

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 237**

51 Int. Cl.:

C07K 14/33 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2017** **PCT/EP2017/066891**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2019** **WO19007509**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2017** **E 17742665 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2022** **EP 3649143**

54 Título: **Neurotoxinas botulínicas recombinantes nuevas con mayor duración de efectos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.12.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FREVERT, JÜRGEN;
HOFMANN, FRED;
JURK, MARCEL;
LÓPEZ DE LA PAZ, MANUELA y
SCHEPS, DANIEL

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 930 237 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

Neurotoxinas botulínicas recombinantes nuevas con mayor duración de efectos

Campo de la invención

Esta invención se refiere a neurotoxinas botulínicas recombinantes nuevas de serotipo A que presentan (i) una mayor duración de efectos y (ii) una elevada actividad biológica específica. La invención también se refiere a métodos para la fabricación de dichas neurotoxinas botulínicas recombinantes. Estas neurotoxinas botulínicas recombinantes nuevas comprenden al menos dos dominios adicionales y al menos una modificación de aminoácido situada en el exosito alfa y/o en el exosito beta de la cadena ligera de la neurotoxina. La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas neurotoxinas recombinantes. La invención se refiere además a las neurotoxinas botulínicas nuevas precursoras monocatenarias recombinantes y a las secuencias de ácido nucleico que codifican dichas neurotoxinas botulínicas precursoras monocatenarias.

Antecedentes de la invención

Clostridium es un género de bacterias gram-positivas anaerobias, que pertenecen a los Firmicutes. *Clostridium* consiste en aproximadamente 100 especies que incluyen tanto bacterias libres comunes como patógenos importantes tales como *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani*. Ambas especies producen neurotoxinas, la toxina botulínica y la toxina tetánica, respectivamente. Estas neurotoxinas son potentes inhibidores de la secreción de neurotransmisores dependientes de calcio en las células neuronales y están entre las toxinas más potentes conocidas por el hombre. La dosis letal en seres humanos está entre 0,1 ng y 1 ng por kilogramo de peso corporal.

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

Aunque tanto la neurotoxina botulínica (BoNT) como la neurotoxina tetánica (TxNT) actúan a través de un mecanismo de acción fisiológica inicial similar, la inhibición de la liberación de neurotransmisores procedentes del axón de la neurona afectada a la sinapsis, difieren en su respuesta clínica. Mientras que la toxina botulínica actúa en la unión neuromuscular y otras sinapsis colinérgicas del sistema nervioso periférico, inhibiendo la liberación del neurotransmisor acetilcolina y provocando de este modo una parálisis flácida, la toxina tetánica actúa principalmente en el sistema nervioso central, impidiendo la liberación de los neurotransmisores inhibidores GABA (ácido gamma-aminobutírico) y glicina al degradar la proteína sinaptobrevina. La consiguiente sobreactividad en los músculos da lugar a contracciones generalizadas de la musculatura agonista y antagonista, denominadas espasmo tetánico (parálisis rígida).

Aun cuando la neurotoxina tetánica pertenece a un tipo inmunitariamente diferente, se sabe que las neurotoxinas botulínicas se producen en siete tipos inmunógenos distintos, denominados BoNT/A a BoNT/G. La mayoría de las cepas de *Clostridium botulinum* producen un tipo de neurotoxina, pero también se han descrito cepas que producen múltiples toxinas.

Las neurotoxinas botulínicas y tetánicas tienen secuencias de aminoácidos altamente homólogas y muestran una estructura de dominio similar. Su forma biológicamente activa comprende dos cadenas peptídicas, una cadena ligera de aproximadamente 50 kDa y una cadena pesada de aproximadamente 100 kDa, unidas por un enlace disulfuro. Hay una región enlazadora o bucle, cuya longitud varía entre diferentes toxinas clostrídicas, situada entre los dos restos de cisteína que forman el enlace disulfuro. Esta región de bucle es escindida proteolíticamente por una endoproteasa clostrídica desconocida para obtener la toxina biológicamente activa.

El mecanismo molecular de intoxicación por TeNT y BoNT también parece ser similar: la entrada en la neurona diana está mediada por la unión de la parte del extremo C-terminal de la cadena pesada a un receptor de superficie celular específico; a continuación, la toxina se absorbe mediante endocitosis mediada por receptores. El pH bajo en el endosoma así formado desencadena entonces un cambio conformacional en la toxina clostrídica que permite su incorporación a la membrana endosómica y translocarse a través de la membrana endosómica al citoplasma, donde se reduce el enlace disulfuro que une la cadena pesada y la cadena ligera. La cadena ligera puede entonces escindir selectivamente las denominadas proteínas SNARE, que son esenciales en diferentes etapas de la liberación de neurotransmisores en la hendidura sináptica, p. ej., reconocimiento, acoplamiento y fusión de vesículas que contienen neurotransmisores con la membrana plasmática. TeNT, BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F y BoNT/G provocan la escisión proteolítica de la sinaptobrevina o VAMP (proteína de membrana asociada a vesículas), BoNT/A y BoNT/E escinden la proteína SNAP-25 asociada a la membrana plasmática y BoNT/C escinde la proteína de membrana plasmática integral, syntaxina, y la proteína SNAP-25.

Las neurotoxinas clostrídicas muestran duraciones de acción variables que son específicas del serotipo. El efecto terapéutico clínico de BoNT/A dura aproximadamente 3 meses para trastornos neuromusculares y de 6 a 12 meses para la hiperhidrosis. Por otra parte, el efecto de BoNT/E dura menos de 4 semanas. El efecto terapéutico más duradero de BoNT/A hace que sea preferible para cierto uso clínico en comparación con los otros serotipos, por ejemplo, los serotipos B, C₁, D, E, F, G. Una explicación posible para las distintas duraciones de acción podría ser las distintas localizaciones

subcelulares de los serotipos de BoNT. El dominio de proteasa de la cadena ligera de BoNT/a se localiza de forma puntual hacia la membrana plasmática de células neuronales, localizándose junto a su sustrato SNAP-25. Por el contrario, el serotipo BoNT de duración corta es citoplasmático. La asociación con la membrana podría proteger a BoNT/A de los mecanismos de degradación citosólicos permitiendo la persistencia prolongada de BoNT/A en la neurona.

En *Clostridium botulinum*, la toxina botulínica se forma como un complejo proteico que comprende el componente neurotóxico y proteínas no tóxicas. Las proteínas auxiliares incorporan el componente neurotóxico, protegiéndolo de este modo de la degradación por las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal. Por lo tanto, las neurotoxinas botulínicas de la mayoría de los serotipos son tóxicas por vía oral. Pueden obtenerse complejos con, por ejemplo, 450 kDa o con 900 kDa a partir de cultivos de *Clostridium botulinum*.

En los últimos años se han utilizado neurotoxinas botulínicas como agentes terapéuticos en el tratamiento de distonías y espasmos. Existen preparaciones comercializadas que comprenden complejos de toxina botulínica, p. ej. de Ipsen Ltd (Dysport[®]) o Allergan Inc. (Botox[®]). Por ejemplo, Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt (Xeomina[®]) comercializa un componente neurotóxico de alta pureza, exento de proteínas complejantes.

Las neurotoxinas clostrídicas se inyectan normalmente en el tejido muscular afectado, llevando el agente cerca de la placa de la unión neuromuscular, es decir, cerca del receptor celular que media su captación en la célula nerviosa que controla dicho músculo afectado. Se han observado diversos grados de difusión de la neurotoxina. Se cree que la difusión de la neurotoxina depende de la cantidad inyectada y la preparación particular de neurotoxina. Puede dar lugar a efectos secundarios adversos tales como parálisis del tejido muscular cercano, que puede evitarse en gran medida reduciendo las dosis inyectadas al nivel terapéuticamente relevante. La sobredosis también puede hacer que el sistema inmunitario genere anticuerpos neutralizantes que inactiven la neurotoxina impidiendo que alivien la actividad muscular involuntaria. Se ha demostrado que la tolerancia inmunitaria a la toxina botulínica se correlaciona con dosis acumulativas.

Las neurotoxinas clostrídicas presentes todavía se producen predominantemente mediante procesos de fermentación utilizando cepas de *Clostridium* apropiadas. Sin embargo, la producción industrial de neurotoxina clostrídica a partir del cultivo anaeróbico de *Clostridium* es un proceso engorroso y lento. Debido a la alta toxicidad del producto final, el procedimiento debe realizarse en condiciones estrictas de confinamiento. Durante el proceso de fermentación, los precursores monocatenarios se escinden proteolíticamente mediante una proteasa clostrídica desconocida para obtener la neurotoxina clostrídica bicatenaria biológicamente activa. El grado de activación de la neurotoxina alcanzado mediante la escisión proteolítica varía entre diferentes cepas y serotipos de neurotoxina, lo que supone una consideración importante para la fabricación debido a la necesidad de preparaciones de neurotoxina con una actividad biológica bien definida. Además, durante los procesos de fermentación que utilizan cepas de *Clostridium*, las neurotoxinas clostrídicas se producen como complejos de proteínas, en los que el componente neurotóxico está integrado en proteínas auxiliares. Estas proteínas auxiliares no tienen ningún efecto ventajoso sobre la actividad biológica o la duración del efecto. Sin embargo, pueden desencadenar una reacción inmunitaria en el paciente, dando lugar a inmunidad contra la neurotoxina clostrídica. La fabricación de neurotoxinas clostrídicas recombinantes, no integradas en proteínas auxiliares podría, por lo tanto, ser ventajosa.

Los métodos para la expresión recombinante de neurotoxinas clostrídicas en *E. coli* son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, WO 00/12728, WO 01/14570 o WO 2006/076902). Además, las neurotoxinas clostrídicas se han expresado en sistemas de expresión eucarióticos, como en *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Saccharomyces cerevisiae*, células de insecto y células de mamífero (véase WO 2006/017749).

Las neurotoxinas botulínicas recombinantes pueden expresarse como precursores monocatenarios, que posteriormente deben escindirse proteolíticamente para obtener la neurotoxina botulínica biológicamente activa final. Por lo tanto, las neurotoxinas botulínicas pueden expresarse con un alto rendimiento en bacterias de crecimiento rápido como polipéptidos monocatenarios relativamente no tóxicos.

Además, podría ser ventajoso modificar las características de la neurotoxina botulínica con respecto a la actividad biológica, la especificidad celular, el potencial antigénico y la duración del efecto mediante ingeniería genética para obtener neurotoxinas recombinantes con nuevas propiedades terapéuticas en áreas clínicas específicas. La modificación genética de las neurotoxinas botulínicas puede permitir alterar el modo de acción o ampliar la gama de dianas terapéuticas.

Las variantes de toxina botulínica que presentan una duración del efecto y una actividad biológica específica en el tejido neuromuscular superiores al de las toxinas botulínicas de origen natural serían muy ventajosas para reducir la frecuencia de administración y la incidencia de la generación de anticuerpos neutralizantes ya que la tolerancia inmunitaria a la toxina botulínica se correlaciona con dosis acumulativas.

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

Existe una gran demanda de producir nuevas neurotoxinas botulínicas serotipo A con una mayor duración de efecto y con propiedades mejoradas, para permitir el aprovechamiento del potencial terapéutico del serotipo A de la BoNT, que hasta ahora se ha considerado poco práctico para cierta aplicación clínica. De forma ideal, el aumento en la duración

del efecto de una neurotoxina botulínica con serotipo A concreta podría ajustarse de forma personalizada para abordar cualesquiera características y demandas particulares de una indicación dada, tal como la cantidad de neurotoxina que se administra, frecuencia de administración, etc. Además, sería deseable producir neurotoxinas botulínicas con serotipo A que presenten una mayor duración de efecto que las toxinas botulínicas con serotipo A de aparición natural con una elevada actividad biológica específica. Hasta la fecha, tales aspectos no se han resuelto satisfactoriamente.

Objetos de la invención

Un objeto de la invención era superar los inconvenientes ilustrados anteriormente. En particular, era un objeto de la invención proporcionar neurotoxinas botulínicas de serotipo A recombinantes que presenten una duración de efecto superior al de las toxinas botulínicas de aparición natural con una elevada actividad biológica específica en el tejido neuromuscular y establecer un método fiable y preciso para fabricar y obtener dichas neurotoxinas botulínicas recombinantes. Dicho método y las neurotoxinas botulínicas nuevas precursoras utilizadas en dichos métodos servirían para satisfacer la gran necesidad de neurotoxinas botulínicas recombinantes que muestren una mayor duración del efecto con una elevada actividad biológica específica.

Resumen de la invención

Los serotipos de toxina botulínica de aparición natural muestran duraciones de efecto muy divergentes, probablemente debido a su distinta localización subcelular. BoNT/A presenta la persistencia más larga y se ha demostrado su localización en las proximidades de la membrana plasmática de las células neuronales. Sin embargo, factores adicionales tales como degradación, propagación o difusión y/o las velocidades de translocación podrían tener un impacto decisivo en las diferencias en la duración de los serotipos individuales de toxina botulínica.

Hasta ahora, excepto para el enfoque descrito y reivindicado en WO 2015/132004, no hay disponible ningún método generalmente aplicable para modificar las neurotoxinas clostrídicas para aumentar la duración de su efecto. Según WO 2015/132004, una neurotoxina botulínica recombinante que comprende un dominio que consiste en restos de prolina (P), alanina (A) y serina (S) (a continuación en la memoria neurotoxinas botulínicas “PASiladas”) presenta una mayor duración del efecto en comparación con una neurotoxina botulínica de tipo salvaje correspondiente, pero se ha demostrado que dicha “neurotoxina botulínica” “PASilada” también presenta una menor potencia específica, es decir, una actividad biológica específica menor en comparación con la neurotoxina botulínica de tipo salvaje correspondiente. Esto significa, en un entorno clínico, que debe inyectarse una mayor cantidad de tal neurotoxina botulínica modificada a un sujeto/paciente para lograr el mismo efecto paralizante en comparación con una neurotoxina botulínica de tipo salvaje, lo que a su vez aumenta el riesgo de generar anticuerpos neutralizantes que inactiven la neurotoxina.

Sorprendentemente, se ha descubierto que pueden obtenerse mediante una modificación doble neurotoxinas botulínicas recombinantes de serotipo A con una mayor duración de efecto en comparación con una neurotoxina botulínica de tipo salvaje correspondiente y con una alta potencia específica, es decir, una elevada actividad biológica específica. Por una parte, estas neurotoxinas comprenden al menos dos dominios adicionales que consisten en restos de prolina, alanina y serina. En segundo lugar, estas neurotoxinas según la invención comprenden al menos una modificación de aminoácido situada en el exosítio alfa y/o en el exosítio beta de la cadena ligera de la neurotoxina.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a una neurotoxina botulínica recombinante de serotipo A que comprende al menos dos dominios, en donde cada dominio comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en entre 70 y 260 restos aminoácidos, especialmente 100 restos aminoácidos, 150 restos aminoácidos o 200 restos aminoácidos, en donde dicha secuencia de aminoácidos consiste en restos de prolina, alanina y serina y en donde la neurotoxina comprende además seis modificaciones de aminoácido en el exosítio alfa de la cadena ligera de la neurotoxina en las posiciones D102, T109, K340, I348, N353, K356, en donde estos aminoácidos se sustituyen como sigue D102F, T109R, K340M, I348L, N353M, K356R y cuatro modificaciones de aminoácido en el exosítio beta de la cadena ligera de la neurotoxina en las posiciones G169, T220, P239, S254, en donde estos restos aminoácidos se sustituyen como sigue G169I, T220R, P239M, S254T, en donde la neurotoxina botulínica de serotipo A recombinante tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 95 % con la parte correspondiente de la neurotoxina botulínica de serotipo A parental, y en donde la neurotoxina botulínica de serotipo A recombinante produce tanto (i) un aumento en la duración del efecto respecto a una neurotoxina botulínica de serotipo A de tipo salvaje como (ii) un aumento en la actividad biológica específica con respecto a una neurotoxina botulínica de serotipo A que comprende dos dominios que consisten en restos de prolina, alanina y serina sin dichas modificaciones en el exosítio alfa y/o en el exosítio beta de la cadena ligera de la neurotoxina.

