, por ejemplo, estudios de competencia. Otra característica importante es la sensibilidad del anticuerpo. La sensibilidad será, en una descripción, tal que esté unido al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % del epítomo comprendido por una muestra. La sensibilidad puede probarse mediante técnicas bien conocidas. Los expertos en la técnica podrán determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación de rutina. Las técnicas convencionales para estudios de unión incluyen radioinmunoensayo, ELISA, diálisis de equilibrio, microcalorimetría isotérmica, ensayos BIACORE® (resonancia de plasmón de superficie, SPR) u otros métodos de adsorción de superficie. El sistema BIACORE® SPR mide la interacción anticuerpo-antígeno. La respuesta del SPR refleja un cambio en la concentración de masa en la superficie del detector a medida que se unen o disocian. Basado en SPR, las mediciones de BIACORE en tiempo real® monitorean las interacciones directamente a medida que ocurren, véase BIAApplications Handbook, version AB (reprinted 1998), BIACORE® número de código: BR-1001-86; BIAtechnology Handbook, version AB (reprinted 1998), BIACORE® número de código: BR-1001-84. Las propiedades de unión, tales como la sensibilidad de un anticuerpo de la presente invención, pueden determinarse, en principio, mediante estudios de unión utilizando un antígeno inmovilizado (el ligando) presentado sobre una superficie del sensor. El anticuerpo a analizar (el analito) se proporcionará en la fase móvil, es decir, en una solución. En algunos casos, el antígeno se une indirectamente a la superficie mediante la unión a otra molécula inmovilizada que se denomina molécula capturadora. Cuando el anticuerpo se inyecta en un pulso discreto a través de la superficie con los antígenos inmovilizados, se pueden subdividir esencialmente tres fases: (i) Asociación del anticuerpo con el antígeno durante la inyección de la muestra; (ii) Equilibrio o estado estacionario durante la inyección de la muestra, donde la tasa de unión del anticuerpo se equilibra mediante la disociación del complejo anticuerpo-antígeno; (iii) Disociación del anticuerpo de la superficie durante el flujo del tampón. Se entenderá que dicho ensayo se puede realizar alternativamente con anticuerpos inmovilizados a investigar y una solución que contiene antígeno como fase móvil. Las fases de asociación y disociación proporcionan información sobre la cinética de la interacción analito-ligando ( $k_a$  y  $k_d$ , las tasas de formación y disociación de complejos,  $k_d/k_a = K_D$ ). La fase de equilibrio proporciona información sobre la afinidad de la interacción analito-ligando ( $K_D$ ). El anticuerpo puede tener una  $K_D$  de menos de 0,5  $\mu\text{M}$ , en otra descripción menos de 0,05  $\mu\text{M}$  y, en otra descripción, menos de 0,02  $\mu\text{M}$ .

El anticuerpo al que se hace referencia en la presente memoria puede fabricarse utilizando métodos que se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane, 1988 (Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988). Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante las técnicas descritas originalmente en Kohler & Milstein, 1975 (Kohler & Milstein 1975, Nature 256: 495) y Galfre & Milstein, 1981 (Galfre & Milstein 1981, Meth Enzymol 73: 3). Dichas técnicas comprenden la fusión de células de mieloma de ratón con células de bazo derivadas de mamíferos inmunizados. Los anticuerpos se pueden mejorar aún más mediante técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la resonancia de plasmón de superficie empleada en el sistema BIACORE® se puede utilizar para aumentar la eficacia de los anticuerpos de fagos que se unen al epítomo antes mencionado dentro del polipéptido de la presente invención (cf. Schier et al., 1996, Human Antibodies Hybridomas 7: 97; Malmberg et al., 1995, J. Immunol Methods 183: 7).

En la presente memoria se describe un anticuerpo producido usando un péptido que comprende o consiste en el epítomo mencionado anteriormente. El péptido se puede producir, por ejemplo, sintéticamente o por expresión recombinante. Alternativamente, el anticuerpo se puede producir aplicando el polipéptido proteolíticamente activo o inactivo de origen natural descrito en la presente memoria. En el último caso, debe entenderse que los anticuerpos resultantes se probarán adicionalmente para determinar su especificidad con respecto al polipéptido descrito en la presente memoria. En la presente memoria se describe un anticuerpo monoclonal producido mediante el uso de un polipéptido descrito en la presente memoria que puede tratarse con un detergente para que el epítomo esté disponible inmunológicamente. Sin embargo, se entenderá que en el caso en que el anticuerpo se dirija contra un epítomo conformacional, no se llevará a cabo dicho tratamiento con detergente. En dicho proceso también se pueden aplicar agentes de estimulación inmunológica tales como la hemocianina de lapa californiana (KLH), especialmente cuando se utiliza un péptido sintético.

El anticuerpo se puede utilizar, por ejemplo, para cromatografía de afinidad, inmunoprecipitación e inmunolocalización del polipéptido de la presente invención, así como para la monitorización de la presencia de dicho polipéptido en muestras o en organismos recombinantes. Además, el anticuerpo se puede utilizar en un método de detección o en un método de diagnóstico. En una descripción particular, el anticuerpo se utiliza en la transferencia de Western o ELISA. Además, el anticuerpo se puede utilizar en aplicaciones terapéuticas. En particular, el anticuerpo se puede usar para inhibir la actividad del polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. Por lo tanto, el anticuerpo también puede tener diversas aplicaciones terapéuticas que se describen a continuación en la presente memoria.

En la presente memoria se describe el uso del polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria en un método para procesar proteolíticamente un polipéptido. Un método para la fabricación de un polipéptido procesado proteolíticamente, que comprende la etapa de poner en contacto: (a) un primer polipéptido, siendo dicho primer polipéptido el polipéptido descrito en la presente memoria, con (b) un segundo polipéptido, siendo dicho segundo polipéptido susceptible a proteólisis por dicho primer polipéptido, en donde dicho contacto da como resultado un procesamiento proteolítico de dicho segundo polipéptido en al menos dos productos de escisión.

El uso de Lys-N o Lys-C y arginil endopeptidasa (endoproteinasa Arg-C, LeR) de *Lysobacter enzymogenes* (ATCC 29487) (Wright DS, Graham LD, Jennings PA. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Dec 22; 1443 (3): 369-74) se describe en la presente memoria. En la presente memoria se describe el uso de plasmína y/o ompina (OmpT), una serina proteasa unida a membrana que escinde a motivos (Arg/Lys)-(Arg/Lys) (K. Sugimura and T. Nishihara. *J. Bacteriol.* 170 (1988), pp. 5625-5632) en un método para procesar proteolíticamente CNT como BoNT/A. En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la fabricación de un polipéptido procesado proteolíticamente, que comprende la etapa de poner en contacto: (a) un primer polipéptido, siendo dicho primer polipéptido Lys-C o Lys-N, con (b) un segundo polipéptido, siendo dicho segundo polipéptido susceptible a la proteólisis por dicho primer polipéptido, en donde dicho contacto da como resultado el procesamiento proteolítico de dicho segundo polipéptido en al menos dos productos de escisión, y en donde el segundo polipéptido es una BoNT/F monocatenaria y en donde dicho primer polipéptido hidroliza la BoNT/F monocatenaria para producir una BoNT/F bicatenaria activa. El término "Lys-C" se refiere a la serina endoproteinasa Lys-C de 33 kDa de *Lysobacter enzymogenes* (Lysyl endopeptidasa, LeK, Genbank ace. Q7M135) que escinde específicamente enlaces peptídicos en el extremo C-terminal de lisina o un homólogo de la misma que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia. El término "Lys-N" se refiere a la metaloendopeptidasa Lys-N aislada de *Grifola frondosa* y *Pleurotus ostreatus* (Nonaka T et al., 1997, *J Biol Chem*. 272:30032-30039; Nonaka T et al, 1998, *J Biochem*. 124:157-162; Hori T et al., 2001, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 57:361-368). El término también abarca homólogos de dicha proteasa que tienen al menos un 60 % de identidad de secuencia.

En la presente memoria se describe un método utilizado, por ejemplo, para fabricar neurotoxina procesada proteolíticamente (CNT) o neurotoxina botulínica (BONT). El término "BoNT", tal y como se utiliza en todas partes, significa neurotoxina botulínica y se refiere a neurotoxina que se obtiene de *C. botulinum* tal como BoNT de serotipo A, B, C1, D, E, F o G. También abarcado por el término "CNT" y "BoNT" es una neurotoxina recombinante y modificada que comprende una o más modificaciones que incluyen modificación química o modificación genética. El término "modificación genética" significa eliminación, sustitución o adición de uno o más restos de aminoácidos. Usando el método de la presente invención, ahora es posible obtener composiciones de neurotoxina con una contaminación significativamente menor por neurotoxina sin procesar o parcialmente procesada, ya que esos contaminantes se procesan eficazmente en neurotoxina bicatenaria. En un aspecto, la bicatenaria (BoNT/F) es una bicatenaria nativa (BoNT/F), en donde el extremo C-terminal de la cadena ligera y el extremo N-terminal de la cadena pesada son idénticos a los correspondientes (BoNT/F) bicatenarios procesados completamente aislados de clostridios de tipo nativo.

El término "poner en contacto", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a poner al menos dos compuestos diferentes en proximidad física para permitir la interacción física y/o química de dichos compuestos. Según el método de esta invención, dichos dos compuestos diferentes son, en un aspecto, el primer y el segundo polipéptido que están comprendidos en la solución. El contacto se lleva a cabo en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la interacción del primer y segundo polipéptido. El término "polipéptido procesado proteolíticamente" tal y como se usa en la presente memoria se refiere en un aspecto a un polipéptido, cuya cadena polipeptídica se ha hidrolizado o escindido en uno o más enlaces peptídicos. En otro aspecto, el término se refiere a un polipéptido que se ha escindido proteolíticamente por una endoproteinasa o endopeptidasa. En otro aspecto, el término se refiere a un polipéptido que se ha escindido en un grado de al menos el 50 %. En otro aspecto, dicho polipéptido procesado proteolíticamente es el segundo polipéptido. En otro aspecto, al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % se procesa proteolíticamente.

El término "segundo polipéptido", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere al sustrato de dicho primer polipéptido. El término "ser susceptible a la proteólisis" se refiere a una característica o requisito del segundo polipéptido y se usa en la presente memoria con el significado de que el segundo polipéptido es proteolíticamente escindible por dicho primer polipéptido. En otras palabras, el término "ser susceptible a la proteólisis" significa que el segundo polipéptido comprende un sitio de escisión y reconocimiento de proteasa que le permite funcionar como un sustrato del primer polipéptido. El "segundo polipéptido" es un sustrato del primer polipéptido y se procesa proteolíticamente en dos o más productos de escisión. Usando el ensayo descrito en la presente memoria anteriormente, el experto puede probar si un polipéptido dado es un sustrato del primer polipéptido y, por tanto, un "segundo polipéptido" según la definición de la presente invención. El término "al menos dos productos de escisión" incluye, por ejemplo, hasta dos, tres, cuatro, cinco y hasta seis productos de escisión.

Este método se puede usar, por ejemplo, para preparar una composición farmacéutica que comprende neurotoxina clostridial o para generar fragmentos de polipéptidos usados en un método de espectrometría de masas. El primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden ponerse en contacto en diversas etapas en el proceso de fabricación de polipéptido procesado proteolíticamente. En un aspecto, la etapa de poner en contacto el primer polipéptido y el segundo polipéptido es dentro de una célula. En un aspecto particular de esta realización, el primer y el segundo polipéptido se expresan en dicha célula.