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

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

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para generar la neurotoxina botulínica recombinante de la presente invención que comprende la etapa de obtener una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica una neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante precursora de serotipo A modificando la secuencia la secuencia de ácido nucleico de la neurotoxina botulínica de serotipo A como corresponda.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante de serotipo A que comprende al menos dos dominios adicionales en donde cada dominio comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 50 restos aminoácidos, en donde dicha secuencia de aminoácidos consiste en al menos una prolina, al menos una alanina y al menos un resto de aminoácido adicional, seleccionado del grupo que consiste en serina, treonina, tirosina y glutamina, y un exosito alfa y/o exosito beta modificado de la cadena ligera.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica la neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante de serotipo A precursora de la presente invención.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un método para obtener la secuencia de ácido nucleico de la presente invención, que comprende la etapa de añadir secuencias de ácido nucleico a la cadena pesada y la cadena ligera y además modificar una secuencia de ácido nucleico que codifica el exosito alfa y/o el exosito beta de la cadena ligera de la neurotoxina botulínica de serotipo A parental.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico de la presente invención, o la secuencia de ácido nucleico que puede obtenerse mediante el método de la presente invención.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una célula huésped recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico de la presente invención, pudiendo obtenerse la secuencia de ácido nucleico mediante el método de la presente invención o mediante el vector de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir la neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante precursora de la presente invención, que comprende la etapa de expresar la secuencia de ácido nucleico de la presente invención, o la secuencia de ácido nucleico que puede obtenerse mediante el método de la presente invención, o el vector de la presente descripción en una célula huésped recombinante, o cultivando la célula huésped recombinante de la presente invención en condiciones que dan lugar a la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico.

Figuras

Figura 1: Presentación esquemática de una toxina botulínica A modificada (MaJ007 = PAS100-BoNT/A (D102F T109R K340M I348L N353M K356R) -PAS100 = PAS100-BoNT/A - ISA2- PAS100), en donde tanto la cadena ligera (LC) como la cadena pesada (HC) comprenden, cada una, una secuencia de aminoácidos adicional que consiste en 100 restos aminoácidos, en donde dicha secuencia de aminoácidos consiste en restos de prolina (P), alanina (A) y serina (S) (PAS) y en donde la cadena ligera (LC) comprende seis modificaciones de aminoácido situadas en el exosito alfa en las posiciones D102, T109, K340, I348, N353, K356, en donde estos aminoácidos están sustituidos como sigue D102F, T109R, K340M, I348L, N353M, K356R.

Figura 2: SDS PAGE de BoNT/A MaJ007 purificado (PAS100-BoNT/A - ISA2- PAS100). Carril 1: Marcador de peso molecular. Antes de aplicar las muestras al gel, se añadió β -mercaptoetanol. El carril "v.A." (antes de la activación): PAS100-BoNT/A - ISA2- PAS100 monocatenaria, purificada no activada. Los carriles "n.A." (después de la activación) y "n.R." (después de la purificación) muestran la cadena ligera (LC) y la cadena pesada (HC) obtenidas después de la activación por trombina en condiciones reductoras.

Figura 3: Presentación esquemática de una toxina botulínica PAS100-BoNT modificada (G169I, T220R, P239M, S254T) -PAS(100) = PAS100-BoNT/A - ISA5- PAS(100), en donde tanto la cadena ligera (LC) como la cadena pesada (HC) comprenden, cada una de ellas, una secuencia de aminoácidos adicional que consiste en 100 restos aminoácidos, en donde dicha secuencia de aminoácidos consiste en restos de prolina, alanina y serina (PAS) y en donde la cadena ligera (LC) comprende cuatro modificaciones de aminoácidos situadas en el exosito beta en las posiciones G169, T220, P239, S254, en donde estos aminoácidos se sustituyen como sigue G169I, T220R, P239M, S254T.

Figura 4: SDS PAGE de BoNT/A MaJ024 purificada (PAS100-BoNT/A - ISA5- PAS(100). Carril 1: Marcador de peso molecular. Antes de aplicar las muestras al gel, se añadió β -mercaptoetanol. Carril "v.A." (antes de la activación): PAS100-BoNT/A - ISA5- PAS(100) monocatenaria, purificada no activada. Los carriles "n.A." (después de la activación) y "n.R." (después de la purificación) muestran la cadena ligera (LC) y la cadena pesada (HC) obtenidas después de la activación por trombina en condiciones reductoras.

Figura 5: Ensayo de carrera en ratones con BoNT/A PAS100-BoNT/A-ISA5-PAS100 (MaJ024)

Descripción detallada de la invención

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

En un aspecto, la presente invención se refiere a una neurotoxina botulínica recombinante de serotipo A que comprende al menos dos dominios, en donde cada dominio comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en entre 70 y 260 restos aminoácidos, especialmente 100 restos aminoácidos, 150 restos aminoácidos o 200 restos aminoácidos, en donde dicha secuencia de aminoácidos consiste en restos de prolina, alanina y serina, en donde la neurotoxina comprende además seis modificaciones de aminoácido en el exosito alfa de la cadena ligera de la neurotoxina en las posiciones D102, T109, K340, I348, N353, K356, en donde estos aminoácidos se sustituyen como sigue D102F, T109R, K340M, I348L, N353M, K356R y cuatro modificaciones de aminoácidos en el exosito beta de la cadena ligera de la neurotoxina en las posiciones G169, T220, P239, S254, en donde estos restos aminoácidos se sustituyen como sigue G169I, T220R, P239M, S254T, en donde la neurotoxina botulínica de serotipo A tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 95 % con la parte correspondiente de la neurotoxina botulínica de serotipo A parental, y en donde la neurotoxina botulínica de serotipo A produce tanto (i) un aumento en la duración del efecto respecto a una neurotoxina botulínica de serotipo A de tipo salvaje como (ii) un aumento en la actividad biológica específica con respecto a una neurotoxina botulínica de serotipo A que comprende dos dominios que consisten en restos de prolina, alanina y serina sin dichas modificaciones en el exosito alfa y/o en el exosito beta de la cadena ligera de la neurotoxina.

En el contexto de la presente invención, la expresión “neurotoxina botulínica de serotipo A” se refiere a una neurotoxina de serotipo A natural que puede obtenerse a partir de bacterias *Clostridium botulinum*, o a una neurotoxina que puede obtenerse de fuentes alternativas, incluido de tecnologías recombinantes o de modificación genética o química. Especialmente, las neurotoxinas botulínicas tienen una actividad biológica específica, es decir, actividad endopeptidasa.

Las neurotoxinas botulínicas se producen como precursores monocatenarios que son escindidos proteolíticamente por una endoproteasa clostrídica desconocida dentro de la región de bucle para obtener la forma bicatenaria unida por puente disulfuro biológicamente activa de la neurotoxina, que comprende dos elementos de cadena, una cadena ligera funcionalmente activa y una cadena pesada funcionalmente activa, donde un extremo de la cadena ligera está unido a un extremo de la cadena pesada sin enlace peptídico, sino mediante un enlace disulfuro.

En el contexto de la presente invención, la expresión “cadena ligera de neurotoxina botulínica” se refiere a aquella parte de una neurotoxina botulínica de serotipo A que comprende una actividad endopeptidasa responsable de escindir una o más proteínas que forman parte del denominado complejo SNARE implicado en el proceso que da lugar a la liberación de neurotransmisores en la hendidura sináptica: En neurotoxinas botulínicas naturales, la cadena ligera tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa.

En el contexto de la presente invención, la expresión “exosito alfa de la cadena ligera” se refiere a cuatro alfa-hélices de la LC (102-113, 310-321, 335-348 y 351-358) que intersecan un motivo helicoidal de SNAP-25 que está aproximadamente a 30-50 aminoácidos de distancia del sitio de escisión de SNAP-25 que interactúa con el sustrato SNAP25 (véase Xue S, Javor S, Hixon MS, Janda KD, Probing BoNT/A protease exosites: implications for inhibitor design and light chain longevity. *Biochemistry*. 2014; 53(43):6820-4).

En el contexto de la presente invención, el término “exosito beta de la cadena ligera” se refiere a una región de lámina beta situada en una lámina beta cercana al sitio activo que interactúa con el sustrato SNAP25 que comprende AS 162-254 (véase Breidenbach MA1, Brunger AT. Substrate recognition strategy for botulinum neurotoxin serotype A, *Nature*. 2004, 432(7019):925-9).

En el contexto de la presente invención, la expresión “cadena pesada de neurotoxina botulínica” se refiere a la parte de una neurotoxina botulínica de serotipo A responsable de la entrada de la neurotoxina en la neurona: En neurotoxinas botulínicas de aparición natural, la cadena pesada tiene un peso molecular de aproximadamente 100 kDa.

En el contexto de la presente invención, la expresión “cadena de neurotoxina botulínica funcionalmente activa” se refiere a una cadena de neurotoxina botulínica de serotipo A recombinante capaz de realizar las funciones biológicas de una cadena de neurotoxina botulínica del serotipo A de aparición natural en al menos aproximadamente un 50 %, especialmente en al menos aproximadamente un 60 %, en al menos aproximadamente un 70 %, en al menos aproximadamente un 80 %, y lo más especialmente en al menos aproximadamente un 90 %, donde las funciones biológicas de las cadenas de neurotoxina botulínica incluyen, aunque no de forma limitativa, la unión de la cadena pesada a la neurona, la entrada de la neurotoxina en una neurona, la liberación de la cadena ligera de la neurotoxina bicatenaria y la actividad endopeptidasa de la cadena ligera. Pueden encontrarse métodos para determinar la actividad neurotóxica, por ejemplo, en WO 95/32738, que describe la reconstitución de cadenas ligeras y pesadas obtenidas por separado de la toxina tetánica y la toxina botulínica. También los métodos de ensayo celulares que se describen, por ejemplo, en WO2009/114748, WO 2013/049508 y WO2014/207109.

En el contexto de la presente invención, el término “alrededor de” o “aproximadamente” significan dentro del 20 %, de forma alternativa dentro del 10 %, incluyendo dentro del 5 %, de un valor o intervalo dado. De forma alternativa, especialmente en sistemas biológicos, el término “aproximadamente” significa dentro de una unidad logarítmica (es decir, un orden de magnitud), incluyendo dentro de un factor de dos de un valor dado.

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

En el contexto de la presente invención, el término “comprende” o “que comprende” significa “que incluye, aunque no de forma limitativa”. El término pretende ser abierto, para especificar la presencia de cualesquiera características, elementos, números enteros, etapas o componentes citados, pero no para excluir la presencia o adición de una o más características, elementos, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos. El término “que comprende” incluye por lo tanto los términos más restrictivos “que consiste en” y “que consiste esencialmente en”.

La neurotoxina botulínica de serotipo A recombinante según la invención comprende las siguientes seis modificaciones en el exosito alfa de la cadena ligera:

- (i) La modificación D102F (el ácido aspártico en la posición 102 de la cadena ligera es sustituido por una fenilalanina),
- (ii) La modificación T109R (la treonina en la posición 109 es sustituida por una arginina),
- (iii) La modificación K340M (la lisina en la posición 340 es sustituida por una metionina),
- (iv) La modificación I348L (la isoleucina en la posición 348 de la cadena ligera es sustituida por una leucina),
- (v) La modificación N353M (la asparagina en la posición 353 de la cadena ligera es sustituida por una metionina),
- (vi) La modificación K356R (la lisina en la posición 356 de la cadena ligera es sustituida por una arginina).

La neurotoxina botulínica de serotipo A recombinante según la invención comprende las siguientes cuatro modificaciones en el exosito beta de la cadena ligera:

- (i) modificación G169I (la glicina en la posición 169 de la cadena ligera es sustituida por una isoleucina),
- (ii) modificación T220R (la treonina en la posición 220 es sustituida por una arginina),
- (iii) modificación P239M (la prolina en la posición 239 es sustituida por una metionina),
- (iv) modificación S254T (la serina en la posición 254 de la cadena ligera es sustituida por una treonina).

La neurotoxina botulínica de serotipo A recombinante según la invención comprende dos dominios, en donde cada dominio comprende una secuencia de aminoácidos que consiste de entre 70 y 260 restos aminoácidos, especialmente 100 restos aminoácidos, 150 restos aminoácidos o 200 restos aminoácidos, en donde dicha secuencia de aminoácidos consiste en restos de al menos una prolina, al menos una alanina y al menos una serina.

En realizaciones particulares, la neurotoxina botulínica de serotipo A recombinante según la invención comprende dos dominios en donde cada dominio comprende una secuencia de aminoácidos que consiste de entre 70 y 150 restos aminoácidos o entre 80 y 120 restos aminoácidos o entre 90 y 110 restos aminoácidos, en donde dicha secuencia de aminoácidos consiste en restos de al menos una prolina, al menos una alanina y al menos una serina.

En el contexto de la presente invención, la expresión “variante funcional de una neurotoxina botulínica” se refiere a una neurotoxina botulínica de serotipo A que difiere en la secuencia de aminoácidos y/o en la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una neurotoxina botulínica de serotipo A, pero aún funcionalmente activa. En el contexto de la presente invención, la expresión “funcionalmente activa” se refiere a la propiedad de una neurotoxina botulínica de serotipo A recombinante de presentar una actividad biológica de al menos aproximadamente un 20 %, especialmente de al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 % y más especialmente al menos aproximadamente un 90 % de la actividad biológica de una neurotoxina botulínica de origen natural precursora, es decir, una neurotoxina botulínica de serotipo A precursora sin modificaciones en el extremo C de la cadena ligera, donde las funciones biológicas incluyen, aunque no de forma limitativa, la unión al receptor de la neurotoxina, la entrada de la neurotoxina en una neurona, la liberación de la cadena ligera de la neurotoxina bicatenaria y la actividad endopeptidasa de la cadena ligera y, por lo tanto, la inhibición de la liberación del neurotransmisor procedente de la célula nerviosa afectada. Los ensayos in vivo para evaluar la actividad biológica incluyen el ensayo DL50 en ratones y el ensayo de hemidiafragma ex vivo en ratones, como se describe en Pearce y col. (Pearce 1994, Toxicol. Appl. Pharmacol. 128: 69-77) y Dressier y col. (Dressier 2005, Mov. Disord. 20:1617-

1619, Keller 2006, Neuroscience 139: 629-637) o en un ensayo celular como se describe en WO2009/114748, WO2014/207109 o WO 2013/049508. La actividad biológica se expresa habitualmente en Unidades de ratón (MU). Como se utiliza en la presente memoria, 1 MU es la cantidad de componente neurotóxico que mata al 50 % de una población de ratón especificada después de la inyección intraperitoneal, es decir, la DL50 i.p. en ratones.

Para la proteína, una variante funcional mantendrá características clave de la neurotoxina botulínica de serotipo A correspondiente, tales como restos clave para la actividad endopeptidasa en la cadena ligera, o restos clave para la unión a los receptores de neurotoxina o para la translocación a través de la membrana endosómica en la cadena pesada, pero puede contener modificaciones que comprenden una sustitución de uno o más aminoácidos de la neurotoxina botulínica correspondiente.

En otra realización, la variante funcional de una neurotoxina botulínica de serotipo A comprende adicionalmente un péptido señal. Normalmente, dicho péptido señal estará situado en el extremo N-terminal de la neurotoxina. Muchos de dichos péptidos señal son conocidos en la técnica y están comprendidos por la presente invención. En particular, el péptido señal da lugar al transporte de la neurotoxina a través de una membrana biológica, tal como la membrana del retículo endoplásmico, la membrana del Golgi o la membrana plasmática de una célula eucariota o procariota. Se ha descubierto que los péptidos señal, cuando se unen a la neurotoxina, median la secreción de la neurotoxina en el sobrenadante de las células. En determinadas realizaciones, el péptido señal se escindirá en el transcurso de, o después de, la secreción, de modo que la proteína secretada carece del péptido señal N-terminal, se compone de cadenas ligeras y pesadas separadas, que están unidas covalentemente por puentes disulfuro, y es activa proteolíticamente.

La variante funcional tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 95 % con la parte correspondiente de la neurotoxina botulínica de serotipo A. Los métodos y algoritmos para determinar la identidad y/u homología de secuencia, incluyendo la comparación de variantes que tienen delecciones, adiciones y/o sustituciones relativas a una secuencia precursora, son bien conocidas por el experto en la técnica. El término "identidad", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la identidad de secuencia caracterizada por determinar el número de aminoácidos idénticos entre dos secuencias de ácido nucleico o dos secuencias de aminoácidos en donde las secuencias están alineadas de modo que se obtiene la coincidencia de orden más alto. Puede calcularse utilizando técnicas publicadas o métodos codificados en programas informáticos como, por ejemplo, BLASTP, BLASTN o FASTA (Altschul 1990, J Mol Biol 215, 403). Los valores de porcentaje de identidad, en un aspecto, se calculan en toda la secuencia de aminoácidos. El experto en la técnica 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 las alineaciones de secuencia, puede utilizarse el programa PileUp (Higgins 1989, CABIOS 5, 151) o los programas Gap y BestFit (Needleman 1970, J Mol Biol 48; 443; Smith 1981, Adv Appl Math 2, 482), que forman parte del paquete de software GCG (Genetics Computer Group 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU. 53711). Los valores de identidad de secuencia indicados anteriormente en porcentaje (%) deben determinarse, en otro aspecto de la invención, utilizando el programa GAP a lo largo de la totalidad de la región de secuencia con la siguiente configuración: Ponderación de hueco: 50, Ponderación de longitud: 3, Promedio de emparejamiento correcto: 10,000 y Promedio de emparejamiento incorrecto: 0,000, que, salvo que se indique lo contrario, siempre se utilizarán como configuraciones estándar para alineamientos de secuencia. En cuanto al ADN, las secuencias de ácido nucleico que codifican el homólogo funcional y la neurotoxina botulínica precursora pueden diferir en mayor medida debido a la degeneración del código genético. Se sabe que el uso de codones es diferente entre organismos procarióticos y eucarióticos. Por lo tanto, cuando se expresa una proteína procariota, como una neurotoxina botulínica, en un sistema de expresión eucariota, puede ser necesario, o al menos útil, adaptar la secuencia de ácido nucleico al uso de codones de la célula huésped de expresión, lo que significa que la identidad de secuencia o la homología puede ser bastante baja para el ácido nucleico.

En el contexto de la presente invención, el término "variante" se refiere a una neurotoxina botulínica de serotipo A que es un derivado química, enzimática o genéticamente modificado de una neurotoxina correspondiente de la neurotoxina botulínica de serotipo A de *C. botulinum*. Un derivado químicamente modificado puede ser uno que se modifica mediante piruvación, fosforilación, sulfatación, lipidación, pegilación, glucosilación y/o la adición química de un aminoácido o un polipéptido que comprende entre 2 y aproximadamente 100 aminoácidos, incluyendo la modificación que se produce en la célula huésped eucariota utilizada para expresar el derivado. Un derivado modificado enzimáticamente es aquel que es modificado por la actividad de enzimas, tales como enzimas endoproteolíticas o exoproteolíticas, incluida la modificación por enzimas de la célula huésped eucariota utilizada para expresar el derivado. Como se ha señalado anteriormente, un derivado genéticamente modificado es uno que se ha modificado por delección o sustitución de uno o más aminoácidos contenidos en, o mediante la adición de uno o más aminoácidos (incluyendo polipéptidos que comprenden entre 2 y aproximadamente 100 aminoácidos) a, la secuencia de aminoácidos de dicha neurotoxina botulínica. Los métodos para diseñar y construir tales derivados modificados química o genéticamente y para ensayar dichas variantes para determinar la funcionalidad son bien conocidos por el experto en la técnica.

La neurotoxina botulínica de serotipo A recombinante según la invención se utiliza en el tratamiento de una enfermedad que requiere una mejora de la quimiodenervación, en donde la neurotoxina recombinante provoca (i) una mayor duración de efecto con respecto a una neurotoxina botulínica de serotipo A de tipo salvaje y (ii) una mayor actividad biológica específica en relación con una neurotoxina botulínica de serotipo A que comprende dos dominios que consisten en restos de prolina, alanina y serina sin dichas modificaciones en el exosito alfa y/o en el exosito beta de la cadena ligera de la neurotoxina.

En el contexto de la presente invención, el término “mayor duración de efecto” o “mayor duración de acción” se refiere a una denervación duradera mediada por una neurotoxina botulínica de serotipo A de la presente invención. Por ejemplo, como se describe en la presente memoria, la administración de una neurotoxina botulínica de serotipo A bicatenaria unida por disulfuro que comprende dos dominios según la invención da lugar a una parálisis localizada durante un período de tiempo más largo en relación con la administración de una neurotoxina botulínica de serotipo A bicatenaria unida por disulfuro sin los al menos dos dominios según la presente invención.

En el contexto de la presente invención, la expresión “aumento en la duración de efecto/acción” se define como más de aproximadamente 20 %, especialmente más de aproximadamente 50 %, más especialmente más de aproximadamente 90 % de aumento en la duración del efecto de la neurotoxina recombinante de la presente invención con respecto a la neurotoxina idéntica sin los dos dominios según la invención. Por ejemplo, una “aumento en la duración de efecto” puede determinarse utilizando el “ensayo de carrera en ratones”. El “ensayo de carrera en ratones” es bien conocido por el experto en la técnica y mide la distancia de recorrida diariamente por un ratón en una cinta de correr después de inyectar una neurotoxina botulínica en el gastrocnemio (véase Keller JE. Recovery from botulinum neurotoxin poisoning in vivo. Neuroscience. 12 de mayo de 2006 12;139(2):629-37). La distancia que puede recorrer un ratón en la cinta de correr el día antes de inyectar la neurotoxina botulínica se toma como comparación y se establece como 100 %. Una distancia recorrida no superior al 80 % de la distancia recorrida inicial se considera parálisis del músculo. La duración del efecto está determinada por el período de tiempo entre el momento en que se alcanza la mitad de la parálisis máxima, es decir, aproximadamente 40 % de la distancia inicial de carrera y el momento en que la parálisis alcanza la recuperación, es decir, el 40 % de la distancia inicial de carrera. Si este período de tiempo es superior a 2 días en comparación con la norma (BoNT natural), se considera que la neurotoxina botulínica presenta un “aumento en la duración de efecto/acción” siempre que la BoNT mutada presente una potencia similar, es decir, una parálisis máxima similar (reducción de la distancia recorrida) de aproximadamente 80-90 %.

En el contexto de la presente invención, la “actividad endoproteasa específica” se mide en un ensayo que se describe en Jones y col. (J Immunol Methods. 1 Ene 2008;329(1-2):92-101) y Hallis y col. (J Clin Microbiol. 1996 (8):1934-8; 1996) y se describe adicionalmente más adelante en el ejemplo 2.

En el contexto de la presente invención, el término “actividad endoproteasa específica disminuida” se define como una cantidad de producto de escisión al menos un 20 % menor producida por un mutante de BoNT/A en el ensayo de endoproteasa en comparación con de BoNT/A de tipo salvaje aplicando la misma cantidad de proteína.

En el contexto de la presente invención, la expresión “actividad biológica específica” se refiere a la “actividad endoproteasa específica” mencionada anteriormente y puede obtenerse también de la parálisis máxima mostrada en el “Ensayo de carrera en ratones” descrito anteriormente.

En el contexto de la presente invención, el término “denervación” se refiere a la denervación resultante de la administración de un agente de quimiodenervación, por ejemplo, una neurotoxina.

En el contexto de la presente invención, el término “denervación localizada” o “parálisis localizada” se refiere a la denervación de una región anatómica concreta, generalmente un músculo o un grupo de músculos anatómica y/o fisiológicamente relacionados, resultado de la administración de un agente quimiododenervante, por ejemplo, una neurotoxina, a la región anatómica concreta.

Sin pretender imponer ninguna teoría, las neurotoxinas botulínicas recombinantes de la presente invención pueden mostrar una semivida biológica aumentada, tasas de degradación reducidas, tasas de difusión disminuidas, captación aumentada en neuronas y/o tasas de translocación intracelular modificadas, en cada caso vinculadas a una neurotoxina clostrídica precursora idéntica sin los al menos dos dominios según la invención.

En el contexto de la presente invención, la expresión “semivida biológica” especifica la vida útil de una proteína, por ejemplo de una neurotoxina botulínica de serotipo A, *in vivo*. En el contexto de la presente invención, el término “semivida biológica” se refiere al período de tiempo durante el cual la mitad de un conjunto de proteínas se degrada *in vivo*. Por ejemplo, se refiere al período de tiempo en el cual se degrada la mitad de la cantidad de neurotoxina botulínica de una dosis administrada.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición, en particular una composición farmacéutica o cosmética que comprende la neurotoxina botulínica recombinante de la presente invención. Para preparar una preparación que comprende una neurotoxina botulínica de serotipo A, la toxina puede formularse mediante diversas técnicas dependiendo de los propósitos de aplicación deseados que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido de neurotoxina botulínica (biológicamente activo) puede utilizarse junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables como una composición farmacéutica. El uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con el resto de ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor de los mismos. 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, goma arábica, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Ejemplos de vehículos líquidos son glicerol, solución

salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones, diversos tipos de agentes humectantes y similares. Los vehículos adecuados comprenden los mencionados anteriormente y otros bien conocidos en la técnica, véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania. En un aspecto, la composición farmacéutica puede disolverse en un diluyente, antes de la administración. El diluyente también se selecciona para que no afecte a la actividad biológica del producto de neurotoxina. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada o solución salina fisiológica. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares. Por lo tanto, el producto de neurotoxina formulado puede estar presente, en un aspecto, en forma líquida o liofilizada. En un aspecto, puede estar presente junto con glicerol, estabilizantes proteínicos (HSA) o estabilizantes no proteínicos como polivinilpirrolidona (PVP), ácido hialurónico o aminoácidos libres. En un aspecto, en WO 2005/007185 o WO 2006/020208 se describen estabilizantes no proteínicos adecuados. El producto de neurotoxina formulado puede utilizarse para terapia humana o animal de diversas enfermedades o trastornos en una dosis terapéuticamente eficaz o con fines cosméticos.

En realizaciones particulares, la neurotoxina botulínica recombinante de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención es para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección entre la lista de: distonía cervical (tortícolis espasmódica), blefaroespasma, hiperhidrosis axilar primaria grave, acalasia, dolor lumbar, hipertrofia benigna de próstata, neuropatías focales crónicas, migraña y otros trastornos de cefalea.

Indicaciones adicionales en las que el tratamiento con neurotoxinas botulínicas está actualmente en investigación y donde puede utilizarse la composición farmacéutica de la presente invención incluyen incontinencia pediátrica, incontinencia debido a vejiga sobreactiva, e incontinencia debido a vejiga neurogénica, fisura anal, trastornos espásticos asociados con lesión o enfermedad del sistema nervioso central incluyendo traumatismos, ictus, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson o parálisis cerebral, distonías localizadas que afectan a las extremidades, rostro, mandíbula o cuerdas vocales, trastornos de dolor en la articulación temporomandibular (TMJ), neuropatía diabética, cicatrización de heridas, salivación excesiva, disfunción de las cuerdas vocales, reducción del masetero para disminuir el tamaño de la mandíbula inferior, tratamiento y prevención del dolor de cabeza crónico y del dolor musculoesquelético crónico, tratamiento del ronquido, ayuda para la pérdida de peso aumentando el tiempo de vaciado gástrico.

Más recientemente, se han evaluado neurotoxinas clostrídicas para el tratamiento de otras indicaciones nuevas, por ejemplo, queloides dolorosos, dolor neuropático diabético, dolor de rodilla refractario, aplicación en la zona desencadenante de neuralgia del trigémino para controlar el dolor, cicatrización después de la cirugía con labio de hendidura, cáncer y depresión.

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

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar cosméticamente a un paciente, que comprende la etapa de administrar una composición que comprende una neurotoxina clostrídica recombinante según la presente invención a un paciente que desea dicho tratamiento cosmético

En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento cosmético" se refiere a usos en aplicaciones cosméticas o estéticas, tales como el tratamiento de arrugas, patas de gallo, líneas de entrecejo glabellares, reducción del músculo masetero, reducción de las pantorrillas, eliminación de asimetrías faciales, etc.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para generar la neurotoxina botulínica recombinante de la presente invención, que comprende la etapa de obtener una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica una neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante precursora mediante la inserción de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos dos dominios que consisten en prolina, alanina y restos aminoácidos adicionales, seleccionados del grupo que consiste en restos de serina, treonina, tirosina y glutamina en una secuencia de ácido nucleico que codifica una neurotoxina clostrídica precursora y modificando la secuencia de ácido nucleico que codifica una neurotoxina botulínica precursora en el exosito alfa y / o en el exosito beta de la cadena ligera.

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

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

En el contexto de la presente descripción, la expresión "neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante precursora" se refiere a una neurotoxina botulínica precursora monocatenaria que comprende al menos dos dominios que consisten en prolina, alanina y restos aminoácidos adicionales, seleccionados del grupo que consiste en restos de serina, treonina, tirosina y glutamina, y un exosito alfa y / o exosito beta modificado de la cadena ligera de la neurotoxina.

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

Las neurotoxinas botulínicas precursoras monocatenarias deben escindirse proteolíticamente para obtener las neurotoxinas botulínicas biológicamente activas finales. La escisión proteolítica puede ocurrir durante la expresión heteróloga por enzimas de la célula huésped, o mediante la adición de enzimas proteolíticas al material proteico en bruto aislado después de la expresión heteróloga. Las neurotoxinas botulínicas de origen natural contienen habitualmente una o más señales de escisión para proteasas que escinden postraduccionalmente la molécula precursora monocatenaria, de modo que puede formarse el complejo dimérico o multimérico final. Las neurotoxinas botulínicas presentes se siguen produciendo predominantemente mediante procesos de fermentación utilizando cepas de *Clostridium* apropiadas. Durante el proceso de fermentación, los precursores monocatenarios se escinden proteolíticamente mediante una proteasa clostrídica desconocida para obtener la neurotoxina clostrídica bicatenaria biológicamente activa. En los casos en los que la molécula precursora monocatenaria es precursora de una proteasa, puede producirse una escisión autocatalítica. De forma alternativa, la proteasa puede ser una enzima no clostrídica separada expresada en la misma célula. WO 2006/076902 describe la escisión proteolítica de un precursor monocatenario de una neurotoxina clostrídica recombinante en un sitio de reconocimiento y escisión heterólogos mediante incubación de un lisado de células hospedadoras *E. coli*. La escisión proteolítica es llevada a cabo por una proteasa de *E. coli* desconocida. En ciertas aplicaciones de expresión recombinante, los sitios de escisión de proteasa modificados se han introducido de forma recombinante en la región intercatenaria entre la cadena ligera y pesada de las toxinas clostrídicas, por ejemplo, sitios de escisión de proteasas para la trombina humana o proteasas no humanas (véase WO 01/14570).

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

En una realización particular de la presente descripción, la neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante de serotipo A comprende además una etiqueta de unión especialmente seleccionada del grupo que comprende: glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), una etiqueta de His, una estreptavidina, o una etiqueta FLAG.

En el contexto de la presente invención, la expresión “neurotoxina botulínica precursora” se refiere a una neurotoxina botulínica inicial sin modificaciones seleccionada de una neurotoxina botulínica natural, una variante funcional de una neurotoxina botulínica natural o una neurotoxina botulínica química.