En otro aspecto, dicha etapa de contacto es en un lisado celular o en un lisado celular purificado. Este aspecto abarca la adición del primer polipéptido al lisado o al lisado purificado. El primer polipéptido se puede añadir en diversas etapas durante la purificación del segundo polipéptido del lisado celular. Por ejemplo, el primer polipéptido se puede añadir antes o después de: precipitación de proteínas, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y/o cromatografía de exclusión por tamaño. Además, también se abarca la adición del primer polipéptido a una composición farmacéutica. En este aspecto, el polipéptido de la presente invención se usa, por ejemplo, para escindir proteolíticamente el segundo polipéptido, por ejemplo, para activar un segundo polipéptido que es un agente terapéutico contenido en la composición farmacéutica. También se prevé la administración del primer polipéptido a un sujeto, con el fin de procesar proteolíticamente un segundo polipéptido en el sujeto. La administración también incluye la coadministración del primer y segundo polipéptido. Este método también abarca una etapa de incubación en condiciones y durante un tiempo suficiente para escindir el segundo polipéptido. En un aspecto, las condiciones pueden comprender añadir un tampón seleccionado del grupo que consiste en Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 o PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Las condiciones de tampón preferidas incluyen Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. El "tiempo suficiente para escindir" se puede determinar usando el ensayo descrito anteriormente en la presente memoria. En un aspecto, dicho "tiempo suficiente para escindir" depende del grado de escisión que debe tener el polipéptido procesado proteolíticamente o una composición que lo comprende. En un aspecto, el método comprende una etapa de incubar el primer y el segundo polipéptido durante al menos 30 min, 60 min, 120 min o al menos 240 min. En otro aspecto, el primer y segundo polipéptido se incuban durante hasta 30 min, 60 min, 120 min, 240 min, 480 min o hasta 600 min. En otro aspecto, el método comprende una etapa de incubar el primer y el segundo polipéptido a 4°C o a 37°C. En otro aspecto, el método comprende una etapa de incubar durante hasta 1 h, hasta 2 h, 4 h, 6 h, 10 h o hasta 16 h.

En la presente memoria se describe una cadena polipeptídica de dicho segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 4 a 25. En la presente memoria se describe una cadena polipeptídica de dicho segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 25 y en donde el segundo polipéptido se escinde en el extremo C-terminal a un resto de aminoácido básico dentro de dicha secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 25. Dichas secuencias representan secuencias de aminoácidos de sustratos conocidos del polipéptido proteolíticamente activo de la presente divulgación. Como se muestra en la presente memoria, dichos sustratos se escinden en el extremo C-terminal a un resto de aminoácido básico contenido en la secuencia; compárese la Tabla 1, columnas LC y H<sub>N</sub>. En la presente memoria se describe un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 4 a 10. En la presente memoria se describe un segundo polipéptido que es BoNT/A o un derivado del mismo, incluyendo, por ejemplo, el polipéptido de SEQ ID NO: 3 y derivados del mismo. El término "derivado", tal y como se usa con respecto a este y otros aspectos de la invención, comprende mutaciones de aminoácidos tales como adición, sustitución, eliminación o truncamiento de uno o más restos de aminoácidos.

En la presente memoria se describe un segundo polipéptido que comprende un derivado de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 4 a 25, o de SEQ ID NO: 3, en donde dicho derivado tiene una o más mutaciones puntuales y/o uno o más restos de aminoácidos adicionales. En otro aspecto, dicho derivado tiene hasta 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, hasta 10, hasta 15 mutaciones puntuales. Utilizando el ensayo de actividad para determinar la actividad de proteasa, como se describe en la presente memoria, el experto puede determinar si un derivado dado es procesado por el polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. En la presente memoria se describe un derivado que contiene una mutación puntual que cambia un resto de aminoácido básico en un resto de aminoácido no básico. En la presente memoria se describe un derivado que tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NOs: 4 a 25. En la presente memoria se describe un derivado o un polipéptido que comprende el derivado que es un sustrato del primer polipéptido y es escindible proteolíticamente por el primer polipéptido. Un ejemplo típico es un derivado de SEQ ID NO: 3 que comprende, por ejemplo, una o más mutaciones puntuales en la cadena ligera o pesada.

En la presente memoria se describe un segundo polipéptido que comprende (a) una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 30 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 3 [(BoNT/A de ATCC 3502, acc. Genbank AAA23262)]; o (b) una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en neurotoxina tetánica, proteína de la cascada de coagulación Factor X o Protrombina (Factor II), enzimas digestivas del páncreas como tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína. Al menos el 30% significa al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 85%. La identidad de secuencia de dicha segunda secuencia polipeptídica que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 3 se puede determinar basándose en la posición de aminoácidos 420 a 466 de SEQ ID NO: 3, en otro ejemplo, dicha identidad de secuencia puede determinarse basándose en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 4 a 25. En la presente memoria se describe un segundo polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene, por ejemplo, al menos un 30 % de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica encontrada entre las posiciones de aminoácidos 420 a 466 de SEQ ID NO: 3 o al menos un 30 % de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 4 a 25. Un polipéptido según esta definición es, por ejemplo, obtenible a partir de *C. botulinum*, *C. tetani* o *C. sporogenes*. En la presente memoria se describe un segundo polipéptido que puede ser, por ejemplo, una neurotoxina natural tal como BoNT/A, B, C1, D, E, F o G o un derivado de la misma que comprende una o más mutaciones de aminoácidos tales como adición, sustitución, eliminación o truncamiento de uno o más restos de aminoácidos. Se abarcan, por ejemplo, derivados que carecen del, por ejemplo, dominio H<sub>c</sub> de la neurotoxina nativa o partes del mismo o derivados con otros

restos de aminoácidos que sustituyen el dominio H<sub>C</sub> de la neurotoxina, así como derivados con una cadena ligera adicional u otra molécula de carga proteica unida N-terminalmente a la cadena ligera de BoNT.

En otro aspecto, el segundo polipéptido puede contener restos de aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal o en una posición interna. Los restos de aminoácidos adicionales pueden estar flanqueados por uno o más sitios de escisión de proteasa. En otro aspecto, la secuencia de aminoácidos adicional funciona como una etiqueta detectable y/o permite la unión a un soporte sólido. Un ejemplo es una etiqueta de his o una etiqueta de GST. Otro ejemplo es la secuencia de aminoácidos VPPTPGSAWSHPQFEK que contiene la etiqueta de Strep, preferiblemente añadida al extremo C-terminal.

En la presente memoria se describe un segundo polipéptido que es un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica como se muestra en GenBank n°: CBZ04958.1, YP\_002805603.1, ZP\_02994746.1, YP\_001788403.1, YP\_001782718.1, ZP\_02616437.1, ZP\_02614241.1, YP\_001392361.1, YP\_001255575.1 o un homólogo del mismo que tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia.

En otro aspecto, la actividad biológica de dicho segundo polipéptido se modula mediante la escisión proteolítica. El experto sabe bien que la función de muchos polipéptidos puede modularse mediante procesamiento proteolítico. "Modulado" tal y como se usa en la presente memoria significa aumentado o disminuido, activado o inactivado. Por ejemplo, la actividad biológica de muchas neurotoxinas clostridiales aumenta o se desencadena procesando proteolíticamente una neurotoxina monocatenaria en una neurotoxina bicatenaria, en donde la neurotoxina bicatenaria está compuesta de una cadena polipeptídica ligera y una pesada, que están unidas covalentemente a través de un puente disulfuro. La actividad biológica de la neurotoxina abarca al menos tres actividades separadas: la primera actividad es una "actividad proteolítica" que reside en la cadena ligera de la neurotoxina y es responsable de hidrolizar el enlace peptídico de uno o más polipéptidos implicados en la regulación de la fusión de la membrana celular. Una segunda actividad es una "actividad de translocación", que reside en el extremo N-terminal de la cadena pesada de la neurotoxina procesada y está implicada en el transporte de la cadena ligera a través de la membrana lisosomal y en el citoplasma. Una tercera actividad es una "actividad de unión al receptor", que reside en el extremo C-terminal de la cadena pesada de la neurotoxina procesada y está implicada en la unión y absorción de la neurotoxina a una célula objetivo. En un aspecto preferido, el término actividad biológica tal y como se usa en la presente memoria significa actividad proteolítica. En un aspecto más preferido, el término significa actividad proteolítica aumentada.

La actividad biológica de la neurotoxina clostridial se puede medir mediante diversas pruebas, todas las cuales son conocidas por el experto en la técnica. Estas pruebas permiten determinar una o más de las actividades mencionadas anteriormente. Por ejemplo, el ensayo de LD<sub>50</sub> de ratón o el ensayo de hemidiafragma del nervio frénico (MPN) de ratón ex vivo como lo describen Pearce et al., 1994 (Pearce LB, Borodic GE, First ER, MacCallum RD (1994), Toxicol Appl Pharmacol 128: 69-77) y Habermann et al., 1980 (Habermann E, Dreyer F, Bigalke H. (1980), Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 311:33-40) permiten determinar el efecto tóxico de una determinada preparación de neurotoxina en un organismo vivo o una preparación neuromuscular aislada. Para establecer el efecto tóxico en un ensayo de LD<sub>50</sub>, la neurotoxina debe ser biológicamente activa en cada una de dichas tres actividades mencionadas anteriormente. Además, hay varios otros ensayos disponibles que permiten, por ejemplo, determinar si una neurotoxina o la cadena ligera de la neurotoxina es proteolíticamente activa. Dichos ensayos se basan, por ejemplo, en poner en contacto BoNT/A con SNAP-25. Alternativamente, se puede utilizar un péptido que represente el sitio de escisión de SNAP-25, en donde el péptido se puede marcar para facilitar la detección. En un aspecto preferido, la actividad biológica se determina utilizando el ensayo MPN descrito anteriormente en la presente memoria.

En la presente memoria se describe un primer polipéptido activado procesando proteolíticamente un polipéptido precursor inactivo, comprendiendo dicho polipéptido precursor inactivo una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 60% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 2. Esto se basa en la observación de que un polipéptido que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 2 es proteolíticamente inactivo, mientras que los truncamientos N-terminales del mismo son proteolíticamente activos. En la presente memoria se enseña el uso del polipéptido proteolíticamente inactivo en los métodos descritos en la presente memoria. El polipéptido proteolíticamente inactivo descrito en la presente memoria puede activarse, por ejemplo, eliminando un fragmento del extremo N-terminal o el extremo N-terminal completo que comprende los restos de aminoácidos 1 a 248 de SEQ ID NO: 2. En una descripción, el extremo N-terminal se elimina mediante una proteasa, en otra descripción, el extremo N-terminal se elimina mediante autoproteólisis de SEQ ID NO: 2. El 60% de identidad de secuencia se refiere a una alineación de secuencia con NT02CB1447 de longitud completa.

En otro aspecto, el método de la presente invención para la fabricación de un polipéptido procesado proteolíticamente comprende la etapa de purificar el segundo polipéptido procesado proteolíticamente o al menos uno o dos o más productos de escisión del mismo. La purificación de *C. botulinum* expresado en BoNT/A se puede hacer, por ejemplo, como se describe esencialmente en la técnica anterior (DasGupta 1984, Toxicon 22, 415; Sathyamoorthy 1985, J Biol Chemistry 260, 10461). En particular, la purificación de la neurotoxina puede contener una o más etapas de precipitación y extracción, una o más etapas de concentración y etapas cromatográficas distintas adicionales. La BoNT/A recombinante monocatenaria y su purificación se describen en la técnica anterior (Rummel et al., 2004, Mol Microbiol. 51:631-43).