En realizaciones particulares, el método para generar la neurotoxina botulínica recombinante de la presente invención comprende además la etapa de expresar de forma heteróloga dicha secuencia de ácido nucleico recombinante en una célula huésped, especialmente en una célula huésped bacteriana, más especialmente en una célula huésped de *E. coli*.

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

En realizaciones particulares, el método para generar la neurotoxina botulínica recombinante de la presente invención comprende adicionalmente al menos una de las etapas de (i) generar una neurotoxina botulínica recombinante bicatenaria unida por disulfuro según la invención haciendo o permitiendo el contacto de dicha neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante precursora con una endoproteasa y (ii) purificación de dicha neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante precursora o de dicha neurotoxina botulínica recombinante bicatenaria unida por disulfuro mediante cromatografía.

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

En el contexto de la presente invención, la expresión “producir ... poniendo en contacto de dicha neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante precursora ... con una endoproteasa” se refiere a un paso activo y/o directo de poner dicha neurotoxina y dicha endoproteasa en contacto, mientras que el término “que permite poner en contacto una neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante precursora ... con una endoproteasa” se refiere a una etapa indirecta de establecer condiciones de modo que dicha neurotoxina y dicha endoproteasa estén en contacto entre sí.

En el contexto de la presente invención, el término “endoproteasa” se refiere a una proteasa que escinde enlaces peptídicos de aminoácidos no terminales (es decir, dentro de la cadena polipeptídica). Como no atacan los aminoácidos terminales, las endoproteasas no pueden descomponer los péptidos en monómeros.

En realizaciones particulares, la escisión de la neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante precursora está casi completa.

5 En el contexto de la presente invención, la expresión “casi completa” se define como una escisión superior a aproximadamente 95 %, especialmente más de aproximadamente el 97,5 %, más especialmente más de aproximadamente el 99 % como se determina por SDS-PAGE y posterior Western Blot o cromatografía de fase invertida.

10 En realizaciones particulares, la escisión de la neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante precursora de la presente invención se produce en una señal de escisión heteróloga localizada en la región de bucle de la neurotoxina botulínica precursora recombinante.

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

15 En otras realizaciones particulares, la proteína precursora monocatenaria se purifica o se purifica parcialmente, especialmente en una primera etapa de enriquecimiento cromatográfico, antes de la reacción de escisión.

20 En el contexto de la presente invención, el término “purificado” se refiere a más de aproximadamente 90 % de pureza. En el contexto de la presente invención, la expresión “parcialmente purificado” se refiere a una pureza inferior a aproximadamente 90 % y un enriquecimiento de más de aproximadamente dos veces.

25 En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante de serotipo A que es un precursora de la neurotoxina botulínica recombinante de la presente invención. Por lo tanto, en dicho aspecto, la presente invención se refiere a una neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante precursora de serotipo A que comprende dos dominios que consisten en restos de prolina, alanina y aminoácidos adicionales, seleccionados del grupo que consiste en restos de serina, treonina, tirosina y glutamina, y un exosito alfa modificado y/o exosito beta de la cadena ligera de la neurotoxina.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para obtener la secuencia de ácido nucleico de la presente invención, que comprende la etapa de modificar una secuencia de ácido nucleico que codifica una neurotoxina botulínica de serotipo A.

35 En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico de la presente invención, o la secuencia de ácido nucleico que puede obtenerse mediante el método de la presente invención.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una célula huésped recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico que puede obtenerse mediante el método de la presente invención o el vector de la presente invención.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir la neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante precursora de la presente invención, que comprende la etapa de expresar la secuencia de ácido nucleico de la presente invención, o la secuencia de ácido nucleico que puede obtenerse mediante el método de la presente invención, o el vector de la presente invención en una célula huésped recombinante, o bien cultivar la célula huésped recombinante de la presente invención en condiciones que dan lugar a la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico.

Ejemplos

50 Ejemplo 1: Generación y purificación de una toxina botulínica PASilada de tipo A (PAS100-BoNT/A (D102F T109R K340M I348L N353M K356R) -PAS100)

La construcción de ácido nucleico que codifica un módulo “PAS” que comprende 100 restos aminoácidos construida a partir de los aminoácidos prolina (P), alanina (A) y serina (S) se produjo sintéticamente, en donde se utilizó el siguiente patrón (ASPAAPASPAAPSAPA). Utilizando enzimas de restricción NdeI y SmaI, se insertó primero el módulo génico correspondiente en el extremo N de BoNT/A recombinante (rBoNT/A). En una segunda etapa, el módulo PAS se insertó en el extremo C de la cadena pesada utilizando las enzimas de restricción BglII y AatI. Se verificó mediante secuenciación que la clonación era correcta. Para la expresión de BoNT/A en *E. coli*, las construcciones génicas se clonaron en pET29c. Las variantes contienen etiquetas de afinidad His6 y Strep fusionadas que pueden escindirse después de la purificación de proteínas mediante trombina. Para construir un plásmido para la expresión de BoNT/a, se utilizó un gen sintético con las mutaciones correspondientes de D102F T109R K340M I348L N353M K356R en la secuencia de BoNT/A1 natural y se utilizaron los sitios de restricción SmaI y SmaI.

Expresión y purificación de proteínas.

65

La expresión de variantes de rBoNT/A se realizó en medios Riesenberg con 50 µg/ml de kanamicina {Riesenberg, 1991, n.º 1}. Las células se cultivaron en matraces agitados (37 °C, 175 rpm) hasta que se alcanzó una DO600 de 1,5-2. Para la inducción de la expresión de proteínas se añadió IPTG 1 mM (Fermentas) al cultivo de *E. coli*. La síntesis de proteínas se llevó a cabo durante 24 h (15 °C, 175 rpm). Las células se recogieron por centrifugación (5000 rpm, 20 min, 4 °C) y se resuspendieron en tampón de unión a His pH 8,0 (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, imidazol 5 mM) que contenía inhibidor de proteasa exento de EDTA completo (Roche Diagnostics). Para la determinación de la actividad endopeptidasa y caracterización *in vivo*, se extrajeron y purificaron las diferentes variantes de la toxina. Se rompieron los sedimentos resuspendidos en 2-3 ciclos mediante un French Press Cell Disrupter (Thermo Electron Corporation) a 4 °C. Los extractos brutos resultantes se centrifugaron (20.000 rpm, 30 min, 4 °C) y se recuperaron los sobrenadantes con las proteínas solubles. La purificación de proteínas se llevó a cabo mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (GE Healthcare) utilizando los protocolos de purificación de tres etapas. La primera etapa de captura se realizó mediante IMAC utilizando una columna HisTrap HP de 1 ml (GE Healthcare). La columna se lavó (1 ml·min⁻¹ de flujo de trabajo) utilizando un protocolo de dos etapas con tampón de elución His (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, imidazol 400 mM pH 8,0). La elución de las proteínas de la toxina se produjo en imidazol 400 mM. En una etapa adicional, se realizó una cromatografía de afinidad de Strep-Tactina como se ha descrito anteriormente (IBA GmbH). Como alternativa, en vez de una segunda cromatografía de afinidad se utilizó una cromatografía de intercambio catiónico en una columna HiTrap SP HP 1 ml (GE Healthcare, Freiburg, Alemania). Las muestras correspondientes se diluyeron con tampón de unión SP (Tris 50 mM, pH 8) y se eluyeron con tampón de elución SP (Tris 50 mM, NaCl 1 M, pH 8). Este procedimiento fue seguido por una SEC utilizando una columna Superdex 200 10/300 (GE Healthcare). También se utilizó el tampón de migración SEC (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2,5 mM pH 7,7) para almacenar las soluciones de proteína purificadas en alícuotas a -20 °C. Cada proteína se analizó aplicando 0,5-1 µg en gradiente de SDS- PAGE al 4-12 % (Novex Life Technologies) y se tiñó con tinción segura de SimplyBlue de Coomassie G-250 (Pierce). Cada proteína se consideró pura >98 % antes de aplicar los experimentos *in vitro* o *in vivo*.

Escisión de la trombina

Las preparaciones de BoNT/A se activaron con trombina (Merck Millipore; 8 U/1 mg de BoNT) durante 24 h a 20 °C produciendo >99 % de toxina bicatenaria. Posteriormente, la proteasa de escisión se eliminó con el kit Strep-Tactin descrito anteriormente (IBA GmbH).

La expresión se realizó en la cepa de expresión *E. coli* BI21. La purificación se hizo utilizando una combinación de cromatografía de afinidad, intercambio iónico y de exclusión molecular, seguida de activación utilizando trombina. La Figura 2 resume los resultados de la purificación y activación.

Ejemplo 2: Determinación de la actividad endoproteínasa de BoNT/A de tipo salvaje y BoNT/A PASilada

La actividad de endoproteínasa específica de las variantes de BoNT/A de tipo salvaje y BoNT/A modificada se determinó mediante un ensayo que se describe en Jones RG, Ochiai M, Liu Y, Ekong T, Sesardic D. Development of improved SNAP25 endopeptidase immuno-assays for botulinum type A and E toxins. J Immunol Methods. 1 Ene 2008;329(1-2):92-101 y Hallis B, James BA, Shone CC Development of novel assays for botulinum type A and B neurotoxins based on their endopeptidase activities. J Clin Microbiol. 1996 (8): 1934-8. Se utilizó la solución TMB Ultra, de 1 etapa, de Perbio Science para la tinción y cuantificación. Se utilizó un fragmento C-terminal de 70 aminoácidos de SNAP25 procedente de IBA GmbH en la reacción como sustrato. El anticuerpo primario de ratón de R&D Systems reconoce específicamente los fragmentos de SNAP25 escindidos únicamente por BoNT/A. El anticuerpo secundario era un conjugado de anticuerpo contra IgG de ratón con HRP de Dianova. El ensayo se realizó en una placa de microtitulación de 96 pocillos, y la cantidad de material escindido se determinó después de 120 minutos midiendo la absorción a 450 nm (Molecular Devices, FilterMax F5). Para el ensayo se utilizaron cantidades iguales de proteínas.

Los resultados de las actividades endopeptidasa medidas se muestran en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1

Actividades exoproteínasa de mutantes

Lote	Construcción	Ensayo de endopeptidasa
Xeomin	BoNT/A [#] natural	100 %
DaSch021	PAS100-BoNT/A-PAS100	30-40 %
MaJ007	PAS(100)-BoNT/A-ISA2-PAS(100)	85-95 %

ISA2= (D102F T109R K340M I348L N353M K356R); N.º patrón

La Tabla 1 muestra que la actividad endoproteínasa específica de la toxina botulínica A PASilada aumentó por las mutaciones introducidas.

Ejemplo 3: Generación y purificación de una toxina botulínica de tipo A (PAS100-BoNT/A G169I, T220R, P239M, S254 -PAS100)

Se produjo sintéticamente la construcción de ácido nucleico que codifica un módulo “PAS” que comprende 100 restos aminoácidos contruidos a partir de los aminoácidos prolina (P), alanina (A) y serina (S), en donde se utilizó el siguiente patrón (ASPAAPAPASPAAPAPSAPA)₅. Utilizando enzimas de restricción Nel y SwaI, el módulo génico correspondiente se insertó primero en el extremo N de BoNT/A recombinante (rBoNT/A). En una segunda etapa, el módulo PAS se insertó en el extremo C de la cadena pesada utilizando las enzimas de restricción BglII y AatI. Se verificó mediante secuenciación que la clonación era correcta. Para la expresión de BoNT/A en *E. coli*, las construcciones génicas se clonaron en pET29c. Las variantes contienen etiquetas de afinidad His6 y Strep fusionadas que pueden escindir-se después de la purificación de proteínas mediante trombina. Para construir un plásmido para la expresión de BoNT/a, se utilizó un gen sintético con las mutaciones correspondientes de G169I, T220R, P239M, S254 en la secuencia de BoNT/A1 de tipo salvaje y se utilizaron los sitios de restricción SwaI y SmaI.

La expresión de proteínas se realizó como se ha descrito anteriormente (véase el Ejemplo 1) en la cepa de expresión *E. coli* BL21. La purificación se hizo utilizando una combinación de cromatografía de afinidad, intercambio iónico y de exclusión molecular, seguida de activación utilizando trombina. La Figura 3 resume los resultados de la purificación y activación.

Ejemplo 4: Duración del efecto de PAS100-BoNT/A (G169I, T220R, P239M, S254T) -PAS100 en el “Ensayo de carrera en ratones”

Se inyectaron dos dosis distintas de PAS100-BoNT/A (G169I, T220R, P239M, S254T) -PAS100 (=MaJ024), es decir, 6,0 pg y 9,0 pg en el gastrocnemio de cada ratón en comparación con el patrón Xeomin® (3 pg; 0,6 U) y toxina botulínica de tipo A PASilada sin las mutaciones introducidas (=Dasch021). Los ratones habían sido entrenados en una cinta de correr. La distancia recorrida diaria en la cinta de correr se midió durante 21 días. La parálisis causada por las toxinas se representó como porcentaje de la distancia recorrida en el día anterior a la inyección, que se estableció como 100 %, frente al tiempo (véase la Figura 5).

Como se muestra en la Figura 5, solo fueron necesarios 6 pg de PAS100-BoNT/A (G169I, T220R, P239M, S254T) -PAS (100) (=MaJ024) para lograr la misma parálisis en comparación con 9 pg de Dasch021 (BoNT/A PASilada sin las mutaciones introducidas), lo que indica que la potencia específica de MaJ024 había aumentado claramente en comparación con Dasch021.

Tabla 1: Secuencias

Id. de sec. n.º 1: BoNT recombinante A, incluida la etiqueta His

Id. de sec. n.º 2: PAS100-BoNT/A recombinante (D102F T109R K340M I348L N353M K356R) -PAS100 incluida la etiqueta His

Id. de sec. n.º 3: PAS100-BoNT recombinante (G169I, T220R, P239M, S254)-PAS100 incluida la etiqueta His

Id. de sec. n.º 4: PAS100-BoNT/A recombinante (D102F T109R K340M I348L N353M K356R) -PAS100 incluida la etiqueta His (secuencia de ácido nucleico)

Id. de sec. n.º 5: PAS100-BoNT/A recombinante (G169I, T220R, P239M, S254T)-PAS100 incluida la etiqueta His (secuencia de ácido nucleico)

Id. de sec. n.º 1:

MPFVNKQFNKYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMMPVKAFKIHNKIWWIPERDFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDYDSTY
LSTDNEKDNLYLKGVTKLFERIYSTD LGRMLLT SIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSRSEELNLVIIGPS
ADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNP LLGAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGI
AINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYM
KNVFKEKYLLEDSTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDAVKFKNIVPKVNYTIYDGFNL
RNTNLAANFNGQNTNINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGITSKAGAGKSLVPRGSAGAGALNDLCIKVNNWDLF
FSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISNENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKY
ELDKYTMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVKNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETS
EVSTDDKIADITIIPIYIPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVIDNALSKRN
EKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLRKKMKEALENQAEATKAIIYNYQYNTTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMI
NINKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPQLSKYVDNQ
RLLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVNYSMYENFST
SFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVS LNYGEIHWLTQDTQEIKQRVVFYKYSQMINISDYINRWIFVTITNNR
LNNSKIYINGRLIDQKPIISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIYFNLFDEKELNEKEIKDLYDNQSNNSGILKDFWG
DYLQYDKPYMYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIKKYASGNKDNIVRNNDNR
VYINVVVKNEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNNGNDIGFIFHQFNN
IAKLVASNWNRYRQIERSRSLTGCSEWEIFVDDGWGERPLGLVPRGSANSSSVDKLWSHPQFEKLEHHHHHHH

Id. de sec. n.º 2: PAS100-BoNT/A recombinante (D102F T109R K340M I348L N353M K356R) - PAS100 incluida la etiqueta His