En una realización preferida, la cepa de Clostridium es C. botulinum o un derivado de la misma. Para la fermentación, se puede usar el proceso descrito por DasGupta B. R. et al. en Toxicon, vol. 22, No. 3, p. 414 - 424, 1984. Así, se añaden un 0,5 % de extracto de levadura y un 0,6 % de pasta de levadura esterilizada en autoclave al 2 % del medio de N-Z-amina tipo A, y se ajustará un pH de 7,2 con la ayuda de NaOH 4 N, y el medio preparado de esta manera será posteriormente esterilizado en autoclave. A este medio se le puede añadir por separado glucosa esterilizada en autoclave (20% en peso por volumen), para llegar a una concentración final de glucosa del 0,5% en el medio. La incubación puede producirse, por ejemplo, a 37°C sin agitación, en donde la fermentación se interrumpe, por ejemplo, después de 96 horas. Está dentro del alcance de la presente invención que además de la fermentación discontinua descrita anteriormente también se pueda realizar una fermentación semidiscontinua, una fermentación discontinua repetida o una fermentación continua.

Después de la fermentación real y la separación del medio de fermentación de las células, el medio de fermentación puede sufrir una primera precipitación con el objetivo de eliminar proteínas grandes. La precipitación es preferiblemente una precipitación ácida. Los expertos en la técnica conocen las condiciones de reacción para dicha precipitación ácida. Normalmente se puede utilizar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 M para acidificar el sobrenadante hasta un pH de 3,5. La centrifugación se produce normalmente durante 20 minutos a 2400 x g a 4°C. El sedimento recibido mediante centrifugación se puede lavar con agua, preferiblemente repetidamente. Posteriormente, el sedimento se puede extraer con un tampón de ácido cítrico-citrato de trisodio 0,1 M, pH 5,5, por ejemplo, durante una hora. Posteriormente, se puede realizar una etapa de centrifugación adicional, por ejemplo, a 9800 x g durante 20 minutos a 4°C. Opcionalmente, el sedimento así obtenido puede extraerse nuevamente como se describió anteriormente. El sobrenadante de la extracción, y ambos sobrenadantes en caso de repetición de la extracción, pueden después someterse a precipitación con sulfato de protamina. La precipitación puede continuar durante la noche, por ejemplo, a 8°C. Posteriormente, el precipitado se puede centrifugar, por ejemplo, durante 20 minutos a 4°C y a 12000 x g. El sobrenadante de la centrifugación puede someterse a una precipitación tal como una precipitación con sulfato de amonio, mediante la cual se pueden eliminar otras proteínas más grandes. Después de la etapa de precipitación con sulfato amónico se puede añadir otra etapa de centrifugación y posteriormente el sedimento así obtenido se puede volver a disolver y, opcionalmente, someter a una diálisis. El extracto, que preferiblemente se dializa y vuelve a centrifugar, puede someterse a una sucesión de etapas cromatográficas con el objetivo de purificar la neurotoxina. Cada una de las etapas de la cromatografía sirve para eliminar contaminantes tales como el sulfato de protamina, el DNA restante, partes de proteínas más pequeñas y proteínas de tamaño mediano, así como las hemaglutininas del complejo proteico de la neurotoxina botulínica. Para este fin, en una realización preferida se pueden utilizar una o más etapas de cromatografía. Opcionalmente, el eluato de, por ejemplo, la última etapa de la cromatografía, se puede filtrar para reducir los gérmenes. Opcionalmente, el eluato se puede diluir antes de la filtración y se pueden añadir adyuvantes adecuados. Durante etapas posteriores se puede realizar otra filtración estéril después de la adición de los adyuvantes. En un aspecto, la filtración se lleva a cabo en recipientes de reacción que después pueden someterse a una etapa de liofilización.

En la presente memoria se describe una composición que se puede obtener mediante el método de la presente invención para la fabricación de un polipéptido procesado proteolíticamente. En la presente memoria se describe una composición que comprende una mezcla de un segundo polipéptido procesado y sin procesar, en donde dicha mezcla puede contener menos del 5%, 4%, 3%, 2% o menos del 1% del segundo polipéptido sin procesar. En la presente memoria se describe una composición en donde dicho segundo polipéptido es BoNT o un derivado del mismo. En la presente memoria se describe una BoNT, por ejemplo, seleccionada del grupo que consiste en BoNT de serotipo A, B, C, D, E, F y G, incluyendo un derivado de la misma. La composición puede ser por ejemplo, una composición líquida o sólida y puede contener uno o más vehículos, adyuvantes y/o excipientes.

En la presente memoria se describe un método para la fabricación de un medicamento, es decir, una composición farmacéutica, que comprende las etapas del método antes mencionado y la etapa adicional de formular la neurotoxina bicatenaria purificada como medicamento. En una descripción, dicho medicamento comprende una mezcla de un segundo polipéptido procesado y no procesado, en donde dicha mezcla contiene menos del 5% de un segundo polipéptido sin procesar. En la presente memoria se describe una mezcla que contiene menos del 4 %, 3 %, 2 % o menos del 1 % de segundo polipéptido sin procesar.

Se describen varios usos médicos de los compuestos descritos en la presente memoria:

Un polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria para su uso como un medicamento o en una composición farmacéutica.

Una composición descrita en la presente memoria para su uso como un medicamento o en una composición farmacéutica.

Un anticuerpo descrito en la presente memoria para su uso como un medicamento o en una composición farmacéutica.

Un inhibidor descrito en la presente memoria para su uso como un medicamento o en una composición farmacéutica.

Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido descrito en la presente memoria, el anticuerpo descrito en la presente memoria, la composición descrita en la presente memoria o el inhibidor descrito en la presente memoria.

El término "composición", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier composición formulada en forma sólida, líquida, aerosol (o gaseosa) y similares. Dicha composición comprende, por ejemplo, un compuesto terapéuticamente activo descrito en la presente memoria opcionalmente junto con compuestos auxiliares adecuados tales como diluyentes o vehículos o ingredientes adicionales. En una descripción, el compuesto terapéuticamente activo es el polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. Un compuesto terapéutico descrito en la presente memoria es el segundo polipéptido procesado proteolíticamente como se describe anteriormente en la presente memoria, tal como la neurotoxina bicatenaria. En la presente memoria se enseña un compuesto terapéuticamente activo que es el anticuerpo descrito en la presente memoria. En la presente memoria se enseña un compuesto terapéuticamente activo que es el inhibidor del polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria.

En este contexto, se distingue entre compuestos auxiliares, es decir, compuestos que no contribuyen a los efectos provocados por el compuesto descrito en la presente memoria tras la aplicación de la composición para su fin deseado, e ingredientes adicionales, es decir, compuestos que contribuyen a un efecto adicional o modulan el efecto del compuesto descrito en la presente memoria. Los diluyentes y/o vehículos adecuados dependen del fin para el que se va a utilizar la composición y de los demás ingredientes. El experto en la técnica puede determinar dichos diluyentes y/o vehículos adecuados sin más preámbulos.

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

El(los) diluyente(s) se selecciona de manera que no afecte la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank, además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos y no inmunogénicos y similares.

Una composición farmacéutica descrita en la presente memoria comprende la neurotoxina biológicamente activa obtenida mediante el método, opcionalmente, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. La neurotoxina activa puede estar presente en forma líquida o liofilizada. Dicho compuesto puede estar presente junto con glicerol, estabilizadores de proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA)) o estabilizadores no proteicos tales como polivinilpirrolidona o ácido hialurónico. La composición farmacéutica se puede administrar por vía tópica. La administración de fármacos utilizada convencionalmente se administra por vía intramuscular, subcutánea (cerca de las glándulas). Sin embargo, dependiendo de la naturaleza y el modo de acción de un compuesto, la composición farmacéutica también puede administrarse por otras vías. El polipéptido de neurotoxina bicatenaria es el ingrediente activo de la composición y, en un aspecto, se administra en formas de dosificación convencionales preparadas combinando el fármaco con vehículos farmacéuticos estándar según procedimientos convencionales. Estos procedimientos pueden implicar mezclar, granular y comprimir o disolver los ingredientes según sea apropiado para la preparación deseada. Se apreciará que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable están dictados por la cantidad de ingrediente activo con el que se va a combinar, la vía de administración y otras variables bien conocidas.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad del compuesto, la neurotoxina, que se utilizará en una composición farmacéutica descrita en la presente memoria que previene, mejora o trata los síntomas que acompañan a una enfermedad o afección a la que se hace referencia en esta memoria descriptiva. La eficacia terapéutica y la toxicidad del compuesto se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, la ED<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la LD<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación, LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>.

El régimen de dosificación lo determinará el médico tratante y otros factores clínicos. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de la superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se administran simultáneamente. El progreso puede monitorearse mediante evaluaciones periódicas. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas a las que se hace referencia en la presente memoria se administran al menos una vez para tratar o mejorar o prevenir una enfermedad o afección mencionada en esta memoria descriptiva. Sin embargo, dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse más de una vez.

En una descripción, la composición antes mencionada es un medicamento o una composición cosmética. En una descripción, dicho medicamento que comprende la neurotoxina biológicamente activa se puede usar para la