5 MGSSHHHHHHGSLVPRSSSASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAP
SAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAAPFVNKQFNYPKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOP
VKAFKIHNKIWVIPERDFTTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDDSTYLSTDNEKDNLYKGVTKLFEIYSTFLGRMMLRS
10 IVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGYSRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGEVNLNLTNRNGYGSTQYIRFSP
DFTFGFEESLEVDTNPLLGAQKFDPAVTLAHELHAGHRLYGIAPNPRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGG
HDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTASLQYMKNVFEKYLLEDTSKGKFSVDKLFDMLYKMLT
ELYTEDMFVRFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLNLTNLAANFNGQNTNINNMNFTKLKNFTGLFE
FYKLLCVRGIITSKAGAGKSLVPRGSAGAGALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISL
DLIQYYLTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIEFNPNGKKEYLDKYTMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNVNEA
LLNPSRVYTFSSDYVKKVKNKATEAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPIYIGPALNIGNMMLYKDDFVG
15 ALIFSGAVILLEFIPIAIPVLGTALVSYIANKVLTVQTDNALSKEKWEDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLRKKMKEAL
ENQAEATKAIINYQYNYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASL
KDALLKYIDNRGTIGQVDRDKVNNLTLDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLYESNHLIDLSRYAS
KINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTFSWIRIPKYFNSISLNNEYTIINC MENNSGWKVS
LNYGEIWTLDQTEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLD
GCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNIGLKDFWGDYLDQYDKPYMMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYM
20 YLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPD
VGNLSQVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIFGHQFNIAKLVASNWYNRQIERSSRTLGCSEWEIFPVDD
GWGERPLASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAP
ASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAGDLVPRGSANSSSVDKLWVSHQFEK

25 Id. de sec. n.º 3: PAS100-BoNT recombinante (G169I, T220R, P239M, S254T) -PAS100 incluida la etiqueta His

30 MGSSHHHHHHGSLVPRSSSASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPA
ASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAAPFVNKQFNYPKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKI
WVIPERDFTTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDDSTYLSTDNEKDNLYKGVTKLFEIYSTDLGRMMLTSIVRGIPFWGGSTID
TELKVIDTNCINVIQPDGYSRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFIHEVLNLTNRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL
35 AGKFDPAVRLAHELHAGHRLYGIAPNPRVFKVNTNAYYEMTGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKF
KDIASTLNKAKSIVGTASLQYMKNVFEKYLLEDTSKGKFSVDKLFDKLYKMLTEIYTEDNFVKKFVLNRKTYLNFDKAV
FKINIVPKVNYTIYDGFNLNLTNLAANFNGQNTNINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKAGAGKSLVPRGSAGAGAL
NDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIE
RFPNGKKEYLDKYTMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVKNKATEAMFLGWVEQLVYDFT
DETSEVSTTDKIADITIIPIYIGPALNIGNMMLYKDDFVGALVSYIANKVLTVQTDNALSKEKWEDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLRKKMKEAL
40 ENQAEATKAIINYQYNYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASL
KDALLKYIDNRGTIGQVDRDKVNNLTLDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTFSWIRIPKYFNSISL
NNEYTIINC MENNSGWKVS LNYGEIWTLDQTEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNRLNNSKIYINGRLIDQKPISN
LNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNIGLKDFWGDYLDQYDKPYMMLNLYDPNKYVD
VNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKIL
45 SALEIPDVGNLSQVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIFGHQFNIAKLVASNWYNRQIERSSRTLGCSEWEIFPV
DDGWGERPLASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPAS
PAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAGDLVPRGSANSSSVDKLWVSHQFEK

Id. de sec. n.º 4: PAS100-BoNT/A recombinante (D102F T109R K340M I348L N353M K356R) - PAS100 incluida la etiqueta His (secuencia de ácido nucleico)

50 ATGGGTTAGCAGCCATCATCATCACCATCATGGTAGCCTGGTTCGCGTAGCTCTTCTGCAAGTCCGGCAGCACC
GGCACCGGCTTACCAGCTGCACCAGCACCTAGCGCACCGGCAGCATCTCCAGCAGCCCTGCACCGGCAAG
CCCTGCAGCTCCAGCACCCTCAGCACCAGCAGCAAGCCAGCTGCTCCTGCTCCAGCGAGCCAGCAGCGCC
AGCTCCTAGTGCCCTGCTGCCTCTCCTGCTGCTCCGGCACCAGCAAGTCTGCTGCGCCTGCACCGAGTGCT
55 CCGGCTGCTAGTCTGCGCACCAGCTCCGGCTAGTCCAGCTGCTCCAGCCCTTACGCCCCCTGCAGCACCAT
TTGTGAACAAGCAGTTAACTATAAGGACCCGGTGAACGGTGTGGATATCGCGTATATCAAAATCCCGAATGCG
GGCCAGATGCAACCACTCAAGGCGTTCAAGATTCATAACAAGATTTGGGTTATTCGGAACGTGATACCTTCACC
AATCCGGAAGAAGCGGATTTAAATCCGCGCCAGAGCAAGCAAGTCCGGTGAGCTACTATGATAGCAGCTA
TCTTAGCACCGATAATGAAAAAGACAATTACCTGAAGGGCGTGACCAAGTTGTTGAGCGCATCTACAGTACCTT
60 CTTAGGCCGCATGTTGTTGCGTAGCATCGTTCCGGGTATCCCGTTCTGGGGCGGCTCGACCATGATACCGAGT
TGAAAGTCATTGACACGAAGTGTATCAATGTTATCCAACCGGACGGCAGTTATCGCAGCGAGGAGTTAAATTTGG
TCATCATCGGTCCAAGCGCAGATATTATTCAGTTTCAATGCAAGAGCTTCGGCCATGAGGTCTTGAATTTGACGC
GCAACGGTTACGGCAGCACCAATACATCCGCTTTAGCCCGGATTTACCTTTGGCTTCGAGGAGAGCTTGGAG
GTGGACACCAACCCGCTGTTAGGTGCCGGCAATTCGAACCGACCCGGCAGTGACGTTGGCGCACGAATTGA
TTCATGCGGGTACCGCTTATACGGTATCGCATCAATCCGAATCGCGTCTTTAAAGTCAATACCAACGAGTACT
65 ACGAAATGAGCGGCTTAGAGGTTAGCTTTGAAGAATTACGCACCTTCGGTGCCACGACGCCAATTCATCGAC
AGCCTGCAGGAAATGAGTTCCGCTGTACTATTACAATAAATTCAGGACATCGCGAGCACCTTAAATAAAGCA

AAGAGCATTGTGGGACCAACCGCAAGCTTGCAGTACATGAAGAACGTATTTAAGGAAAAATATTTGTTGTCGGAG
 GATACCAGCGGGAAATTCAGCGTCGATAAGCTGAAATTCGACATGTTGTATAAAATGCTGACCGAGCTGTACAC
 CGAGGATATGTTCTGTCGGTTTTTTAAGGTGTTAAATCGTAAGACCTATTTAACTTTGATAAAGCGGTGTTTAAA
 ATTAATATCGTGCCGAAGGTGAATTACACCATCTACGATGGTTTCAATTTACGCAACACGAATCTGGCGGCGAAT
 5 TTTAATGGCCAAAACACCGAAATTAACAACATGAACCTTACGAAGTTAAGAATTTACGGGCTTATTCGAATTCT
 ACAAGTTATTATGCGTGCGCGGCATCATTACCAGCAAGGCAGGTGCGGGCAAGTCCTTGGTTCGCGGTGGCAG
 CGCCGCGCGGGCGCGCTCAATGATCTGTGTATTAAAGTCAATAACTGGGACCTGTTCTTCAGCCCGAGCGAG
 GATAACTTTACCAACGACTTAAACAAAGGCGAGGAGATCACGAGCGATACGAACATCGAGGCGGCGGAGGAAA
 ATATTAGCCTGGACCTCATTGACGAGTACTATCTGACGTTCAATTTTGACAATGAGCCGGAGAACATCAGCATTG
 10 AAAATCTCAGCAGCGACATCATCGGTGAGTTGAACTGATGCCGAACATTGAACGCTTTCGCAACGGCAAAAAA
 TATGAACTGGACAAGTATACCATGTTCCATTACTTACGCGCACAGGAATTTGAGCACGGCAAGAGCCGCGATTGC
 GCTGACCAATAGCGTTAACGAGGCTTGTAAATCCGAGCCGTGTCTACACGTTCTTCAGCAGCGATTATGTCAA
 AAAAGTGAACAAGGCGACCGGAAGCCGCGATGTTTTGGGTGGGTGAGCAATTGGTTTACGATTTTACCGACG
 AAACAGCGAGTGGACGACGACGACCAAAAATGAGATATCACCATCATCTCCGATCATCTCCGATCGGTCTC
 15 AATATCGGCAATATGTTATACAAGGACGACTTGTGGGCGCGCTGATCTTTAGCGGCGCGGTTATCTTATTAGAA
 TTCATCCCGGAGATCGCAATCCCGGTCTTGGGCACCTTTCGTTGGTGAGCTATATCGCGAATAAAGTGCTCAC
 GGTCCAAACCATCGATAACGCGCTCAGCAAGCGTAATGAGAAATGGGACGAGGTTTATAAGTATATCGTGACCA
 ACTGGTTAGCAAAAAGTCAATACGCGATCGATCTCATCCGCAAAAAAATGAAAGAAGCCTTGGAATAAAGCGG
 AGGCAACCAAAGCCATCATTAATTACCAGTATAACCAATATACCGAAGAAGAAAAACAATATCAACTTCAATAT
 20 CGATGATTTGAGCAGCAAACTGAACGAGAGCATTAACAAGCGATGATTAACATCAACAAGTTCTTGAATCAATG
 CAGCGTGAGCTATCTCATGAACAGCATGATCCCGTATGGCGTCAACGCTTGAAGATTTTGACGCCAGCCTGA
 AAGATGCGCTCCTCAAGTATATTTATGACAACCGCGCACCTCATTGGCCAGGTGGACCGCTTGAAGGATAAA
 GTGAACAATACGCTCAGCACGATATCCCGTTCAGCTGAGCAAGTACGTCGACAACCGAGCGCTTACTGAGCAC
 CTTTACCGAGTATATCAAGAACATCATTAATACCAGCATCTCAACTTGCCTATGAGAGCAATCACCTGATCGA
 25 CCTCAGCCGCTACGCCAGCAAGATCAACATCGGCAGCAAGGTCAATTTGACCCGATCGATAAGAATCAGATCC
 AATTGTTTAACTGGAAGCAGCAAGATCGAGGTTATCTTGAAGAACCGGATTGTGTACAACAGCATGTACGAGA
 ACTTTAGCACGAGCTTCTGGATTCTGATCCCGAAGTATTTCAATAGCATTAGCCTGAATAACGAATATACCATTAT
 CAACTGCATGAAAAATAATAGCGGCTGGAAGGTGAGCTTAAATTACGGCGAGATCATTGGACCTTACAGGATA
 CCAAGAAATCAAAACAGCGCTGCTCTTTAAGTATAGCCAGATGATCAACATCAGCGATTACATCAACCCGCTGGA
 30 TCTTCGTGACCATCACCAATAATCGCTTGAATAATAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATTGATCAAAAACC
 GATCAGCAATCTCGGTAATATCCATGCCAGCAATAACATCATGTTAAGTTAGACGGTTGCCGCGATACCCACCG
 CTATATCTGGATCAAGTATTTTAACTTATTTGATAAGGAACCTCAACGAAAAGGAAATTAAGACTTATATGACAATC
 AGAGCAATAGCGGCATCCTGAAGGATTTCTGGGGCGACTACCTGCAGTACGATAAGCCGTAATATATGTTGAAC
 TTGTATGACCCGAACAAATATGTCGATGTGAACAATGTGGGTATTCGTGGCTATATGTAATTAAGGGCCCGCGT
 35 GGTAGCGTGATGACCACGAATATTTACTTAAACAGAGCTTATACCGCGGACGAAGTTTATTATCAAGAAGTAT
 GCCAGCGGCAACAACAGCAATATCGTCCGCAACAACGACCGTGTGTATTAACGTTGATTAACGTAACCAATAAGA
 GTACCGCTTGGCCACGAATGCGAGCCAGGCGGGCGTGGAAAAAATCTTGAGCGCGTTGGAGATCCCGGACGT
 CGGCAACCTCAGCCAGGTTGTGGTGATGAAGTCTAAAAACGACCAGGGCATCACGAACAAGTGCAAAATGAATT
 TGCAAGATAACAACGGCAACGACATCGGCTTTATTGTTTTACCAGTTCAATAACATCGCCAAACTCGTGGCCA
 40 GCAATTGGTATAACCGCCAAATTGAACGCAGCAGCCGCACGCTCGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTGGA
 CGATGGCTGGGGCGAGCGCCCGCTCGCAAGTCCGGCAGCACCGGCACCGGCTTACCAGCTGCACCAGCACCC
 TAGCGACCCGAGCATCTCCAGCAGCCCTGCACCGCAAGCCCTGCAGCTCCAGCACCGCTCAGCAGCAGC
 AGCAAGCCAGCTGCTCCTGCTCCAGCGAGCCGACGAGCGCCAGCTCCTAGTGCCCTGCTGCTCTCCTGCT
 45 GCTCCGGCACCAAGTCTGCTGCGCCTGCACCGAGTGTCTCCGGCTGCTAGTCTGCGCACCAAGCTCCG
 GCTAGTCCAGCTGCTCCAGCCCTTCAGCCCTGCAGGAGATCTGGTGCCACGCGGTTCCGCGAATTCGAGCT
 CCGTCGACAAGCTTTGGAGCCACCCGAGTTGAAAAATAA

Id. de sec. n.º 5: PAS100-BoNT/A recombinante (G169I, T220R, P239M, S254T) -PAS100 incluida la etiqueta His)
 (secuencia de ácido nucleico)

50 ATGGGTAGCAGCCATCATCATCACCATCATGGTAGCCTGGTTCCGCGTAGCTCTTCTGCAAGTCCGGCAGCACCC
 GGCACCGGCTTACCAGCTGCACCAGCACCTAGCGCACCGGCAGCATCTCCAGCAGCCCTGCACCGGCAAG
 CCCTGCAGCTCCAGCACCGTCAGCACAGCAGCAAGCCAGCTGCTCCTGCTCCAGCGAGCCAGCAGCGCC
 AGCTCCTAGTGCCCTGCTGCTCTCCTGCTGCTCCGGCACCAGCAAGTCTGCTGCGCCTGCACCGAGTGCT
 55 CCGGCTGCTAGTCTGCTGCGCACCAAGCTCCGGCTAGTCCAGCTGCTCCAGCCCTTACGCCCCCTGCAGCACCAT
 TTGTGAACAAGCAGTTTAACTATAAGGACCCGGTGAACGCTGTGGATATCGCGTATATCAAAATCCCGAATGCG
 GGCCAGATGCAACCAAGTCAAGGCGTTCAAGATTACATAACAAGATTTGGGTTATTCCGGAACGTGATACCTTCACC
 AATCCGGAAGAAGGCGATTTAAATCCGCCGCCAGAACGCCAAACAAGTGCCGGTGAGCTACTATGATAGCACGTA
 TCTTAGCACCGATAATGAAAAAGACAATTACCTGAAGGGCGTGACCAAGTTGTTGAGCGCATCTACAGTACCG
 60 ACTTAGGCCGATGTTGTTGACGAGCATCGTTCGCGGTATCCCGTTCTGGGGCGGCTCGACCATTGATACCGA
 GTTGAAAGTCATTGACACGAAGTATCAATGTTATCCAACCGGACGGCAGTTATCGCAGCGAGGAGTTAAATTT
 GGTATCATCGGTCCAAGCGCAGATATTATTCAGTTTCAATGCAAGAGCTTCATCCATGAGGTCTTGAATTTGAC
 GCGCAACGTTACGGCAGCACCCCAATACATCCGCTTTAGCCCGGATTTACCTTTGGCTTCGAGGAGAGCTTGG
 AGGTGACACCAACCCGCTTGTAGGTGCCGGCAAAATCGCAACCGGACCGGAGTGGCTTGGCGACGAATTT
 65 GATTTCGCGGTCACCGCTTATACGTTATCGCGATCAATGAATCGCGTCTTTAAAGTCAATAACCAACGCGTA
 CTACGAAATGACCGGCTTAGAGGTTAGCTTTGAAGAATTACGCACCTTCGGTGGCCACGACGCCAAGTTCATCG

ACAGCCTGCAGGAAAATGAGTTCCGCTTGACTATTACAATAAATTCAAGGACATCGCGAGCACCTTAAATAAAG
 CAAAGAGCATTGTGGGCACCAACCGCAAGCTTGCAGTACATGAAGAACGTATTTAAGGAAAAATATTTGTTGTCGG
 AGGATACCAGCGGGAAATTCAGCGTCGATAAGCTGAAATTCGACAAATTGTATAAAATGCTGACCGAGATTTACA
 CCGAGGATAAATTCGTCAAGTTTTTAAAGGTGTTAAATCGTAAGACCTATTTAACTTTGATAAAGCGGTGTTTAA
 5 AATTAATATCGTGCCGAAGGTGAATTACACCATCTACGATGGTTTTCAACTTAAGCAACACGAATCTGGCGGCGAA
 TTTAATGGCCAAAACACCGAAATTAACAACATGAACCTTACGAAGTTAAGAATTTACGGGCTTATTCGAATTC
 TACAAGTTATTATGCGTGCGCGGCATCATTACCAGCAAGGCAGGTGCGGGCAAGTCCTTGTTCCGCGTGCGCA
 GCGCCGGCGCGCGCGCTCAATGATCTGTGTATTAAAGTCAATAACTGGGACCTGTTCTTCAGCCCGAGCGA
 GGATAACTTTACCAACGACTTAAACAAAGGCGAGGAGATCACGAGCGATACGAACATCGAGGCGGCGGAGGAA
 10 AATATTAGCCTGGACCTCATTACGACGACTATCTGACGTTCAATTTTGACAATGAGCCGGAGAACATCAGCATT
 GAAAATCTCAGCAGCGACATCATCGGTCAGTTGGAACGATGCCGAACATTGAACGCTTCCGAACGGCAAAAA
 ATATGAAGTGGACAAGTATACCATGTTCCATTACTTACGCGCACAGGAATTTGAGCACGGCAAGAGCCGCTTG
 CGCTGACCAATAGCGTTAACGAGGCCTTGTTAAATCCGAGCCGTGTCTACACGTTCTTCAGCAGCGATTATGTCA
 AAAAGTGAACAAGGCGACCGAAGCCGCGATGTTTTGGGCTGAGCAATTGGTTTACGATTTTACCGAC
 15 GAAACCAGCGAGGTGAGCACGACCGACAAAATTCAGATATCACCATCATCATTCCTGACATCGGTCCGGCGCT
 CAATATCGGCAATATGTTATACAAGGACGACTTTGTGGGCGCGCTGATCTTTAGCGGCGCGGTTATCTTATTAGA
 ATTCATCCCGGAGATCGCAATCCCGGTCTTGGGCACCTTTGCGTTGGTGAGCTATATCGGAATAAAGTGCTCA
 CGGTCCAAACCATCGATAACGCGCTCAGCAAGCGTAATGAGAAATGGGACGAGGTTTATAAGTATATCGTGACC
 AACTGGTTAGCAAAAGTCAATACGCAGATCGATCTCATCCGCAAAAAAATGAAAGAAGCCTTGAAAAATCAAGCG
 20 GAGGCAACCAAGCCATCATTAAATACCAGTATAACCAATATACCGAAGAAGAAAAAACAATATCAACTTCAATA
 TCGATGATTTGAGCAGCAAACTGAACGAGAGCATTAAACAAAGCGATGATTAACATCAACAAGTTCTTGAATCAAT
 GCAGCGTGAGCTATCTCATGAACAGCATGATCCCGTATGGCGTCAAACGCTTGGAAGATTTTGACGCCAGCCTG
 AAAGATGCGCTCCTCAAGTATATTTATGACAACCGCGGCACCTCATTGGCCAGGTGGACCGCTTGAAGGATAA
 AGTGAACAATACGCTCAGCACGGATATCCCGTTCAGCTGAGCAAGTACGTGACAACCGAGCGCTTACTGAGCA
 25 CCTTACCGAGTATATCAAGAACATCATTAAATACCAGCATCCTCAACTTGCGCTATGAGAGCAATCACCTGATCG
 ACCTCAGCCGCTACGCCAGCAAGATCAACATCGGCAGCAAGGTCAATTTGACCCGATCGATAAGAATCAGATC
 CAATTGTTTAACTTGGAAGCAGCAAGATCGAGGTTATCTTGAAGAACGCGATTGTGTACAACAGCATGTACGAG
 AACTTTAGCACGAGCTTCTGGATTCTGATCCCGAAGTATTTCAATAGCATTAGCCTGAATAACGAATATACCATTA
 TCAACTGCATGGAAAAATAATAGCGGCTGGAAGGTGAGCTTAAATTACGGCGAGATCATTTGGACCTTACAGGATA
 30 CCAAGAAATCAAAACAGCGCGTCTTTAAGTATAGCCAGATGATCAACATCAGCGATTACATCAACCGCTGGA
 TCTTCGTGACCATCACCAATAATCGCTTGAATAATAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATTGATCAAAAACC
 GATCAGCAATCTCGGTAATATCCATGCCAGCAATAACATCATGTTAAGTTAGACGGTTGCCGCGATACCCACCG
 CTATATCTGGATCAAGTATTTTAACTTATTTGATAAGGAACCTCAACGAAAAGGAAATTAAGACTTATATGACAATC
 AGAGCAATAGCGGCATCCTGAAGGATTTCTGGGGCGACTACCTGCAGTACGATAAGCCGTACTATATGTTGAAC
 35 TTGTATGACCCGAACAAATATGTCGATGTGAACAATGTGGGTATTCGTGGCTATATGTACTTAAAGGGCCCGCT
 GGTAGCGTGATGACCACGAATATTTACTTAAACAGCAGCTTATACCGCGGCACGAAGTTTATTATCAAGAAGTAT
 GCCAGCGGCAACAAGGACAATATCGTCCGCAACAACGACCGTGTGTATTAACGTGGTGGTGAAGAATAAAGA
 GTACCGCTTGGCCACGAATGCGAGCCAGGCGGGCGTGGAATAAATCTTGAGCGCGTTGGAGATCCCGGACGT
 CGGCAACCTCAGCCAGGTTGTGGTGATGAAGTCTAAAAACGACCAGGGCATCACGAACAAGTGCAAAATGAATT
 40 TGCAAGATAACAACGGCAACGACATCGGCTTTATTGTTTTACCCAGTTCAATAACATCGCCAACTCGTGGCCA
 GCAATTGGTATAACCGCAAATTTGAACGCAGCAGCCGCACGCTCGGCTGTAGCTGGGAGTTTATCCCGGTGGA
 CGATGGCTGGGGCGAGCGCCCGCTCGCAAGTCCGGCAGCACCGGCACCGGCTTCACCAGCTGCACCAGCACC
 TAGCGCACCGGCAGCATCTCCAGCAGCCCTGCACCGGCAAGCCCTGCAGCTCCAGCACCCTCAGCACCAGC
 AGCAAGCCCAGCTGCTCCTGCTCCAGCGAGCCAGCAGCGCCAGCTCCTAGTGCCCCTGCTGCCTCTCCTGCT
 45 GCTCCGGCACCAAGTCCTGCTGCGCCTGCACCGAGTGCTCCGGCTGCTAGTCTGCCGACCAAGCTCCG
 GCTAGTCCAGCTGCTCCAGCCCTTCAGCCCTGCAGGAGATCTGGTGCCACGCGGTTCCGCGAATTCGAGCT
 CCGTCGACAAGCTTTGGAGCCACCCGAGTTTCAAAAAATAA

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Merz Pharma GmbH & Co. KGaA

<120> PAS-BoNT con actividad aumentada

<130> 1917-000-PCT

<160> 5

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 1335

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEC N.º 1

<400> 1

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

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

Arg	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly	Gln	Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Asp	Lys	Val	Asn
		835					840					845			
Asn	Thr	Leu	Ser	Thr	Asp	Ile	Pro	Phe	Gln	Leu	Ser	Lys	Tyr	Val	Asp
		850				855					860				
Asn	Gln	Arg	Leu	Leu	Ser	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr	Ile	Lys	Asn	Ile	Ile
865					870					875					880
Asn	Thr	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Arg	Tyr	Glu	Ser	Asn	His	Leu	Ile	Asp
				885					890					895	
Leu	Ser	Arg	Tyr	Ala	Ser	Lys	Ile	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Val	Asn	Phe
			900					905					910		
Asp	Pro	Ile	Asp	Lys	Asn	Gln	Ile	Gln	Leu	Phe	Asn	Leu	Glu	Ser	Ser
		915					920					925			
Lys	Ile	Glu	Val	Ile	Leu	Lys	Asn	Ala	Ile	Val	Tyr	Asn	Ser	Met	Tyr
		930				935					940				
Glu	Asn	Phe	Ser	Thr	Ser	Phe	Trp	Ile	Arg	Ile	Pro	Lys	Tyr	Phe	Asn
945					950					955					960
Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Asn	Glu	Tyr	Thr	Ile	Ile	Asn	Cys	Met	Glu	Asn
				965					970					975	
Asn	Ser	Gly	Trp	Lys	Val	Ser	Leu	Asn	Tyr	Gly	Glu	Ile	Ile	Trp	Thr
			980					985					990		
Leu	Gln	Asp	Thr	Gln	Glu	Ile	Lys	Gln	Arg	Val	Val	Phe	Lys	Tyr	Ser
		995					1000					1005			
Gln	Met	Ile	Asn	Ile	Ser	Asp	Tyr	Ile	Asn	Arg	Trp	Ile	Phe	Val	Thr
		1010				1015					1020				
Ile	Thr	Asn	Asn	Arg	Leu	Asn	Asn	Ser	Lys	Ile	Tyr	Ile	Asn	Gly	Arg
1025					1030					1035					1040
Leu	Ile	Asp	Gln	Lys	Pro	Ile	Ser	Asn	Leu	Gly	Asn	Ile	His	Ala	Ser
				1045					1050					1055	
Asn	Asn	Ile	Met	Phe	Lys	Leu	Asp	Gly	Cys	Arg	Asp	Thr	His	Arg	Tyr
			1060					1065					1070		
Ile	Trp	Ile	Lys	Tyr	Phe	Asn	Leu	Phe	Asp	Lys	Glu	Leu	Asn	Glu	Lys
		1075					1080					1085			
Glu	Ile	Lys	Asp	Leu	Tyr	Asp	Asn	Gln	Ser	Asn	Ser	Gly	Ile	Leu	Lys
		1090				1095					1100				
Asp	Phe	Trp	Gly	Asp	Tyr	Leu	Gln	Tyr	Asp	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Met	Leu
1105					1110					1115					1120
Asn	Leu	Tyr	Asp	Pro	Asn	Lys	Tyr	Val	Asp	Val	Asn	Asn	Val	Gly	Ile
				1125					1130					1135	
Arg	Gly	Tyr	Met	Tyr	Leu	Lys	Gly	Pro	Arg	Gly	Ser	Val	Met	Thr	Thr
			1140					1145					1150		
Asn	Ile	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ser	Leu	Tyr	Arg	Gly	Thr	Lys	Phe	Ile	Ile
		1155					1160					1165			
Lys	Lys	Tyr	Ala	Ser	Gly	Asn	Lys	Asp	Asn	Ile	Val	Arg	Asn	Asn	Asp
		1170				1175									

1330

1335

<210> 2

<211> 1546

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PAS100-BoNT/A (D102F T109R K340M I348L N353M K356R) -PAS100
incluida la etiqueta His

<400> 2

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

```

Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu
      405      410      415
Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met
      420      425      430
Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly
      435      440      445
Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu Lys Phe Asp Met Leu Tyr Lys Met Leu
      450      455      460
Thr Glu Leu Tyr Thr Glu Asp Met Phe Val Arg Phe Phe Lys Val Leu
      465      470      475      480
Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn
      485      490      495
Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg
      500      505      510
Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn
      515      520      525
Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe
      530      535      540
Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Ala Gly Ala
      545      550      555      560
Gly Lys Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Ala Gly Ala Gly Ala Leu Asn
      565      570      575
Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser
      580      585      590
Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile Thr Ser
      595      600      605
Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp Leu Ile
      610      615      620
Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile
      625      630      635      640
Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu Leu Met
      645      650      655
Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys
      660      665      670
Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His Gly Lys
      675      680      685
Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu Asn Pro
      690      695      700
Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys Val Asn
      705      710      715      720
Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln Leu Val
      725      730      735
Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp Lys Ile
      740      745      750
Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile
      755      760      765
Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser
      770      775      780
Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val
      785      790      795      800
Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr
      805      810      815
Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp
      820      825      830
Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr
      835      840      845
Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln
      850      855      860
Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr
      865      870      875      880
Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser
      885      890      895
Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe

```

900						905						910				
Leu	Asn	Gln	Cys	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu	Met	Asn	Ser	Met	Ile	Pro	Tyr	
915						920						925				
Gly	Val	Lys	Arg	Leu	Glu	Asp	Phe	Asp	Ala	Ser	Leu	Lys	Asp	Ala	Leu	
930						935						940				
Leu	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Asn	Arg	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly	Gln	Val	Asp	
945	950					955						960				
Arg	Leu	Lys	Asp	Lys	Val	Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Thr	Asp	Ile	Pro	Phe	
965					970						975					
Gln	Leu	Ser	Lys	Tyr	Val	Asp	Asn	Gln	Arg	Leu	Leu	Ser	Thr	Phe	Thr	
980					985						990					
Glu	Tyr	Ile	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Thr	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Arg	Tyr	
995					1000						1005					
Glu	Ser	Asn	His	Leu	Ile	Asp	Leu	Ser	Arg	Tyr	Ala	Ser	Lys	Ile	Asn	
1010					1015						1020					
Ile	Gly	Ser	Lys	Val	Asn	Phe	Asp	Pro	Ile	Asp	Lys	Asn	Gln	Ile	Gln	
1025	1030					1035						1040				
Leu	Phe	Asn	Leu	Glu	Ser	Ser	Lys	Ile	Glu	Val	Ile	Leu	Lys	Asn	Ala	
1045					1050						1055					
Ile	Val	Tyr	Asn	Ser	Met	Tyr	Glu	Asn	Phe	Ser	Thr	Ser	Phe	Trp	Ile	
1060					1065						1070					
Arg	Ile	Pro	Lys	Tyr	Phe	Asn	Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Asn	Glu	Tyr	Thr	
1075					1080						1085					
Ile	Ile	Asn	Cys	Met	Glu	Asn	Asn	Ser	Gly	Trp	Lys	Val	Ser	Leu	Asn	
1090					1095						1100					
Tyr	Gly	Glu	Ile	Ile	Trp	Thr	Leu	Gln	Asp	Thr	Gln	Glu	Ile	Lys	Gln	
1105	1110					1115						1120				
Arg	Val	Val	Phe	Lys	Tyr	Ser	Gln	Met	Ile	Asn	Ile	Ser	Asp	Tyr	Ile	
1125					1130						1135					
Asn	Arg	Trp	Ile	Phe	Val	Thr	Ile	Thr	Asn	Asn	Arg	Leu	Asn	Asn	Ser	
1140					1145						1150					
Lys	Ile	Tyr	Ile	Asn	Gly	Arg	Leu	Ile	Asp	Gln	Lys	Pro	Ile	Ser	Asn	
1155					1160						1165					
Leu	Gly	Asn	Ile	His	Ala	Ser	Asn	Asn	Ile	Met	Phe	Lys	Leu	Asp	Gly	
1170					1175						1180					
Cys	Arg	Asp	Thr	His	Arg	Tyr	Ile	Trp	Ile	Lys	Tyr	Phe	Asn	Leu	Phe	
1185	1190					1195						1200				
Asp	Lys	Glu	Leu	Asn	Glu	Lys	Glu	Ile	Lys	Asp	Leu	Tyr	Asp	Asn	Gln	
1205					1210						1215					
Ser	Asn	Ser	Gly	Ile	Leu	Lys	Asp	Phe	Trp	Gly	Asp	Tyr	Leu	Gln	Tyr	
1220					1225						1230					
Asp	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Met	Leu	Asn	Leu	Tyr	Asp	Pro	Asn	Lys	Tyr	Val	
1235					1240						1245					
Asp	Val	Asn	Asn	Val	Gly	Ile	Arg	Gly	Tyr	Met	Tyr	Leu	Lys	Gly	Pro	
1250					1255						1260					
Arg	Gly	Ser	Val	Met	Thr	Thr	Asn	Ile	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ser	Leu	Tyr	
1265	1270					1275						1280				
Arg	Gly	Thr	Lys	Phe	Ile	Ile	Lys	Lys	Tyr	Ala	Ser	Gly	Asn	Lys	Asp	
1285					1290						1295					
Asn	Ile	Val	Arg	Asn	Asn	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	Asn	Val	Val	Val	Lys	
1300					1305						1310					
Asn	Lys	Glu	Tyr	Arg	Leu	Ala	Thr	Asn	Ala	Ser	Gln	Ala	Gly	Val	Glu	
1315					1320						1325					
Lys	Ile	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	Ile	Pro	Asp	Val	Gly	Asn	Leu	Ser	Gln	
1330					1335						1340					
Val	Val	Val	Met	Lys	Ser	Lys	Asn	Asp	Gln	Gly	Ile	Thr	Asn	Lys	Cys	
1345																

```

Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu Ala Ser Pro
1410                      1415                      1420
Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro
1425                      1430                      1435                      1440
Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala
1445                      1450                      1455
Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro
1460                      1465                      1470
Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala
1475                      1480                      1485
Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro
1490                      1495                      1500
Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro
1505                      1510                      1515                      1520
Ala Gly Asp Leu Val Pro Arg Gly Ser Ala Asn Ser Ser Ser Val Asp
1525                      1530                      1535
Lys Leu Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1540                      1545