prevención y/o el tratamiento de al menos una de las siguientes enfermedades y trastornos: fuerza muscular voluntaria, distonía focal, incluyendo distonía cervical, craneal y blefaroespasma esencial benigno, espasmo hemifacial y espasticidad focal, trastornos gastrointestinales, hiperhidrosis y corrección cosmética de arrugas, en un aspecto adicional también blefaroespasma, distonía oromandibular, tipo de apertura de la mandíbula, tipo de cierre de la mandíbula, bruxismo, síndrome de Meige, distonía lingual, apraxia del párpado, distonía cervical de apertura, antecolis, retrocolis, laterocolis, tortícolis, distonía faríngea, distonía laríngea, disfonía espasmódica/tipo aductor, disfonía espasmódica/tipo abductor, disnea espasmódica, distonía de las extremidades, distonía de los brazos, distonía de tarea específica, calambre del escritor, calambre del músico, calambre del golfista, distonía de las piernas, aducción del muslo, abducción del muslo flexión de la rodilla, extensión de la rodilla, flexión del tobillo, extensión del tobillo, equinovaro, deformidad del pie, distonía, dedo estriado, flexión del dedo del pie, extensión del dedo del pie, distonía axial, síndrome de Pisa, distonía de la bailarina del vientre, distonía segmentaria, hemidistonía, distonía generalizada, distonía en lubag, distonía en degeneración corticobasal, distonía en lubag, distonía tardía, distonía en ataxia espinocerebelosa, distonía en la enfermedad de Parkinson, distonía en la enfermedad de Huntington, distonía en la enfermedad de Hallervorden Spatz, discinesias inducidas por dopa/distonía inducida por dopa, discinesias tardías /distonía tardía, discinesias/distonías paroxísticas, mioclonos palatino cinesiógeno no cinesiógeno inducido por acción, mioclonos mioquimia, rigidez, calambres musculares benignos, temblor hereditario del mentón, actividad paradójica de los músculos de la mandíbula, espasmos hemimasticatorios, miopatía branquial hipertrófica, hipertrofia maseterina, hipertrofia del tibial anterior, nistagmo, oscilopsia, parálisis supranuclear de la mirada, epilepsia, parcial continua, planificación de operación de tortícolis espasmódica, parálisis de las cuerdas vocales abductoras, disforia mutacional recalcitante, disfunción del esfínter esofágico superior, granuloma de cuerdas vocales, tartamudez, síndrome de Gilles de la Tourette, mioclonos del oído medio, cierre protector laríngeo, poslaringectomía, insuficiencia del habla, ptosis protectora, disfunción del entropión del esfínter de Oddi, pseudoacalasia, nonacalsia, trastornos motores esofágicos, vaginismus, temblor de inmovilización posoperatoria, disfunción de la vejiga, disinergia del esfínter del detrusor, espasmo del esfínter vesical, espasmo hemifacial, discinesias de reinervación, uso cosmético patas de cangrejo, asimetrías faciales con ceño fruncido, hoyuelos mentonianos, síndrome de persona rígida, tétanos, hiperplasia prostática, adipositas, tratamiento de la parálisis cerebral infantil, estrabismo, parálisis concomitante mixta, después de cirugía de desprendimiento de retina, después de cirugía de cataratas, en afaquia estrabismo miosítico, estrabismo miopático, desviación vertical disociada, como un complemento de la cirugía de estrabismo, esotropía, exotropía, acalasia, fisuras anales, hiperactividad de las glándulas exocrinas, síndrome de Frey, síndrome de lágrimas de cocodrilo, hiperhidrosis, rinorrea plantar palmar axilar, hipersalivación relativa en accidentes cerebrovasculares, en Parkinson, en esclerosis lateral amiotrófica, afecciones espásticas, en procesos autoinmunes de encefalitis y mielitis, esclerosis múltiple, mielitis transversa, síndrome de Devic, infecciones virales, infecciones bacterianas, infecciones parasitarias, infecciones por hongos, en paraparesia espástica hereditaria, síndrome postapopléjico, infarto hemisférico, infarto del tronco encefálico, infarto de mielón, migraña, en traumatismos del sistema nervioso central, lesiones hemisféricas, lesiones del tronco encefálico, lesión del mielón, en hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia intracerebral, hemorragia subaracnoidea, hemorragia subdural, hemorragia intraespinal, en neoplasias, tumores hemisféricos, tumores del tronco encefálico, tumores del mielón, ronquidos (documento de Patente WO 2000/033863). Para obtener detalles y síntomas, véase, por ejemplo, Jost 2007, *Drugs* 67(5), 669 o Dressler 2000 in *Botulinum Toxin Therapy*, Thieme Verlag, Stuttgart, Nueva York.

En la presente memoria se describe una composición que es una composición cosmética que puede formularse como se describió anteriormente en la presente memoria para una composición farmacéutica. Asimismo, para una composición cosmética, se prevé que el compuesto descrito en la presente memoria pueda usarse en forma sustancialmente pura. Las composiciones cosméticas se pueden aplicar por vía intramuscular. Como se describe en la presente memoria, las composiciones cosméticas que comprenden la neurotoxina se pueden formular como una solución antiarrugas.

En la presente memoria se describe una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el inhibidor descrito en la presente memoria. Dado que el polipéptido descrito en la presente memoria es responsable de activar las neurotoxinas clostridiales, el anticuerpo será útil para reducir el efecto tóxico observado durante la infección con clostridios. Por lo tanto, el anticuerpo se puede usar para tratar una infección por clostridios, incluyendo *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* y *Clostridium oedematiens*. Además, el anticuerpo se puede utilizar para el tratamiento de síntomas asociados con dicha infección. Además, dicho anticuerpo se puede usar en el tratamiento de una afección o un síntoma asociado con la afección, en donde la afección se selecciona entre botulismo, tétanos, colitis pseudomembranosa, gangrena, intoxicación alimentaria y similares.

En la presente memoria se describe una composición farmacéutica que comprende el polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. Dicha composición farmacéutica se puede utilizar para escindir proteolíticamente polipéptidos implicados en la coagulación, en particular para el tratamiento de pacientes con hipocoagulación. La composición farmacéutica se puede utilizar como fibrinolítico, en particular para el tratamiento de pacientes con infarto de miocardio, embolia pulmonar, tromboembolia venosa profunda, es decir, para eliminar coágulos sanguíneos. También se prevé el uso de la composición farmacéutica en el tratamiento del accidente cerebrovascular. Además, la composición farmacéutica se puede utilizar en el tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina para sustituir la tripsina, quimiotripsina o pepsina. Además, la composición farmacéutica se puede

utilizar en el tratamiento de pacientes afectados por reacciones inflamatorias, en el tratamiento de pacientes con cáncer, en particular para escindir proteolíticamente antígenos tumorales expuestos en la superficie. Además, la composición farmacéutica se puede utilizar en el tratamiento del papiloma.

5 Un método de detección de un inhibidor que comprende la etapa de (a) poner en contacto el polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria con un sustrato conocido y, opcionalmente, con un supuesto inhibidor; y (b) determinar el efecto del supuesto inhibidor sobre la conversión del sustrato en producto de escisión, en donde una reducción en la cantidad de producto de escisión es indicativa del efecto inhibidor del supuesto inhibidor que se describe en la presente memoria. En la presente memoria se describe un supuesto inhibidor que es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 4 a 25, en donde al menos un aminoácido básico de dicha secuencia de aminoácidos se sustituye con un aminoácido no básico. En la presente memoria se describe un péptido que comprende una o más modificaciones químicas. En la presente memoria se describe cualquier inhibidor que sea un peptidomimético de dicho péptido. En la presente memoria se describe un supuesto inhibidor que forma parte de una micromatriz de compuestos químicos, es decir, una colección de compuestos químicos orgánicos. En la presente memoria se enseña un inhibidor que es el anticuerpo descrito en la presente memoria. Este método es útil para identificar compuestos capaces de inhibir el polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria. Una selección inicial puede basarse, por ejemplo, en un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 4 a 25. Los péptidos capaces de inhibir el polipéptido descrito en la presente memoria pueden modificarse para aumentar la inhibición. Las modificaciones incluyen sustitución de aminoácidos o modificaciones químicas. Normalmente, este método se lleva a cabo poniendo en contacto el polipéptido descrito en la presente memoria con un sustrato conocido en presencia y ausencia de un supuesto inhibidor (etapa (a) del método) y comparando el efecto del supuesto inhibidor sobre la conversión del sustrato en producto de escisión. Una reducción de la tasa de conversión en presencia de un supuesto inhibidor es indicativa de un efecto inhibidor.

25 En la presente memoria se enseña un inhibidor del polipéptido proteolíticamente activo descrito en la presente memoria, en donde dicho inhibidor es (a) un inhibidor que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 4 a 25, en donde se sustituye un aminoácido básico contenido en el mismo con un aminoácido no básico; o (b) el anticuerpo descrito en la presente memoria.

Las figuras muestran:

**Figura 1: Prueba de actividad de fracciones recogidas de HiPrep 16/10 Q FF.**

30 Se analizó la actividad enzimática de 5 µl de las fracciones recogidas de HiPrep 16/10 Q FF incubando 2 µg de scBoNTA (carril 2) durante 1 hora a 37°C y posteriormente SDS-PAGE al 10 %. Carril 1: marcador de bajo peso molecular (LMW): 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa.

**Figura 2: Análisis de fracciones recolectadas de SEC (HiLoad 16/60 Superdex 75) con respecto al contenido de nBH con un peso molecular de -37,3 kDa mediante SDS-PAGE al 12,5%.**

35 Las fracciones 3 a 11 contienen la mayoría de nBH. (Carril 1: LMW: 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18,4 kDa, 14,4 kDa)

**Figura 3: Análisis de SDS-PAGE al 12,5% para la determinación de la pureza y la concentración de proteínas de tres lotes de purificación de nBH.**

40 Carril 1, LMW (116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18,4 kDa, 14,4 kDa); carril 2, lote TE311206 de nBH (192 ng/µl NT02CB1446/CBO1444 madurado, aminoácidos 254-594 de acc. Genbank CAL82987.1, MW: 38,6 kDa); carril 3, lote TIK301009 de nBH (130 ng/µl NT02CB1447/CBO1445 madurado, SEQ ID NO: 1, aminoácidos 249-581 de acc. Genbank CAL82988.1, MW: 37,3 kDa); carril 4, lote TIK280509 de nBH (114 ng/µl de NT02CB1447/CBO1445 madurado, SEQ ID NO: 1, aminoácidos 249-581 de acc. Genbank CAL82988.1, MW: 37,3 kDa).

**Figura 4: Informe del análisis del espectro de ESI-MS/MS.**

45 La banda de proteína de 38,6 kDa del lote TE311206 de nBH se identificó como NT02CB1446/CBO1444 con una puntuación Mascot de 725 y una cobertura de secuencia peptídica MS/MS del 29,6 % en todo el marco de lectura abierto (ORF). No se identificó ningún péptido (cuadro gris, péptido identificado por MS; cuadrados rojos, aminoácido identificado y/-b-ion del péptido después de la descomposición MS/MS) derivado del aminoácido 253 N-terminal. El análisis MS/MS del lote TE311206 mostró una cobertura de secuencia del 52% según los aminoácidos 254-294 C-terminales que forman la nBH.

**Figura 5: Informe del análisis del espectro ESI-MS/MS.**

55 La banda de proteína de 37,3 kDa del lote TIK301009 de nBH se identificó como NT02CB1447/CBO1445 con una puntuación Mascot de 555 y una cobertura de secuencia peptídica MS/MS del 28,4 % en todo el marco de lectura abierto (ORF). Excepto uno, todos los péptidos identificados (cuadro gris, péptido identificado por MS; cuadrados rojos, aminoácido identificado y/-b-ion del péptido después de la descomposición MS/MS) se derivan del aminoácido 333

C-terminal. El análisis MS/MS del lote TIK301009 mostró una cobertura de secuencia del 49,5 % según los aminoácidos 249-581 C-terminales que forman la nBH.

**Figura 6: Comparación de la actividad proteolítica dependiente de la concentración de nBH derivada de tres lotes de purificación.**

- 5 **A** SDS-PAGE al 12,5% de la prueba de actividad que analiza la nBH derivada de los lotes TIK301009, TIK280509 y TE311206 utilizando las siguientes diluciones de la nBH concentrada: 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000. El ensayo se realizó incubando 1 µg de scBoNT/A y 2 µl de dH<sub>2</sub>O y 1 µl de nBH correspondientemente diluido durante 60 min a 37 °C. Para el análisis de SDS-PAGE, se añadieron 3 µl de un tampón reductor 4x SDS Laemmli a un volumen final de 10 µl. Se escindió scBoNT/A de 150 kDa en una cadena pesada de 100 kDa y una cadena ligera de 50 kDa.
- 10 **B** Se cuantificó la densidad óptica de las bandas de proteínas de cadena pesada, cadena ligera y scBoNT/A y la suma de las bandas de productos de cadena ligera y pesada se dividió por la suma de las bandas de proteínas de LC, HC y scBoNT/A. Una dilución mayor del primer polipéptido disminuye la tasa de escisión. La actividad proteolítica específica de los tres lotes diferentes es casi idéntica.