```

```

<210> 3
<211> 1546
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> PAS100-BoNT/A (G169I, T220R, P239M, S254) -PAS100 incluida
la etiqueta His

```

```

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

```

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

Gly	Asn	Met	Leu	Tyr	Lys	Asp	Asp	Phe	Val	Gly	Ala	Leu	Ile	Phe	Ser
	770					775					780				
Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Ile	Pro	Glu	Ile	Ala	Ile	Pro	Val
785					790					795					800
Leu	Gly	Thr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Ala	Asn	Lys	Val	Leu	Thr
				805					810						815
Val	Gln	Thr	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu	Ser	Lys	Arg	Asn	Glu	Lys	Trp	Asp
				820					825					830	
Glu	Val	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Val	Thr	Asn	Trp	Leu	Ala	Lys	Val	Asn	Thr
		835					840						845		
Gln	Ile	Asp	Leu	Ile	Arg	Lys	Lys	Met	Lys	Glu	Ala	Leu	Glu	Asn	Gln
	850					855					860				
Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Ile	Ile	Asn	Tyr	Gln	Tyr	Asn	Gln	Tyr	Thr
865					870					875					880
Glu	Glu	Glu	Lys	Asn	Asn	Ile	Asn	Phe	Asn	Ile	Asp	Asp	Leu	Ser	Ser
				885					890						895
Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Ile	Asn	Lys	Ala	Met	Ile	Asn	Ile	Asn	Lys	Phe
		900						905					910		
Leu	Asn	Gln	Cys	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu	Met	Asn	Ser	Met	Ile	Pro	Tyr
		915					920						925		
Gly	Val	Lys	Arg	Leu	Glu	Asp	Phe	Asp	Ala	Ser	Leu	Lys	Asp	Ala	Leu
930						935							940		
Leu	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Asn	Arg	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly	Gln	Val	Asp
945					950					955					960
Arg	Leu	Lys	Asp	Lys	Val	Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Thr	Asp	Ile	Pro	Phe
				965					970						975
Gln	Leu	Ser	Lys	Tyr	Val	Asp	Asn	Gln	Arg	Leu	Leu	Ser	Thr	Phe	Thr
			980					985						990	
Glu	Tyr	Ile	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Thr	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Arg	Tyr
	995						1000						1005		
Glu	Ser	Asn	His	Leu	Ile	Asp	Leu	Ser	Arg	Tyr	Ala	Ser	Lys	Ile	Asn
	1010					1015					1020				
Ile	Gly	Ser	Lys	Val	Asn	Phe	Asp	Pro	Ile	Asp	Lys	Asn	Gln	Ile	Gln
1025					1030					1035					1040
Leu	Phe	Asn	Leu	Glu	Ser	Ser	Lys	Ile	Glu	Val	Ile	Leu	Lys	Asn	Ala
				1045					1050						1055
Ile	Val	Tyr	Asn	Ser	Met	Tyr	Glu	Asn	Phe	Ser	Thr	Ser	Phe	Trp	Ile
		1060						1065						1070	
Arg	Ile	Pro	Lys	Tyr	Phe	Asn	Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Asn	Glu	Tyr	Thr
	1075						1080						1085		
Ile	Ile	Asn	Cys	Met	Glu	Asn	Asn	Ser	Gly	Trp	Lys	Val	Ser	Leu	Asn
	1090					1095					1100				
Tyr	Gly	Glu	Ile	Ile	Trp	Thr	Leu	Gln	Asp	Thr	Gln	Glu	Ile	Lys	Gln
1105					1110					1115					1120
Arg	Val	Val	Phe	Lys	Tyr	Ser	Gln	Met	Ile	Asn	Ile	Ser	Asp	Tyr	Ile
				1125					1130					1135	
Asn	Arg	Trp	Ile	Phe	Val	Thr	Ile	Thr	Asn	Asn	Arg	Leu	Asn	Asn	Ser
		1140						1145					1150		
Lys	Ile	Tyr	Ile	Asn	Gly	Arg	Leu	Ile	Asp	Gln	Lys	Pro	Ile	Ser	Asn
	1155						1160					1165			
Leu	Gly	Asn	Ile	His	Ala	Ser	Asn	Asn	Ile	Met	Phe	Lys	Leu	Asp	Gly
	1170					1175					1180				
Cys	Arg	Asp	Thr	His	Arg	Tyr	Ile	Trp	Ile	Lys	Tyr	Phe	Asn	Leu	Phe
1185					1190					1195					1200
Asp	Lys	Glu	Leu	Asn	Glu	Lys	Glu	Ile	Lys	Asp	Leu	Tyr	Asp	Asn	Gln
				1205					1210					1215	
Ser	Asn	Ser	Gly	Ile	Leu	Lys	Asp	Phe	Trp	Gly	Asp	Tyr	Leu	Gln	Tyr
			1220					1225					1230		
Asp	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Met	Leu	Asn	Leu	Tyr	Asp	Pro	Asn	Lys	Tyr	Val
	1235						1240					1245			
Asp	Val	Asn	Asn	Val	Gly	Ile	Arg	Gly	Tyr	Met	Tyr	Leu	Lys	Gly	Pro
1250						1255					1260				
Arg	Gly	Ser	Val	Met	Thr	Thr	Asn	Ile	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ser	Leu	Tyr

1265		1270		1275		1280
Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp						
	1285			1290		1295
Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys						
	1300			1305		1310
Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu						
	1315			1320		1325
Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser Gln						
	1330			1335		1340
Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn Lys Cys						
	1345			1350		1355
Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly Phe Ile Gly						
	1365			1370		1375
Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser Asn Trp Tyr						
	1380			1385		1390
Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys Ser Trp Glu						
	1395			1400		1405
Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu Ala Ser Pro						
	1410			1415		1420
Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro						
	1425			1430		1435
Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala						
	1445			1450		1455
Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro						
	1460			1465		1470
Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala						
	1475			1480		1485
Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro						
	1490			1495		1500
Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro						
	1505			1510		1515
Ala Gly Asp Leu Val Pro Arg Gly Ser Ala Asn Ser Ser Ser Val Asp						
	1525			1530		1535
Lys Leu Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys						
	1540			1545		

<210> 4
 <211> 4641
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PAS100-BoNT/A (D102F T109R K340M I348L N353M K356R) -PAS100
 incluida la etiqueta His (secuencia de ácido nucleico)

<400> 4	
atgggtagca gccatcatca tcacatcat ggtagcctgg ttccgcgtag ctcttctgca	60
agtccggcag caccggcacc ggcttcacca gctgcaccag cacctagcgc accggcagca	120
tctccagcag cccctgcacc ggcaagccct gcagctccag caccgtcagc accagcagca	180
agcccagctg ctctgtctcc agcgagccca gcagcgccag ctcttagtgc ccctgtgtcc	240
tctcctgtgtg ctccggcacc agcaagtcct gctgcgcctg caccgagtgc tccggctgtg	300
agtctgtccg caccagctcc ggctagtcca gctgtctccag ccccttcagc ccctgcagca	360
ccatttgtga acaagcagtt taactataag gacccggtga acggtgtgga tatcgcgtat	420
atcaaaatcc cgaatgcggg ccagatgcaa ccagtcaagg cgttcaagat tcataacaag	480

atttgggtta	ttccggaacg	tgataccttc	accaatccgg	aagaaggcga	tttaaateccg	540
ccgccagaag	ccaaacaagt	gccggtgagc	tactatgata	gcacgtatct	tagcaccgat	600
aatgaaaaag	acaattacct	gaagggcgtg	accaagttgt	tcgagcgcat	ctacagtacc	660
ttcttaggcc	gcatgttggt	gcgtagcatc	gttcgcggta	tcccgttctg	gggcggctcg	720
accattgata	ccgagttgaa	agtcattgac	acgaactgta	tcaatgttat	ccaaccggac	780
ggcagttatc	gcagcgagga	gttaaatttg	gtcatcatcg	gtccaagcgc	agatattatt	840
cagttcgaat	gcaagagctt	cggccatgag	gtcttgaatt	tgacgcgcaa	cggttacggc	900
agcacccaat	acatccgctt	tagcccggat	ttcacctttg	gcttcgagga	gagcttggag	960
gtggacacca	acccgctggt	aggtgccggc	aaattcgcaa	ccgaccggc	agtgcgttg	1020
gcgcacgaat	tgattcatgc	gggtcaccgc	ttatacggta	tcgcgatcaa	tccgaatcgc	1080
gtctttaaag	tcaataccaa	cgcgtactac	gaaatgagcg	gcttagaggt	tagctttgaa	1140
gaattacgca	ccttcggtgg	ccacgacgcc	aagttcatcg	acagcctgca	ggaaaatgag	1200
ttccgcttgt	actattacaa	taaattcaag	gacatcgca	gcaccttaa	taaagcaaag	1260
agcattgtgg	gcaccaccgc	aagcttgca	tacatgaaga	acgtatttaa	ggaaaaatat	1320
ttgttgcgg	aggataccag	cgggaaattc	agcgtcgata	agctgaaatt	cgacatgttg	1380
tataaaatgc	tgaccgagct	gtacaccgag	gatatgttcg	tccgtttttt	taagggtgta	1440
aatcgtaaga	cctattttaa	ctttgataaa	gcggtgttta	aaattaatat	cgtgccgaag	1500
gtgaattaca	ccatctacga	tggtttcaat	ttacgcaaca	cgaatctggc	ggcgaatttt	1560
aatggccaaa	acaccgaaat	taacaacatg	aactttacga	agttaaagaa	tttcacgggc	1620
ttattcgaat	tctacaagtt	attatgcgtg	cgcggcatca	ttaccagcaa	ggcaggtgcg	1680
ggcaagtcct	tggttccgcg	tggcagcgcc	ggcgccggcg	cgctcaatga	tctgtgtatt	1740
aaagtcaata	actgggacct	gttcttcagc	ccgagcgagg	ataactttac	caacgactta	1800
aacaaaggcg	aggagatcac	gagcgatacg	aacatcgagg	cggcggagga	aaatattagc	1860
ctggacctca	ttcagcagta	ctatctgacg	ttcaattttg	acaatgagcc	ggagaacatc	1920
agcattgaaa	atctcagcag	cgacatcatc	ggtcagttgg	aactgatgcc	gaacattgaa	1980
cgctttccga	acggcaaaaa	atatgaactg	gacaagtata	ccatgttcca	ttacttacgc	2040
gcacaggaat	ttgagcacgg	caagagccgc	attgcgctga	ccaatagcgt	taacgaggcc	2100
ttgttaaatac	cgagccgtgt	ctacacgttc	ttcagcagcg	attatgtcaa	aaaagtgaac	2160
aaggcgaccg	aagccgcgat	gtttttgggc	tgggtcgagc	aattggttta	cgattttacc	2220
gacgaaacca	gcgaggtgag	cacgaccgac	aaaattgcag	atatcaccat	catcattccg	2280
tacatcggtc	cggcgctcaa	tatcggaat	atgttataca	aggacgactt	tgtgggcgcg	2340
ctgatcttta	gcggcgcggt	tatcttatta	gaattcatcc	cggagatcgc	aatcccggtc	2400

ttgggcacct ttgcgttggt gagctatatc gcgaataaag tgctcacggt ccaaaccatc	2460
gataacgcgc tcagcaagcg taatgagaaa tgggacgagg tttataagta tatcgtgacc	2520
aactggtttag caaaagtcaa tacgcagatc gatctcatcc gcaaaaaaat gaaagaagcc	2580
ttggaaaatc aagcggaggc aaccaaagcc atcattaatt accagtataa ccaatatacc	2640
gaagaagaaa aaaacaatat caacttcaat atcgtatgatt tgagcagcaa actgaacgag	2700
agcattaaca aagcgatgat taacatcaac aagttcttga atcaatgcag cgtgagctat	2760
ctcatgaaca gcatgatccc gtatggcgtc aaacgcttgg aagattttga cgccagcctg	2820
aaagatgcgc tcctcaagta tatttatgac aaccgcggca ccctcattgg ccaggtggac	2880
cgcttgaagg ataaagtga caatacgctc agcacggata tcccgttcca gctgagcaag	2940
tacgtcgaca accagcgctt actgagcacc tttaccgagt atatcaagaa catcattaat	3000
accagcatcc tcaacttgcg ctatgagagc aatcacctga tcgacctcag ccgctacgcc	3060
agcaagatca acatcggcag caaggtcaat ttcgacccga tcgataagaa tcagatccaa	3120
ttgtttaacc tggaagcag caagatcgag gttatcttga agaacgcgat tgtgtacaac	3180
agcatgtacg agaacttttag cagcagcttc tggattcgta tcccgaagta tttcaatagc	3240
attagcctga ataacgaata taccattatc aactgcatgg aaaataatag cggctggaag	3300
gtgagcttaa attacggcga gatcatttgg accttacagg ataccaaga aatcaaacag	3360
cgcgtcgtct ttaagtatag ccagatgatc aacatcagcg attacatcaa ccgctggatc	3420
ttcgtgacca tcaccaataa tcgcttgaat aatagcaaga tttacatcaa tggctcgcttg	3480
attgatcaaa aaccgatcag caatctcggc aatatccatg ccagcaataa catcatgttt	3540
aagttagacg gttgccgcga taccaccgcg tatatctgga tcaagtattt taacttattt	3600
gataaggaac tcaacgaaaa ggaaattaaa gacttatatg acaatcagag caatagcggc	3660
atcctgaagg atttctgggg cgactacctg cagtacgata agccgtacta tatgttgaac	3720
ttgtatgacc cgaacaaata tgtcgatgtg aacaatgtgg gtattcgtgg ctatatgtac	3780
ttaaagggcc cgcgtggtag cgtgatgacc acgaatatatt acttaaacag cagcttatac	3840
cgcggcacga agtttattat caagaagtat gccagcggca acaaggacaa tatcgtccgc	3900
aacaacgacc gtgtgtatat taacgtggtg gtgaagaata aagagtaccg cttggccacg	3960
aatgcgagcc aggggggctt ggaaaaaatc ttgagcgcgt tggagatccc ggacgtcggc	4020
aacctcagcc aggttgtggt gatgaagtct aaaaacgacc agggcatcac gaacaagtgc	4080
aaaatgaatt tgcaagataa caacggcaac gacatcggct ttatttggtt tcaccagttc	4140
aataacatcg ccaaactcgt ggccagcaat tgggtataacc gccaaattga acgcagcagc	4200
cgcacgctcg gctgtagctg ggagttcatc ccggtggacg atggctgggg cgagcgcccg	4260

ctcgcaagtc cggcagcacc ggcaccggct tcaccagctg caccagcacc tagcgcaccg	4320
gcagcatctc cagcagcccc tgcaccggca agccctgcag ctccagcacc gtcagcacca	4380
gcagcaagcc cagctgctcc tgctccagcg agcccagcag cgccagctcc tagtgcccct	4440
gctgcctctc ctgctgctcc ggcaccagca agtcctgctg cgcttcgacc gactgctccg	4500
gctgctagtc ctgccgcacc agctccggct agtccagctg ctccagcccc ttcagcccct	4560
gcaggagatc tgggtgccag cggttccgcg aattcgagct ccgtcgacaa gctttggagc	4620
caccgcagtc tcgaaaaata a	4641