**Figura 7: Escisión dependiente del tiempo de scBoNT/A de tipo nativo y mutantes que contienen un bucle modificado por nBH.**

- 15 **A** Modificación de la secuencia del bucle. En scBoNTAS Throm se eliminan todos los restos de lisina y se inserta la secuencia de reconocimiento de trombina LVPRGS, mientras que en scBoNT Res el bucle carece de cualquier aminoácido básico. Acortar el bucle a ocho restos pequeños o cinco aminoácidos con cadenas laterales voluminosas produce scBoNTAS (GGSG)<sub>2</sub> y scBoNTAS FQWYI, respectivamente. En scBoNTAS CGS-C se elimina todo el bucle y el puente disulfuro que forma cisteínas se sustituye por glicina y serina.
- 20 **B** Análisis de SDS-PAGE de la escisión dependiente del tiempo de scBoNT/A de tipo nativo y mutantes.
- C** scBoNTAS de tipo nativo se activa mediante nBH de manera dependiente del tiempo en cadena ligera y cadena pesada en 120 minutos. La falta de lisinas y la inserción de un único resto de arginina prolonga la escisión del bucle (scBoNTAS Throm). Un bucle que carece de cualquier resto básico todavía se puede escindir (scBoNTAS Res). Acortar el bucle al péptido de 8 unidades, introduciendo cinco aminoácidos con cadenas laterales voluminosas o eliminando todo el bucle produce un scBoNT/A no escindible.
- 25

**Figura 8: Análisis MS/MS de los productos de escisión de 50 kDa y 100 kDa tras la digestión de scBoNT/A con nBH.**

- 30 **A** Análisis del producto de escisión de 50 kDa que se identificó como cadena ligera de BoNT/A con una puntuación Mascot de 1460. El péptido C-terminal más adscrito cubre los aminoácidos G433 a K438, que corresponden al extremo C-terminal fisiológicamente observado de BoNT/A LC.
- B** Análisis del producto de escisión de 100 kDa que se identificó como cadena pesada de BoNT/A con una puntuación Mascot de 96. El péptido N-terminal más adscrito cubre los aminoácidos A449 a K456, que corresponden al extremo N-terminal fisiológicamente observado de BoNT/A HC.

- 35 **Figura 9: A** El contenido de proteína (mg/ml) de anti-nBH-IgY de tres grupos posteriores se analizó mediante SDS-PAGE al 12,5 %. **B ELISA:** Se recubrieron placas de microtitulación Nunc Maxisorp F96 con nBH de varios lotes (500 ng/mL) en PBS durante la noche a 4°C y después se bloquearon durante 1 h con tampón de bloqueo de PBS que contenía Tween-20 al 0,1 % y leche desnatada sin grasa al 2 %. Después del lavado, se añadió una dilución de IgY de cada grupo (10 µg/ml en tampón de bloqueo) durante 1 h y se detectó usando IgY anti-pollo de burro marcada con biotina, estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (ambas de Dianova, Hamburgo, Alemania) y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma).
- 40

**Figura 10: A Expresión recombinante y aislamiento de BH 1-581 inactivo (63 kDa) mediante Talon IMAC.** Análisis SDS-PAGE al 10% de fracciones Talon IMAC (LMW: 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa; SS34, lisado transparente; TD, flujo continuo; W, fracción de lavado; E1-E7, fracciones eluidas de imidazol 1 a 7). **B** No se observa endoproteólisis de scBoNT/A en LC (50 kDa) y HC (100 kDa) con iBH recombinante (SEQ ID NO: 2; "E"; 63 kDa) a 37°C después de 1 h (carril 6)( LMW: 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa).

- 45

**Figura 11: Uso de BoNTHidrolasa activa purificada (nBH) para obtener polipéptido procesado proteolíticamente**

- 50 **A** Se incuban 200 µg de scBoNT/A recombinante purificada con 350 ng de BoNTHidrolasa activa purificada durante 12 min a 37°C. Para detener la reacción, se elimina la nBH mediante SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y se analiza la cantidad de escisión mediante SDS-PAGE al 10%. **B** La fracción 1 (1800 µl) que contiene ~40 % de BoNT/A procesada se incuba con 350 ng de BoNTHidrolasa activa purificada durante 15 minutos a 37°C y se concentra a 300 µl mediante ultrafiltración. Para finalmente detener la reacción, se elimina la nBH mediante SEC (columna Superdex 200 10/300

GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y se analiza la cantidad de escisión mediante SDS-PAGE al 10%. **C** Las fracciones 1 y 2 (1800 µl) que contienen ~80 % de BoNT/A procesada se combinan y se incuban con 120 ng de BoNTHhidrolasa activa purificada durante 25 minutos a 37°C y se concentran a 300 µl mediante ultrafiltración. Para finalmente detener la reacción, se elimina la nBH mediante SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y se analiza la cantidad de escisión mediante SDS-PAGE al 10%. Se obtiene una BoNT/A procesada > 95% (SEQ ID NO. 3).

**El listado de secuencia muestra:**

- 10 SEQ ID NO: 1: polipéptido proteolíticamente activo derivado de una cepa ATCC 3502 de *Clostridium botulinum*, número de acceso a GenBank: "CAL82988.1", que carece de restos del aminoácido N-terminal 248
- SEQ ID NO: 2: polipéptido proteolíticamente inactivo derivado de una cepa ATCC 3502 de *Clostridium botulinum*, número de acceso a GenBank: "CAL82988.1"
- SEQ ID NO: 3: BoNT/A de ATCC 3502, acc. Genbank "AAA23262"
- SEQ ID NO: 4: Bucle de BoNT/A1
- 15 SEQ ID NO: 5: Bucle de BoNT/A2/A6
- SEQ ID NO: 6: Bucle de BoNT/A3
- SEQ ID NO: 7: Bucle de BoNT/A3
- SEQ ID NO: 8: Bucle de BoNT/A4
- SEQ ID NO: 9: Bucle de BoNT/A5
- 20 SEQ ID NO: 10: Bucle de BoNT/A7
- SEQ ID NO: 11: Bucle de BoNT/B1/B4bv/B6
- SEQ ID NO: 12: Bucle de BoNT/B2/B3
- SEQ ID NO: 13: Bucle de BoNT/B5np
- SEQ ID NO: 14: Bucle de BoNT/C/CD
- 25 SEQ ID NO: 15: Bucle de BoNT/D
- SEQ ID NO: 16: Bucle de BoNT/DC
- SEQ ID NO: 17: Bucle de BoNT/E 1-E5
- SEQ ID NO: 18: Bucle de BoNT/E6
- SEQ ID NO: 19: Bucle de BoNT/F1/F6
- 30 SEQ ID NO: 20: Bucle de BoNT/F2/F3
- SEQ ID NO: 21: Bucle de BoNT/F4
- SEQ ID NO: 22: Bucle de BoNT/F5
- SEQ ID NO: 23: Bucle de BoNT/F7
- SEQ ID NO: 24: Bucle de BoNT/G
- 35 SEQ ID NO: 25: Bucle de TeNT
- SEQ ID NO: 26: secuencia de ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 1
- SEQ ID NO: 27: secuencia de ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 2

**EJEMPLOS****Ejemplo 1: Purificación y caracterización de la BoNTHidrolasa nativa (nBH), que escinde específicamente la BoNT/A monocatenaria en su forma bicatenaria activa.**

- 5 (1) Sistema de lectura/prueba de actividad: Detectar y purificar específicamente una actividad enzimática que hidroliza la neurotoxina botulínica A (BoNT/A) en la cadena ligera (LC) de 50 kDa y la cadena pesada (HC) de 100 kDa en sobrenadantes de cultivo de *C. botulinum* y entre etapas cromatográficas expresamos la BoNT/A de 150 kDa como el polipéptido monocatenario (sc) en *E. coli*. La incubación de la scBoNT/A recombinante con la actividad enzimática adecuada (nBH) debería producir una LC de 50 kDa y una HC de 100 kDa visualizadas mediante reducción en SDS-PAGE al 10-13%.
- 10 (2) Expresión de proteasa clostridial: una sola colonia de la cepa ATCC 3502 de *C. botulinum* se inoculó en 100 ml de medio de infusión cerebro-corazón (BHI) y el cultivo se incubó durante la noche a 37°C en condiciones anaeróbicas. Se inocularon 10 ml de cultivo O/N en medio I 1 BHI y se incubaron anaeróticamente durante 48-72 h.
- 15 (3) Precipitación con sulfato de amonio: El sobrenadante del cultivo de 1 l se recogió mediante centrifugación (4°C, 6500 xg, 25 min). Se añadió sulfato de amonio hasta una concentración final del 85% (en este caso 575 g), la suspensión se agitó durante 6 horas a 4°C y posteriormente se centrifugó (4°C, 6500 xg, 30 min). El precipitado de sulfato amónico granulado se disolvió en un pequeño volumen (en este caso 5 ml) de NaP 50 mM, pH 7,5, y se dializó frente a NaP 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. Finalmente, el dializado se centrifugó (4°C, 40000xg, 60 min) y el sobrenadante se utilizó para la IEC.
- 20 (4) Cromatografía de intercambio iónico (IEC, columna HiPrep 16/10 Q FF): El sobrenadante de (3) (Figura 1, carril 3) se aplicó a una columna de intercambio aniónico HiPrep 16/10 Q FF equilibrada y se ejecutó con un tampón que contenía NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM. La ejecución se realizó a un caudal de 1 ml/min. Se realizó una prueba de actividad incubando 5 µl de cada otra fracción con 2 µg de scBoNTA durante 1 hora a 37°C y análisis posterior en SDS-PAGE (Figura 1). Se combinaron las fracciones 6-24 y su volumen se concentró hasta 3,5 ml usando ultrafiltración (Amicon-Ultra MWCO 10.000).
- 25 (5) Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, HiLoad 16/60 Superdex 200): Posteriormente, la solución proteica concentrada de (4) se cargó en una columna HiLoad 16/60 Superdex 200, equilibrada con NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM. La separación se realizó a un caudal de 1 ml/min. Las fracciones con un volumen de retención entre 80 ml y 100 ml se analizaron usando la prueba de actividad (1) y las fracciones apropiadas que contenían la actividad enzimática (nBH) se combinaron (~ 10 ml) y se concentraron a 3 ml mediante ultrafiltración. Posteriormente se añadió sulfato de amonio hasta una concentración final de 12,5% = 500 mM (+ 0,2 g),
- 30 (6) Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, HiTrap Fenil Sefarosa): Se unió nBH a la Fenil Sefarosa en el tampón A (NaP 50 mM, pH 7,5, sulfato de amonio 500 mM). La nBH unida se eluyó reduciendo la cantidad de sulfato de amonio debido a un gradiente lineal creciente con tampón B (NaP 50 mM, pH 7,5) a un caudal de 1 ml/min. Todas las fracciones que contenían proteínas se analizaron utilizando la prueba de actividad (1) y las fracciones apropiadas se combinaron y concentraron mediante ultrafiltración a 3,5 ml. El tampón de la solución se ajustó a NaP 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM.
- 35 (7) SEC (HiLoad 16/60 Superdex 75): Finalmente, la nBH se purificó mediante SEC utilizando la columna HiLoad 16/60 Superdex 75 en NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y un caudal de 1 ml/min. Las fracciones con un volumen de retención entre 70 ml y 80 ml se analizaron mediante SDS-PAGE al 12,5 % (Figura 2) y las fracciones 8-12 que contenían la nBH que migra a ~37,3 kDa se combinaron (~10 ml) y se concentraron a 1 ml mediante ultrafiltración.
- 40 (8) La proteína prominente que migra a aproximadamente 37,3 kDa (nBH) se analizó mediante secuenciación del péptido N-terminal según el protocolo de degradación de Edman. La secuencia del péptido identificado es V Q G Q S V K G V G y corresponde a los primeros diez restos de SEQ ID NO: 1.
- 45 (9) Se aislaron de forma reproducible dos lotes de nBH (NT02CB1447, 37,3 kDa, Figura 3, carril 3: TIK301009, carril 4: TIK280509) según el procedimiento descrito anteriormente. Las siguientes modificaciones del procedimiento de aislamiento producen la isoforma de nBH NT02CB1446 (38,6 kDa, Figura 3, carril 2, lote TE311206): (i) crecimiento del cultivo de *C. botulinum*: 18 h en lugar de 48 a 72 h; (ii) variación de las etapas cromatográficas: IEC -> SEC Superdex 75 -> HIC Fenil Sefarosa en lugar de IEC-> SEC Superdex 200 -> HIC Fenil Sefarosa -> SEC Superdex 75.

**Ejemplo 2: Identificación de la secuencia de nBH de *C. botulinum* por espectrometría de masas (MS)**

- 50 (1) Digestión triptica: Las bandas de proteínas que migraban a aproximadamente 38 kDa (nBH) en SDS-PAGE se cortaron para digestión triptica y se decoloraron agitando suavemente en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM, 50 % de acetonitrilo durante 30 min a 37°C. Se repitió la decoloración hasta que las manchas de gel quedaron claras. Se añadió acetonitrilo (100%) y se eliminó después de 3 min. Posteriormente, las manchas se secaron en un sistema speed vac (Eppendorf, Alemania). Se añadió tripsina (10 ng/µl) en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM y se incubó en hielo durante 1 h. Después, se eliminó la solución de tripsina restante, se añadió un pequeño volumen de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM y se llevó a cabo la digestión a 37°C durante la noche. Se recogió el sobrenadante y se extrajeron los trozos de gel usando TFA al 5 % y acetonitrilo al 10
- 55

% dos veces. Todos los fluidos se combinaron, se secaron en un concentrador a vacío speed vac y los péptidos extraídos se almacenaron a 4°C.

(2) Desorción/ionización laser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF/TOF) MS: Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF (Ultraflex1 Bruker Daltonik GmbH) en modo lineal con un voltaje de aceleración de 25 kV. Se detectaron masas desde 700 m/z hasta 4500 m/z. Las muestras (2 µl) se cocristalizaron con 2 µl de solución de ácido sinnapínico que contenía 50 % de acetonitrilo y 0,2 % de ácido trifluoroacético (TFA) directamente sobre una placa objetivo MALDI de acero inoxidable. Se recogieron 500 disparos de láser para cada muestra.

(3) Separación de péptidos mediante cromatografía en fase reversa: La separación de péptidos se realizó mediante cromatografía en fase reversa utilizando un sistema nano-HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) que consiste en un muestreador automático y una bomba de gradiente. La muestra se disolvió en tampón A (5 % de acetonitrilo, 0,1 % de ácido fórmico) y se inyectó una alícuota de hasta 10 µl en una columna C18 (Zorbax SB-C18, 5 µm, 300 Å, 0,5 mm de diámetro interior, longitud 15 cm) a un caudal de 5 µl/min. Después de la carga, la columna se lavó durante 15 minutos con tampón A y los péptidos se eluyeron usando un gradiente de eluyente A y eluyente B (acetonitrilo al 70 % (v/v) en ácido fórmico al 0,1 % (v/v)) del 0 % hasta el 100 % de eluyente B en 75 min.

(4) Interfaz de ionización por electropulverización (ESI) y espectrometría de masas con trampa de iones: La salida de HPLC se conectó directamente a la fuente de nanoESI de un espectrómetro de masas con trampa de iones y se utilizó el pulverizador de líquido de envoltura coaxial Agilent (Agilent Technologies). El capilar de salida estaba sujeto por una aguja de acero circundante y parecía entre 0,1 y 0,2 mm fuera del mismo. La pulverización se estabilizó mediante N<sub>2</sub> como gas nebulizador (5 l/min). El voltaje de ionización se ajustó a 4500 V y se aplicó gas seco a 5 psi y 250°C. Los espectros se recogieron con un espectrómetro de masas con trampa de iones Esquire3000+ (Bruker Daltonik) a una velocidad de escaneo de 13000 m/z por segundo. Utilizando ESI en modo positivo, se adquirieron espectros de masas de 50 a 1600 m/z en modo de escaneo y conmutación dependiente de los datos entre análisis de MS y MS/MS. Para aumentar la calidad de los espectros MS/MS, solo se seleccionaron dos iones precursores de un espectro para el análisis de MS/MS y la exclusión activa se estableció en 2 minutos para excluir los iones precursores que ya se habían medido.

(4) Procesamiento de datos: El procesamiento de datos se realizó con los paquetes de software Data Analysis (versión 3.0) y BioTools (versión 3.0) (Bruker Daltonik). La identificación de proteínas se realizó utilizando el software MASCOT (versión 2.1) y la base de datos MSDB (Matrix Science, London, UK).

### 30 (5) Resultados:

**Tabla 2: nBH identificada por MS**

Carril	Lote nBH	Concentr. de proteínas.	Nombre de ORF	Acc. Genbank.	aa de ORF	MW [kDa]	Puntuación Mascot
2	TE311206	192 ng/µl	NT02CB 1446 CBO1444	CAL82987.1	254-594	38,6	725
3	TIK301009	130 ng/µl	NT02CB 1447 CBO1445	CAL82988.1	249-581	37,3	555
4	TIK280509	114 ng/µl	NT02CB 1447 CBO1445	CAL82988.1	249-581	37,3	609

La banda de proteína de 38,6 kDa del carril 2 (lote TE311206 de nBH) se identificó como NT02CB1446/CB01444 con una puntuación Mascot de 725 y una cobertura de secuencia peptídica MS/MS del 29,6 % sobre todo el marco de lectura abierto (ORF). No se identificó ningún péptido derivado del aminoácido N-terminal 253 (Figura 4). El análisis de MS/MS del lote TE311206 mostró una cobertura de secuencia del 52 % según los aminoácidos C-terminales 254-594 que forman la nBH.

Las bandas de proteína de 37,3 kDa del carril 3 (lote TIK301009 de nBH) y del carril 4 (lote TIK280509 de nBH) se identificaron como NT02CB1447/CBO1445 con una puntuación Mascot de 555 y 609, respectivamente. Excepto uno, todos los péptidos identificados derivan de los aminoácidos C-terminales 333 (Figura 5). El análisis de MS/MS del lote TIK301009 mostró una cobertura de secuencia del 49,5 % según los aminoácidos C-terminales 249-581 que forman la nBH.

**Ejemplo 3: Caracterización de la especificidad enzimática de nBH**

(1) Se comparó la actividad proteolítica dependiente de la concentración de nBH derivada de tres lotes de purificación (Figura 6). Una prueba de actividad que analiza la nBH derivada de los lotes TIK301009, TIK280509 y TE311206 utilizando varias diluciones de nBH demuestra que las diluciones más altas disminuyen la tasa de escisión. La actividad proteolítica de los tres lotes diferentes es casi idéntica, lo que indica que la isoforma madurada NT02CB1446 (TE311206) muestra una actividad específica similar a la de NT02CB1447 madurada (SEQ ID NO: 1).

(2) La escisión dependiente del tiempo de scBoNT/A de tipo nativo y mutantes por nBH se analizó empleando la prueba de actividad (Figura 7). La scBoNTAS de tipo nativo se activa mediante nBH de manera dependiente del tiempo en cadena ligera y cadena pesada en 120 minutos en más del 95 %. La secuencia del bucle se modificó para caracterizar el sitio de escisión. En scBoNTAS Throm se eliminan todos los restos de lisina y se inserta la secuencia de reconocimiento de trombina LVPRGS que prolonga la tasa de escisión. En scBoNT Res, el bucle carece de aminoácidos básicos, lo que retrasa drásticamente la hidrólisis completa, lo que indica una fuerte preferencia de reconocimiento de nBH por restos básicos como lisina y arginina en el sitio de escisión. Además, la accesibilidad de nBH al bucle se ve perjudicada al acortar el bucle a ocho restos pequeños o cinco aminoácidos con cadenas laterales voluminosas (scBoNTAS (GGSG)<sub>2</sub> y scBoNTAS FQWYI).

(3) El análisis de MS/MS del producto de escisión de 50 kDa tras la digestión de scBoNT/A con nBH mostró que el péptido C-terminal más adscrito cubre los aminoácidos G433 a K438, que corresponde al extremo C-terminal fisiológicamente observado de BoNT/A LC (Figura 8A). El análisis del producto de escisión de 100 kDa que se identificó como cadena pesada de BoNT/A demostró que el péptido N-terminal más adscrito cubre los aminoácidos A449 a K456, que corresponde al extremo N-terminal observado fisiológicamente de BoNT/A HC (Figura 8B). Por lo tanto, la nBH aislada produce BoNT/A procesada fisiológicamente y preferiblemente hidroliza los enlaces peptídicos C-terminales a restos de lisina y arginina.

**Ejemplo 4: Conservación evolutiva de BoNTHidrolasa y sus isoformas**

El análisis de la secuencia de proteínas de SEQ ID NO: 2 (acc. Genbank CAL82988.1/YP\_001253958.1) reveló tres dominios conservados. Los restos 18-573 corresponden a una metaloproteasa de zinc (elastasa) o LasB implicada en el transporte y metabolismo de aminoácidos con una puntuación Blast de 738. Los restos 148-212 corresponden a un propéptido de peptidasa y al dominio YPEB o PepSY (puntuación Blast 97. Los restos 336- 573 son parte de la familia de peptidasas M4, que incluyen termolisina, protealisina, aureolisina y proteasas neutras (puntuación Blast 803).

La secuenciación del genoma de *C. botulinum* ATCC 3502 ha revelado la existencia de seis ORFs que codifican isoformas de iBH (Sebahia et al., 2007, Genome Res. 17(7):1082-1092). Datos genómicos adicionales están disponibles para 10 cepas de *C. botulinum* grupo I, así como *C. Sporogenes* que no secretan BoNT todos los cuales contienen entre cinco y siete ORFs que codifican iBH. La nBH (SEQ ID NO: 1) comparte una identidad de secuencia de aminoácidos mínima del 64 % con las otras 63 isoformas.

**Ejemplo 5: Generación de anticuerpos específicos para la BoNTHidrolasa**

(1) Generación de IgY: Gallinas de dieciséis semanas de edad [ISA Brown and Lohmann Selected Leghorn (LSL), Spreenhagener Vermehrungsbetrieb für Legehennen GmbH, Bestensee, Alemania] se mantuvieron en jaulas individuales, construidas exclusivamente para el mantenimiento de gallinas (Ebeco, Castrop-Rauxel, Alemania). Había alimentos (ssniff Legehühner-Zucht 1 y 2; ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Alemania) y agua *ad libitum*, y las gallinas comenzaron a poner huevos entre las 23 y 25 semanas de edad. Los huevos se recogieron diariamente, se etiquetaron y se almacenaron a 4°C hasta su posterior procesamiento. Todo el mantenimiento y los experimentos con animales se realizaron según las directrices de las autoridades locales, Berlín (Nº H0069/03). La gallina se inmunizó y reforzó mediante la inyección i.m. (músculo pectoral, lado izquierdo y derecho) un total de 10 veces durante un período de 1 año, con intervalos entre 4 y 8 semanas. El intervalo utilizado se basó en trabajos previos que no mostraron células de memoria demostrables hasta al menos 3 semanas después de la inmunización (Pei y Collisson, 2005). La concentración de antígeno utilizada fue de aproximadamente 20 µg por inyección (nBH). No se inyectaron más de 500 µl de solución de antígeno por inmunización. Se utilizó adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y se utilizó FIA para las inyecciones de refuerzo posteriores. El método para la purificación de IgY se adaptó de Polson et al. (1980). Brevemente, la yema de huevo se diluyó 1:2 con PBS estéril (pH 7,4, Roche, Mannheim, Alemania). Para la eliminación de lípidos y lipoproteínas, se añadió polietilenglicol (PEG) 6000 (Roth, Karlsruhe, Alemania) al 3,5% (p/v). Después de una agitación suave seguida de una centrifugación (10000 xg durante 20 minutos a 4°C), se decantó el sobrenadante y se añadió PEG 6000 sólido hasta una concentración final del 12 % (p/v). Después esta mezcla se centrifugó como anteriormente. El precipitado se disolvió en 10 ml de PBS, se añadió PEG al 12 % (peso/vol) y la solución se centrifugó. Finalmente, el precipitado se disolvió en 1,2 ml de PBS, se transfirió a un dispositivo de microdiálisis (QuixSep, Roth, Alemania) y se dializó frente a PBS a 4°C. El contenido de proteína (mg/ml) se analizó mediante SDS-PAGE al 12,5 % (Figura 9A) y se midió fotométricamente a 280 nm y se calculó según la ley de Lambert-Beer con un coeficiente de extinción de 1,33 para IgY.

(2) ELISA: Se recubrieron placas de microtitulación Nunc Maxisorp F96 (VWR International GmbH, Darmstadt, Alemania) con nBH de varios lotes (500 ng/mL) en PBS durante la noche a 4°C y después se bloquearon durante 1 h

con tampón de bloqueo de PBS que contenía Tween-20 al 0,1% y 2% de leche desnatada sin grasa (Merck, Darmstadt, Alemania). Después del lavado, se añadió una dilución de IgY (10 µg/ml en tampón de bloqueo) durante 1 h y se detectó utilizando IgY anti-pollo de burro marcada con biotina, estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (ambas Dianova, Hamburgo, Alemania) y 3,3',5, 5'-tetrametilbencidina (Sigma). La nBH detectada se muestra en la Figura 9B.

- 5 (3) Transferencia de Western: La nBH se separó mediante SDS-PAGE al 12,5% y se transfirió a una membrana de fluoruro de polivinilideno (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) utilizando técnicas de inmunotransferencia estándar. La membrana se bloqueó durante la noche a 4°C y se incubó con IgY (1:5.000 en tampón de bloqueo) durante 1 h. Después del lavado, la membrana se sondeó con IgY anti-pollo de burro marcada con biotina durante 30 minutos y se desarrolló usando fosfatasa alcalina y CDP-Star (Perkin Elmer, Waltham, MA).

10 **Ejemplo 6: Expresión recombinante de BoNTHidrolasa**

- (1) Constructos de plásmidos: Las porciones del gen que codifican BH nativa (SEQ ID NO: 1) y su propéptido (SEQ ID NO: 2) se amplificaron mediante PCR usando oligonucleótidos adecuados y DNA genómico de *C. botulinum* ATCC 3502, se fusionaron a un oligonucleótido que codifica His6Tag y se insertaron en pQE3 (Qiagen) produciendo los plásmidos de expresión pQ-BH1445H6-249-581 y pQ-BH1445H6-1-581, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos se verificaron mediante secuenciación de DNA.

- 15 (2) Purificación de proteínas recombinantes: nBH e iBH, fusionados a una His6Tag carboxilo-terminal, se produjeron utilizando la cepa M 1 5p REP de *E. coli* (Qiagen) durante diez horas de incubación a temperatura ambiente, y se purificaron en perlas Talon-sepharose (Clontech Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se juntaron las fracciones que contenían las proteínas deseadas, se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C. Se aisló iBH como proteína recombinante con un MW de 63 kDa (Figura 10A). La inactividad de iBH se demostró mediante la prueba de actividad: después de 1 hora a 37°C no se hidrolizó scBoNT/A nativa en LC y HC (Figura 10B).

20 **Ejemplo 7: Inhibición de BoNTHidrolasa**

- (1) Detección de inhibidores peptídicos de BH: Se sintetizarán péptidos basados en las SEQ ID NOs: 4 a 25 que carecen de uno o más restos básicos. Cada péptido se añadirá a la mezcla según la prueba de actividad. Un péptido que puede disminuir la cantidad de scBoNT/A procesada, prolongar la duración necesaria para procesar completamente scBoNT/A o bloquear el procesamiento de scBoNT/A se considera un inhibidor de nBH.

- 25 (2) Detección de inhibidores basados en anticuerpos: Los anticuerpos generados contra epítopos derivados de nBH como IgY del Ejemplo 5 se incuban con nBH y posteriormente se someten a la prueba de actividad. Un anticuerpo que puede disminuir la cantidad de scBoNT/A procesada, prolongar la duración necesaria para procesar completamente scBoNT/A o bloquear el procesamiento de scBoNT/A se considera un inhibidor de nBH.

30 **Ejemplo 8: Uso de BoNTHhidrolasa activa purificada (nBH) para obtener polipéptido procesado proteolíticamente**

- (1) Se incuban 200 µg de scBoNT/A recombinante purificada con 350 ng de BoNTHhidrolasa activa purificada durante 12 min a 37°C. Para detener la reacción, se elimina la nBH mediante SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y se analiza la cantidad de escisión por SDS-PAGE al 10% (Figura HA).

- 35 (2) La fracción 1 (1800 µl) que contiene ~40 % de BoNT/A procesada se incuba con 350 ng de BoNTHhidrolasa activa purificada durante 15 minutos a 37°C y se concentra a 300 µl mediante ultrafiltración. Para finalmente detener la reacción, se elimina la nBH mediante SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y se analiza la cantidad de escisión mediante SDS-PAGE al 10% (Figura 11B).

- 40 (2) Las fracciones 1 y 2 (1800 µl) que contienen ~80 % de BoNT/A procesada se combinan y se incuban con 120 ng de BoNTHhidrolasa activa purificada durante 25 minutos a 37°C y se concentran a 300 µl mediante ultrafiltración. Para finalmente detener la reacción, se elimina la nBH mediante SEC (columna Superdex 200 10/300 GL, tampón: NaP 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, volumen de muestra = 0,3 ml, caudal = 0,25 ml/min) y se analiza la cantidad de escisión mediante SDS-PAGE al 10% (Figura 11C). Se obtiene una BoNT/A procesada >95 % (Seq ID NO. 3). Se obtiene el segundo polipéptido completamente procesado idéntico (>95 % de BoNT/A procesada) si el segundo polipéptido se procesa en una etapa durante 50 min a 37°C (200 µg de scBoNT/A incubadas con 350 ng de nBH). Después de un tiempo de incubación de 1 hora a 37°C, se procesa más del 97% de BoNT/A.

50

**REIVINDICACIONES**

1. El uso de Lys-C o Lys-N para procesar proteolíticamente una neurotoxina botulínica monocatenaria de serotipo F (BoNT/F) mediante hidrólisis para producir una BoNT/F bicatenaria activa.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en donde la BoNT/F monocatenaria es una neurotoxina natural, una neurotoxina recombinante o una neurotoxina modificada, tal como una neurotoxina que carece del dominio H<sub>C</sub> nativo o partes del mismo o derivados con otros restos de aminoácidos que sustituyen el dominio H<sub>C</sub> de la neurotoxina.
3. El método para la fabricación de un polipéptido procesado proteolíticamente, que comprende la etapa de poner en contacto:
- (a) un primer polipéptido, siendo dicho primer polipéptido Lys-C o Lys-N;
- 10 con
- (b) un segundo polipéptido, siendo dicho segundo polipéptido susceptible de proteólisis por dicho primer polipéptido;
- en donde dicho contacto da como resultado el procesamiento proteolítico de dicho segundo polipéptido en al menos dos productos de escisión;
- 15 en donde el segundo polipéptido es una BoNT/F monocatenaria y en donde dicho primer polipéptido hidroliza la BoNT/F monocatenaria para producir una BoNT/F bicatenaria activa.
4. El método según la reivindicación 3, en donde dicha BoNT/F monocatenaria es una neurotoxina natural, una neurotoxina recombinante o una neurotoxina modificada, tal como una neurotoxina que carece del dominio H<sub>C</sub> nativo o partes del mismo o derivados con otros restos de aminoácidos que sustituyen el dominio H<sub>C</sub> de la neurotoxina.
- 20 5. El método según la reivindicación 3 o 4, en donde dicho contacto se produce dentro de una célula, en un lisado celular o en un lisado celular purificado.

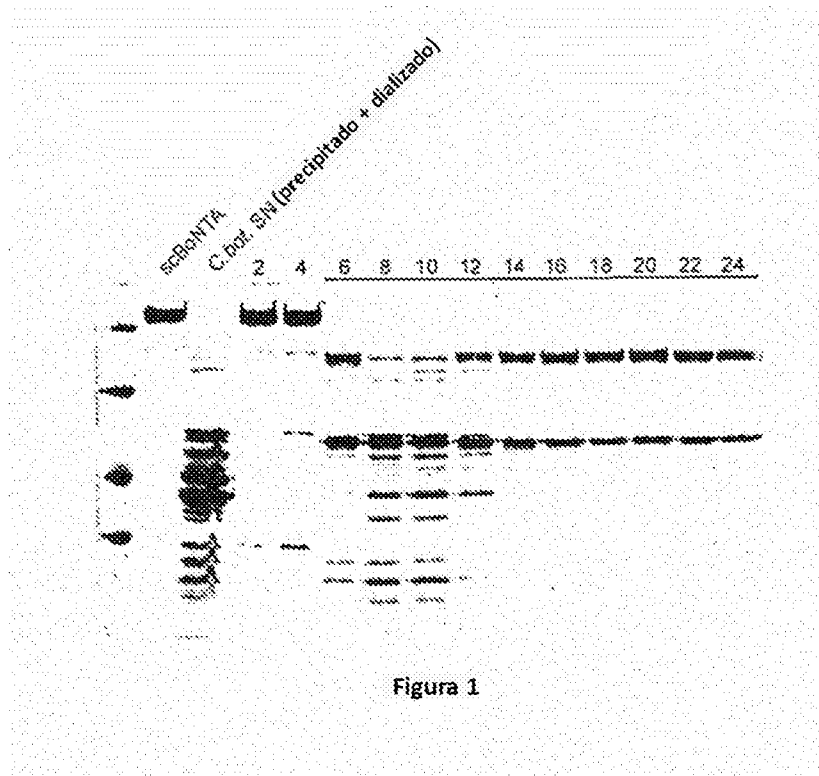
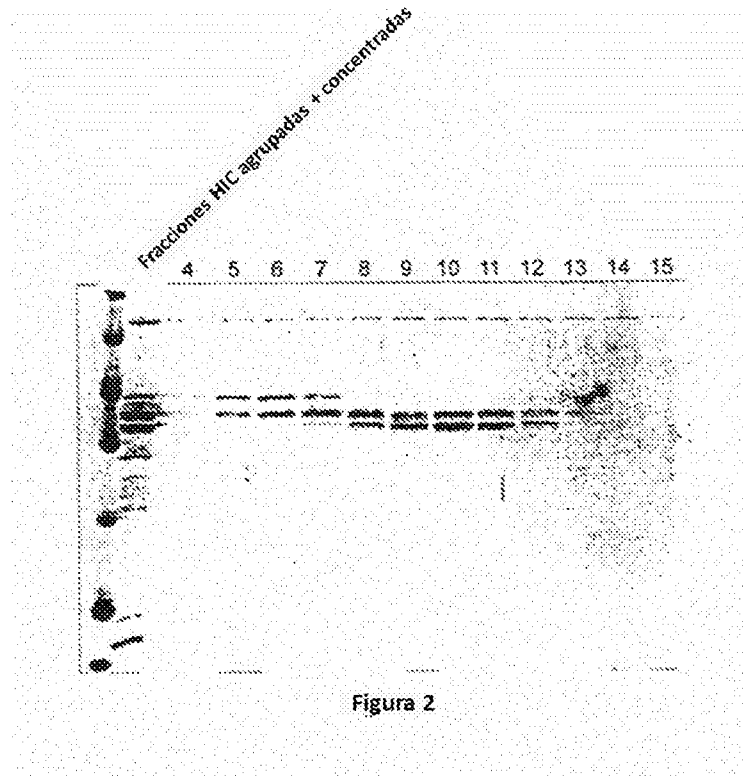


Figura 1



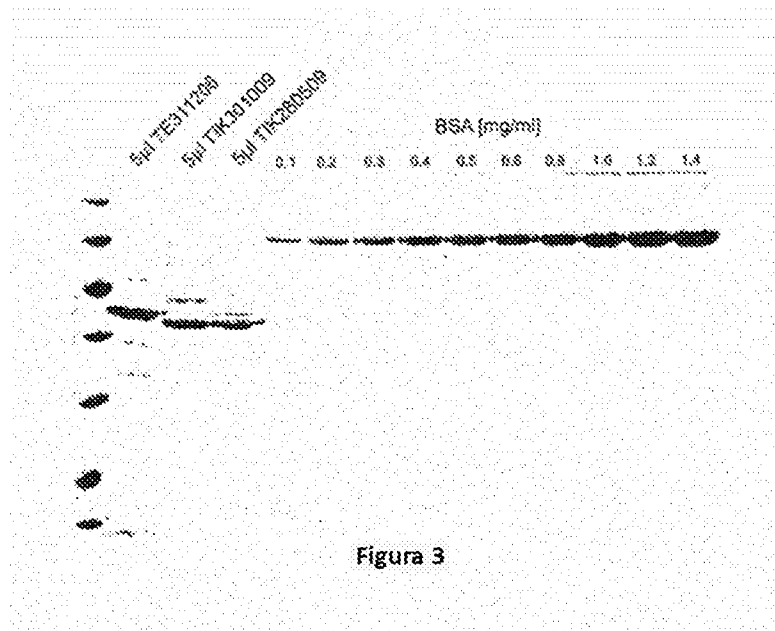


Figura 3

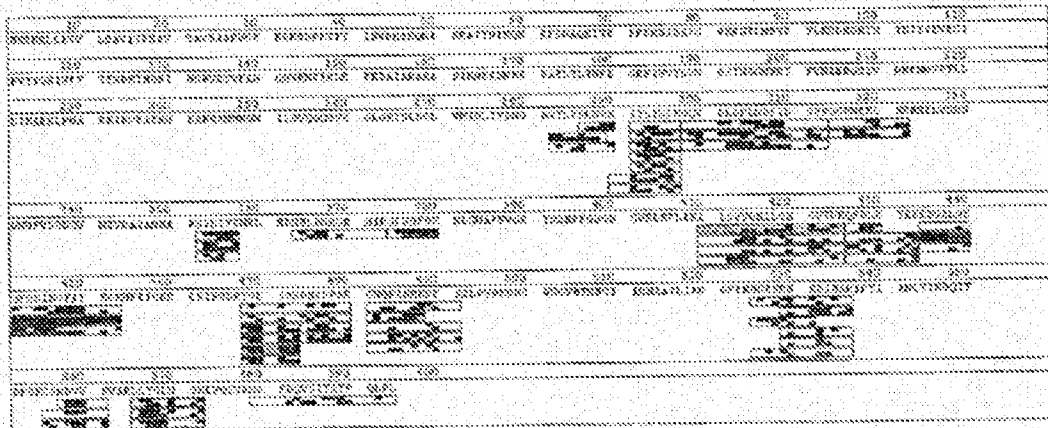


Figura 4

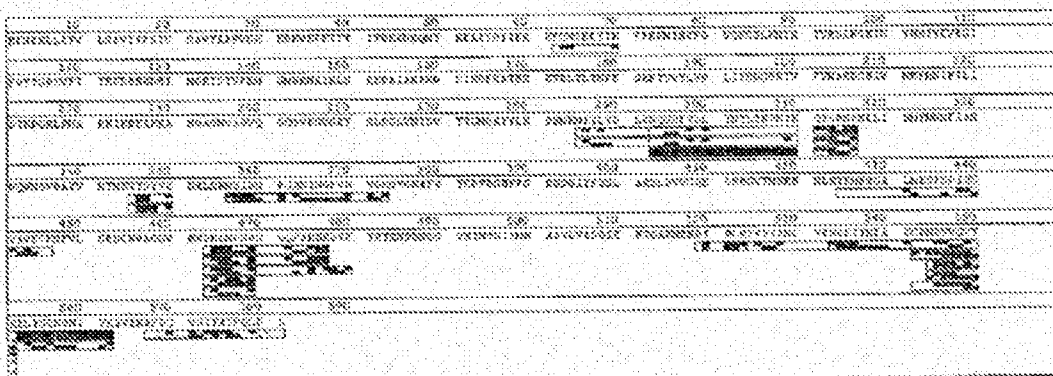


Figura 5



**A**

scBoNTA5 wt	KLLCVRSIIITSGPPSLDNGYKALNGLCTKV
scBoNTA5 Throm	KLLCVRSIIITS.T.SLVPKGS.ALNGGLCTKV
scBoNTA5 Res	KLLCV.GLIITS.T.SLVP.GS.ALNGGLCTKV
scBoNTA5 (GGSG)*	KLLGGSG.....GGGGCTKV
scBoNTA5 CGS-C	MLL.G.....S.IKV
scBoNTA5 FQWYI	KLLCFQW.....YICIKV

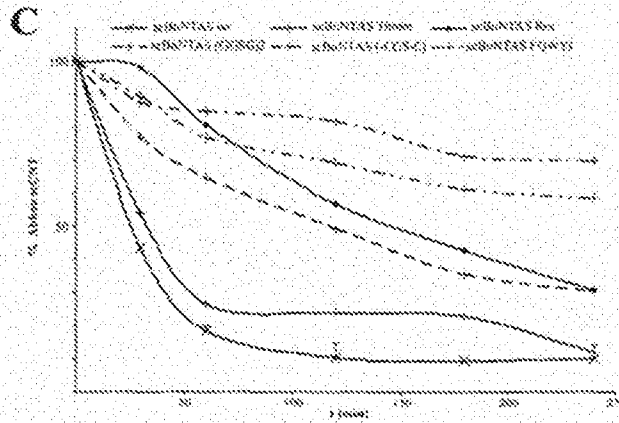
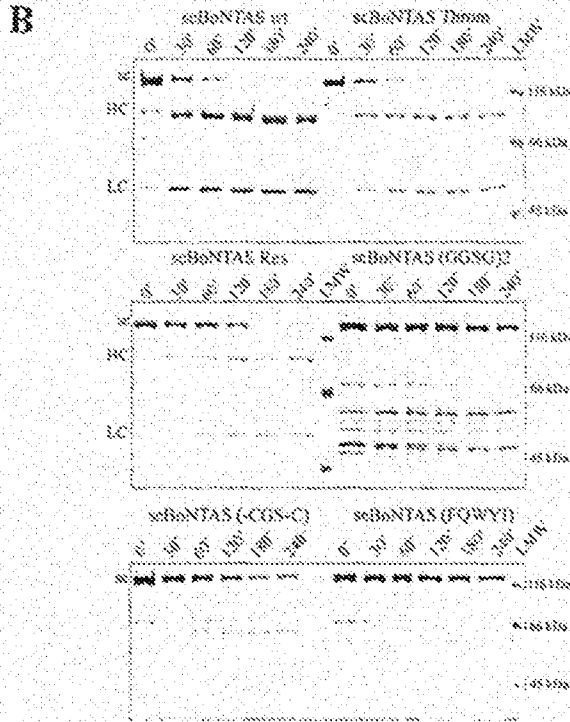


Figura 7

The image shows a table with approximately 15 columns and 15 rows. The content is extremely noisy and illegible due to heavy digital corruption. The text appears to be a mix of numbers and characters, but no specific data points can be discerned.

Figura 8A

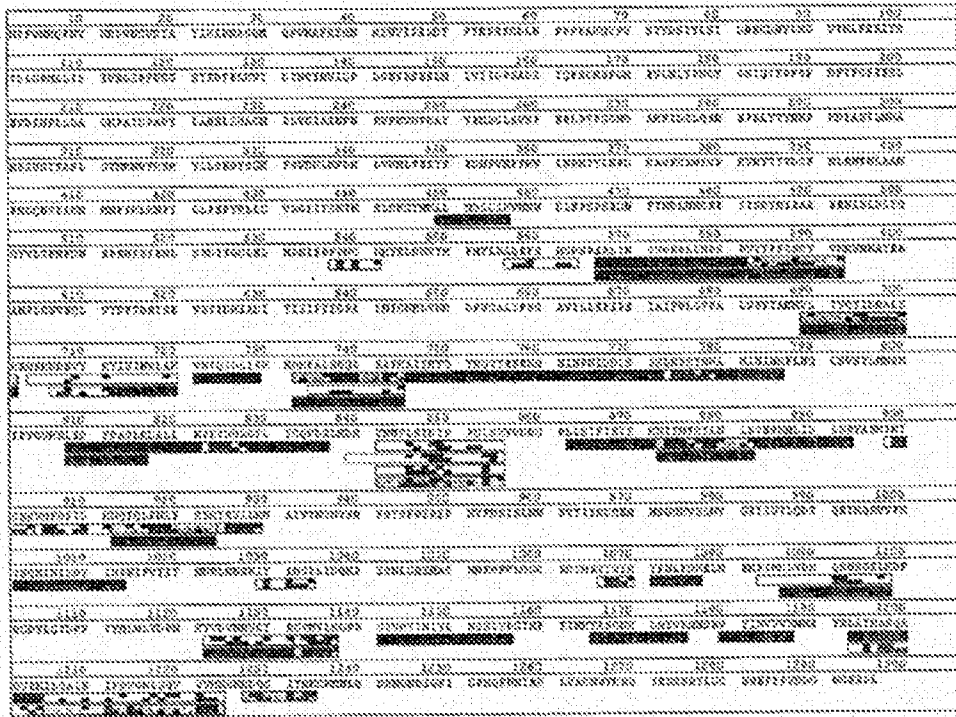


Figura 8B