<210> 5

<211> 4641

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PAS100-BoNT/A (G169I, T220R, P239M, S254T) -PAS100 incluida la etiqueta His) (secuencia de ácido nucleico)

<400> 5

atgggtagca gccatcatca tcaccatcat ggtagcctgg ttccgcgtag ctcttctgca	60
agtccggcag caccggcacc ggcttcacca gctgcaccag cacctagcgc accggcagca	120
tctccagcag cccctgcacc ggcaagccct gcagctccag caccgtcagc accagcagca	180
agcccgagctg ctctctgctcc agcgagccca gcagcgccag ctcttagtgc ccctgctgcc	240
tctcctgctg ctccggcacc agcaagtcct gctgcgcctg caccgagtgc tccggctgct	300
agtcctgccg caccagctcc ggctagtcca gctgctccag ccccttcagc ccctgcagca	360
ccattttgtga acaagcagtt taactataag gacccggtga acggtgtgga tatcgcgtat	420
atcaaaatcc cgaatgcggg ccagatgcaa ccagtcaagg cgttcaagat tcataacaag	480
atttggttga ttccggaacg tgataccttc accaatccgg aagaaggcga tttaaatccg	540
ccgccagaag ccaaacaagt gccggtgagc tactatgata gcacgtatct tagcaccgat	600
aatgaaaaag acaattacct gaaggcgctg accaagttgt tcgagcgcat ctacagtacc	660
gacttaggcc gcatgttggt gacgagcatc gttcgcggtg tcccgttctg gggcggctcg	720
accattgata ccgagttgaa agtcattgac acgaactgta tcaatgttat ccaaccggac	780
ggcagttatc gcagcgagga gttaaatttg gtcacatcgc gtccaagcgc agatattatt	840
cagttcgaat gcaagagctt catccatgag gtcttgaatt tgacgcgcaa cggttacggc	900
agcacccaat acatccgctt tagcccgat ttcacctttg gcttcgagga gagcttggag	960
gtggacacca acccgctggt aggtgccggc aaattcgcaa ccgaccggc agtgcgcttg	1020
gcgcacgaat tgattcatgc gggtcaccgc ttatacggta tcgcatcaa tatgaatcgc	1080
gtcttttaaag tcaataccaa cgcgtactac gaaatgaccg gcttagaggt tagctttgaa	1140

gaattacgca ccttcggtgg ccacgacgcc aagttcatcg acagcctgca ggaaaatgag	1200
ttccgcttgt actattacaa taaattcaag gacatcgga gcaccttaa taaagcaaag	1260
agcattgtgg gcaccaccgc aagcttgca tacatgaaga acgtatttaa ggaaaaatat	1320
ttgttgctgg aggataccag cgggaaattc agcgtcgata agctgaaatt cgacaaattg	1380
tataaaatgc tgaccgagat ttacaccgag gataacttcg tcaagttttt taaggtgtta	1440
aatcgtaaga cctattttaa ctttgataaa gcggtgttta aaattaatat cgtgccgaag	1500
gtgaattaca ccatctacga tggtttcaac ttaagcaaca cgaatctggc ggcaattttt	1560
aatggccaaa acaccgaaat taacaacatg aactttacga agttaagaa tttcacgggc	1620
ttattcgaat tctacaagtt attatgcgtg cgcggcatca ttaccagcaa ggcaggtgcg	1680
ggcaagtcct tggttccgcg tggcagcgcc ggcgcggcg cgctcaatga tctgtgtatt	1740
aaagtcaata actgggacct gttcttcagc ccgagcgagg ataactttac caacgactta	1800
aacaaaggcg aggagatcac gagcgatacg aacatcgagg cggcggagga aaatattagc	1860
ctggacctca ttcagcagta ctatctgacg ttcaattttg acaatgagcc ggagaacatc	1920
agcattgaaa atctcagcag cgacatcatc ggtcagttgg aactgatgcc gaacattgaa	1980
cgctttccga acggcaaaaa atatgaactg gacaagtata ccatgttcca ttacttacgc	2040
gcacaggaat ttgagcacgg caagagccgc attgcgctga ccaatagcgt taacgaggcc	2100
ttgttaaata cgagccgtgt ctacacgttc ttcagcagcg attatgtcaa aaaagtgaac	2160
aaggcgaccg aagccgcgat gtttttgggc tgggtcgagc aattggttta cgattttacc	2220
gacgaaacca gcgaggtgag cacgaccgac aaaattgcag atatcaccat catcattccg	2280
tacatcggtc cggcgctcaa tatcggcaat atgttataca aggacgactt tgtgggcgcg	2340
ctgatcttta gggcgcggt tatcttatta gaattcatcc cggagatcgc aatccccgtc	2400
ttgggcacct ttgcgttggg gagctatatc gcgaataaag tgctcacggt ccaaaccatc	2460
gataacgcgc tcagcaagcg taatgagaaa tgggacgagg ttataagta tatcgtgacc	2520
aactggttag caaaagtcaa tacgcagatc gatctcatcc gcaaaaaaat gaaagaagcc	2580
ttggaaaata aagcggaggc aaccaaaaggc atcattaatt accagtataa ccaatatacc	2640
gaagaagaaa aaaacaatat caacttcaat atcgatgatt tgagcagcaa actgaacgag	2700
agcattaaca aagcgatgat taacatcaac aagttcttga atcaatgcag cgtgagctat	2760
ctcatgaaca gcatgatccc gtatggcgtc aaacgcttgg aagattttga cgccagcctg	2820
aaagatgcgc tcctcaagta tatttatgac aaccgcggca ccctcattgg ccaggtggac	2880
cgcttgaagg ataaagtga caatacgctc agcacggata tcccgttcca gctgagcaag	2940
tacgtcgaca accagcgctt actgagcacc tttaccgagt atatcaagaa catcattaat	3000

accagcatcc tcaacttgcg ctatgagagc aatcacctga tcgacctcag ccgctacgcc	3060
agcaagatca acatcggcag caaggtcaat ttcgacccga tcgataagaa tcagatccaa	3120
ttgtttaacc tggaaagcag caagatcgag gttatcttga agaacgcgat tgtgtacaac	3180
agcatgtacg agaactttag cacgagcttc tggattcgta tcccgaagta tttcaatagc	3240
attagcctga ataacgaata taccattatc aactgcatgg aaaataatag cggctggaag	3300
gtgagcttaa attacggcga gatcatttgg accttacagg atacccaaga aatcaaacag	3360
cgcgctcgtct ttaagtatag ccagatgatc aacatcagcg attacatcaa ccgctggatc	3420
ttcgtgacca tcaccaataa tcgcttgaat aatagcaaga ttacatcaa tggctcgcttg	3480
attgatcaaa aaccgatcag caatctcggt aatatccatg ccagcaataa catcatgttt	3540
aagttagacg gttgccgcga taccacccgc tatactctgga tcaagtatct taacttatct	3600
gataaggaac tcaacgaaaa ggaaattaaa gacttatatg acaatcagag caatagcggc	3660
atcctgaagg atttctgggg cgactacctg cagtacgata agccgtacta tatgttgaac	3720
ttgtatgacc cgaacaaata tgtcgatgtg aacaatgtgg gtattcgtgg ctatatgtac	3780
ttaaagggcc cgcgtagtag cgtgatgacc acgaatattt acttaaacag cagcttatac	3840
cgcggcacga agtttattat caagaagtat gccagcggca acaaggacaa tatcgtccgc	3900
aacaacgacc gtgtgtatat taacgtggtg gtgaagaata aagagtaccg cttggccacg	3960
aatgagagcc aggcgggctt ggaaaaaatc ttgagcgcgt tggagatccc ggacgtcggc	4020
aacctcagcc aggttgtggt gatgaagtct aaaaacgacc agggcatcac gaacaagtgc	4080
aaaatgaatt tgcaagataa caacggcaac gacatcggct ttatttggtt tcaccagttc	4140
aataacatcg ccaaactcgt ggccagcaat tgggtataacc gccaaattga acgcagcagc	4200
cgcacgctcg gctgtagctg ggagttcatc ccggtggacg atggctgggg cgagcgcggc	4260
ctcgcaagtc cggcagcacc ggcaccggct tcaccagctg caccagcacc tagcgcaccg	4320
gcagcatctc cagcagcccc tgcaccggca agccctgcag ctccagcacc gtcagcacca	4380
gcagcaagcc cagctgctcc tgcctcagcg agcccagcag cgccagctcc tagtgcccct	4440
gctgcctctc ctgctgctcc ggcaccagca agtccctgctg cgctgcacc gagtgcctcg	4500
gctgctagtc ctgccgcacc agctccggct agtccagctg ctccagcccc ttcagcccct	4560
gcaggagatc tggtgccacg cggttccgcg aattcgagct ccgtcgacaa gctttggagc	4620
caccgcagtc tcgaaaaata a	4641

REIVINDICACIONES

1. Una neurotoxina botulínica recombinante con serotipo A que comprende al menos dos dominios, en donde cada dominio comprende una secuencia de aminoácidos que consiste de entre 70 y 260 restos de aminoácidos, particularmente 100 restos de aminoácidos, 150 restos de aminoácidos o 200 restos de aminoácidos, en donde dicha secuencia de aminoácidos consiste en restos de prolina, alanina y serina, en donde la neurotoxina comprende además seis modificaciones de aminoácidos en el exosítio alfa de la cadena ligera de la neurotoxina en las posiciones D102, T109, K340, I348, N353, K356, en donde estos aminoácidos se sustituyen como sigue D102F, T109R, K340M, I348L, N353M, K356R y cuatro modificaciones de aminoácidos en el exosítio beta de la cadena ligera de la neurotoxina en las posiciones G169, T220, P239, S254, en donde estos restos de aminoácidos se sustituyen como sigue G169I, T220R, P239M, S254T, en donde la neurotoxina botulínica de serotipo A tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 95 % con la parte correspondiente de la neurotoxina botulínica de serotipo A precursora, y en donde la neurotoxina botulínica de serotipo A produce tanto (i) un aumento en la duración del efecto respecto a una neurotoxina botulínica de serotipo A parental como (ii) un aumento en la actividad biológica específica con respecto a una neurotoxina botulínica de serotipo A que comprende dos dominios que consisten en restos de prolina, alanina y serina sin dichas modificaciones en el exosítio alfa y/o en el exosítio beta de la cadena ligera de la neurotoxina.
2. Una composición que comprende la neurotoxina recombinante de la reivindicación 1.
3. Una composición farmacéutica que comprende la neurotoxina recombinante de la reivindicación 1.
4. Uso de la neurotoxina recombinante de la reivindicación 1 para tratamiento cosmético.
5. Un método para generar una neurotoxina recombinante según las reivindicaciones 1, que comprende la etapa de obtener una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica una neurotoxina botulínica monocatenaria recombinante precursora mediante la inserción de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos dos dominios que consisten en prolina, alanina y restos de aminoácidos adicionales, seleccionados del grupo que consiste en restos de serina, treonina, tirosina y glutamina en una secuencia de ácido nucleico que codifica una neurotoxina clostrídica precursora y modificando la secuencia de ácido nucleico que codifica una neurotoxina botulínica precursora en el exosítio alfa y/o en el exosítio beta de la cadena ligera.

Figura 1:

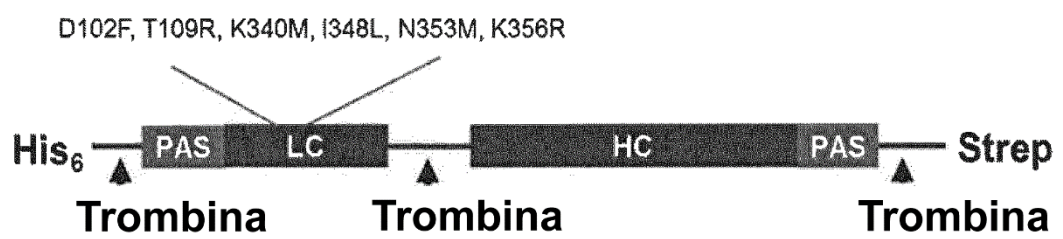


Figura 2:

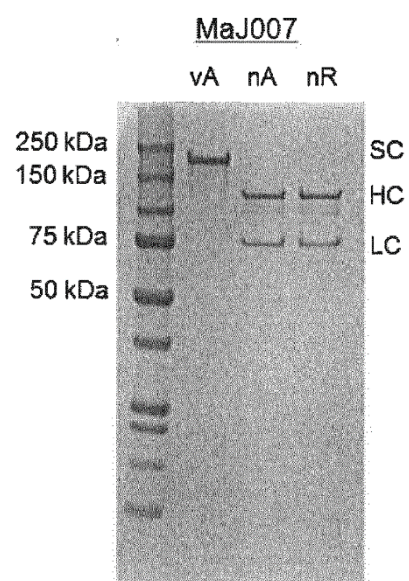


Figura 3:

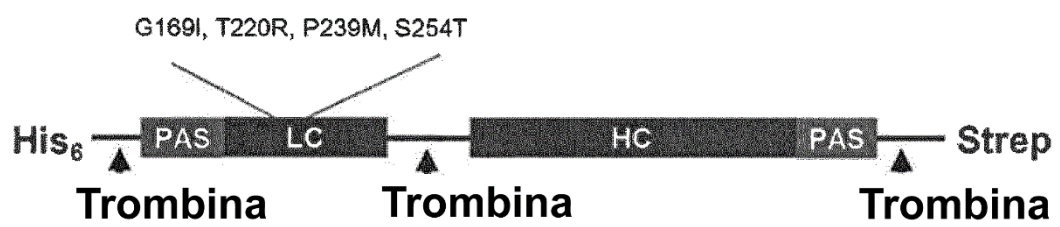


Figura 4:

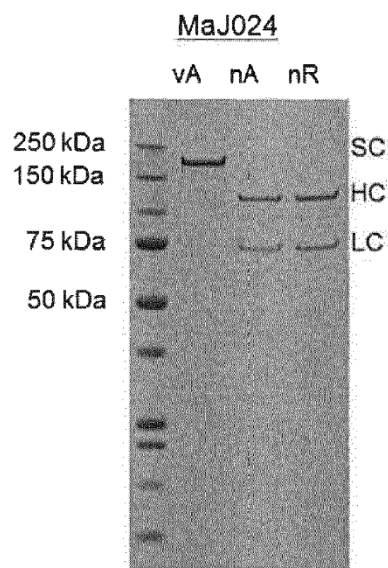


Figura 5:

