



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 333 319**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/08 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03816739 .1**

(96) Fecha de presentación : **28.10.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1578382**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.09.2005**

(54) Título: **Receptores de la neurotoxina botulínica B y su uso.**

(30) Prioridad: **31.10.2002 US 422951 P**
27.08.2003 US 498128 P

(73) Titular/es:
WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
614 North Walnut Street
Madison, Wisconsin 53705-7365, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.02.2010

(72) Inventor/es: **Chapman, Edwin, Raymond y**
Dong, Min

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.02.2010

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Receptores de la neurotoxina botulínica B y su uso.

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Declaración en relación con la investigación o desarrollo patrocinado federalmente

Esta invención se realizó con la ayuda del gobierno de los Estados Unidos otorgada por las siguientes agencias:
 10 NIH MH61876 y GM56827. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes de la invención

Las neurotoxinas de clostridios (CNT) son las sustancias más tóxicas conocidas. Hay ocho toxinas relacionadas -
 15 siete neurotoxinas botulínicas (BoNT/A-G) y una neurotoxina tetánica (TeNT) (Schiavo *et al.*, 2000; Simpson, 1981). Las BoNT pueden producir botulismo y son posibles armas biológicas (Arnon *et al.*, 2001; Mahant *et al.*, 2000). Tanto las BoNT como la TeNT están compuestas por una cadena pesada y ligera; la cadena pesada media la unión a la superficie de terminales nerviosas específicas. Una vez internalizada por endocitosis, la cadena ligera se transloca desde el lumen de la vesícula al citoplasma, donde funciona como proteasa dependiente de cinc (Schiavo *et al.*, 2000).
 20 La cadena ligera escinde uno o más componentes de un complejo de fusión a la membrana conservado compuesto de sintaxina, SNAP-25 y sinaptobrevina (syb), bloqueando de esta manera la exocitosis (Blasi *et al.*, 1993a; Blasi *et al.*, 1993b; Schiavo *et al.*, 1992; Schiavo *et al.*, 1993). Debido a su capacidad de interrumpir selectivamente la exocitosis inducida por Ca^{2+} , las CNT han surgido como herramientas importantes para el estudio de la fusión a la membrana y la transmisión sináptica (Jahn y Niemann, 1994).

25 La primera etapa en la acción de las CNT implica la unión a receptores en la superficie de las neuronas. Los indicios actuales sugieren que los receptores están compuestos de gangliósidos y proteínas que cooperan para formar sitios de unión a toxinas de alta afinidad. Como alternativa, los gangliósidos pueden constituir sitios de unión a toxina con una afinidad relativamente baja que sirven para capturar las CNT para facilitar interacciones con proteínas receptoras de la superficie celular (Montecucco, 1986; Nishiki *et al.*, 1996a). Los gangliósidos son glicoesfingolípidos ubicuos en la cara externa de las membranas plasmáticas. Se clasifican de acuerdo con el número y las posiciones de los ácidos siálicos presentes en sus grupos de cabeza. Los polisialiogangliósidos, que están presentes casi exclusivamente en neuronas y en células neuroendocrinas, se unen a las CNT con la máxima avidez (Halpern y Neale, 1995). Aunque en el reconocimiento toxina-célula también está implicado claramente un componente proteico, en el momento actual no se ha identificado una proteína que medie la entrada de la toxina (Schiavo *et al.*, 2000).

Estudios bioquímicos han llevado a la identificación de un puñado de proteínas de unión a CNT. En la mayoría de los casos, estas proteínas de unión no parecen funcionar como receptores que median la entrada de las toxinas. Por ejemplo, se notificó que BoNT/A,B,E y TeNT se unían a sinapsina I y aducina, respectivamente (Schengrund *et al.*, 1996; Schengrund *et al.*, 1993; Schengrund *et al.*, 1992). Como ninguna de estas proteínas está expuesta en la superficie externa de las células, es poco probable que funcionen como receptores de la superficie celular. Se notificó que TeNT se unía a Thy-1, una proteína de la membrana plasmática anclada a GPI. Sin embargo, las neuronas de ratones que carecen de Thy-1 siguen siendo sensibles a TeNT, lo que sugiere que Thy-1 no es esencial para la entrada de TeNT en las células (Herreros *et al.*, 2001).

45 Las sinaptotagminas (syt) I y II (Nishiki *et al.*, 1994) son proteínas de membrana de la vesícula sináptica homólogas que se cree que funcionan como sensores de Ca^{2+} para la exocitosis (Chapman, 2002; Schiavo *et al.*, 1998). Se notificó que Syt I y II se unía a BoNT/B en presencia de gangliósidos; la constante de disociación para el complejo syt I-BoNT/B era de 2,3 nM y la constante de disociación para syt II-BoNT/B era de 0,23 nM. (Nishiki *et al.*, 1996a).
 50 La unión de alta afinidad de BoNT/B a fibroblastos se reconstituyó por expresión de syt II e incorporación de gangliósidos exógenos en membranas de la superficie. Sin embargo, la unión no producía la escisión de la proteína diana de BoNT/B, syb II, que se había co-expresado con syt II, lo que indica que la toxina no se internalizaba (Nishiki *et al.*, 1996b). Aunque los estudios bioquímicos establecían claramente que syt se une a BoNT/B, no existen indicios de que la unión media la entrada en las células. De esta manera, sigue sin saberse si esta interacción tiene algún papel funcional. Más recientemente, también se ha notificado que BoNT/A y E se unen a syt I, aunque de una manera independiente de gangliósidos (Li y Singh, 1998).

Syt II es una proteína de 422 aminoácidos que contiene un dominio luminal (a.a. 1-60), un dominio transmembrana (a.a. 61-87) y un dominio citoplásrico (a.a. 88-422). El dominio citoplásico contiene dos dominios C2: C2A (a.a. 88-267) y C2B (a.a. 275-422) unidos por una región enlazadora (a.a. 268-274).

60 La determinación de si cualquiera de las proteínas anteriores, o quizás otras proteínas, sirve como receptor de BoNT/B será extremadamente útil para diseñar moléculas que puedan reducir o inhibir completamente la toxicidad de BoNT/B. Por la misma razón, una vez que se ha identificado un receptor, es importante localizar el dominio de unión a BoNT porque podrían usarse polipéptidos que contienen el dominio y peptidomiméticos de los mismos para competir con el receptor por la unión a BoNT, reduciendo o inhibiendo completamente de esta manera la toxicidad de BoNT.

Breve compendio de la invención

La presente invención se basa en la identificación de syt I y II como receptores de BoNT/B así como en la identificación de los dominios de unión a BoNT/B en syt I y II.

5 La presente invención proporciona el uso de un agente que reduce la unión entre BoNT/B y su receptor de la superficie celular en la fabricación de un medicamento para reducir la toxicidad de BoNT/B en un sujeto humano o un sujeto animal no humano, donde el agente comprende (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre los aminoácidos 1-87 de la SEC ID Nº: 7, los aminoácidos 40-267 de la SEC ID Nº: 7, los aminoácidos 1-267 de la SEC ID Nº: 7, los aminoácidos 1-422 de la SEC ID Nº: 7 y (ii) un gangliósido.

10 La presente invención proporciona además un agente que reduce la unión entre BoNT/B y su receptor de la superficie celular para uso en la reducción de la toxicidad de BoNT/B en un sujeto humano o un sujeto animal no humano, donde el agente comprende (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre los aminoácidos 1-87 de la SEC ID Nº: 7, los aminoácidos 40-267 de la SEC ID Nº: 7, los aminoácidos 1-267 de la SEC ID Nº: 7, los aminoácidos 1-422 de la SEC ID Nº: 7 y (ii) un gangliósido.

15 La presente invención además proporciona un método para detectar BoNT/B o *Clostridium botulinum* que comprende las etapas de:

20 exponer una muestra que se sospecha que contiene BoNT/B a un polipéptido que comprende los aminoácidos 40-60 de la SEC ID Nº: 7, siempre que se excluya un polipéptido que comprende una sinaptotagmina I o II de longitud completa; y

25 detectar la unión del polipéptido a BoNT/B.

30 También se hace referencia a un ácido nucleico aislado que contiene una secuencia codificante para el dominio de unión a BoNT/B de syt I o II de rata, ratón o humano, o para una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70%, 80%, 90% o 95% con el dominio de unión a BoNT/B anterior. También se hace referencia a un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 80% con la secuencia codificante del dominio de unión a BoNT/B de syt I y II de rata, ratón o humano o que hibrida con la secuencia codificante en condiciones de hibridación rigurosas o moderadamente rigurosas. El ácido nucleico de la presente invención puede proporcionarse en un vector o célula hospedadora y unirse de forma operativa a una secuencia de control de la expresión no nativa. En el caso de syt I y II humanos, los dominios de unión a BoNT/B son los aminoácidos 33-53 y 37-57, respectivamente. Para syt I y II de rata o ratón, los dominios de unión a BoNT/B son los aminoácidos 32-52 y 40-60, respectivamente.

35 La presente invención también se hace referencia a un polipéptido aislado que contiene el dominio de unión a BoNT/B de syt I y II de rata, ratón o humano o a una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70%, 80%, 90% o 95% con el dominio anterior. También se hace referencia a un anticuerpo específico para el dominio de unión a BoNT/B de syt I o II de rata, ratón o humano o a una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70%, 80%, 90% o 95% con el dominio anterior.

40 Otros aspectos de la invención se refieren a métodos para reducir la toxicidad de BoNT/B y a métodos para detectar BoNT/B o *Clostridium botulinum*.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

45 La Fig. 1 muestra interacciones entre isoformas de syt y BoNT/A, B y E. A) Panel superior, diagrama esquemático de las construcciones de syt usadas en los experimentos de precipitación a través de GST. Para facilitar la purificación, todas las construcciones de syt carecían de un dominio C2B; la flecha indica el extremo C de las syt truncadas. El dominio transmembrana (TMD) está indicado por un rectángulo negro. En el panel central, la GST o las proteínas de fusión a GST indicadas se incubaron con BoNT/B, A y E 30 nM con (+; 25 µg/ml) o sin (-) gangliósidos en 100 µl de TBS. El setenta por ciento de los materiales unidos se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia usando anticuerpos policlonales anti-CNT. "Total" corresponde a 80 ng de toxina. En el panel inferior, la cantidad de proteína de fusión se varió como se indica. B) Los ensayos de unión se realizaron como en (A). Los fragmentos N-terminales de syt II y IX sirvieron como controles positivo y negativo respectivamente, y en dos construcciones químéricas, en las que se intercambiaron los dominios luminales de syt II y IX, se ensayó la actividad de unión a la toxina. C) Los ensayos de unión se realizaron como en (A) usando syt II 1-87 inmovilizada y las concentraciones indicadas de BoNT/B. La toxina unida se visualizó por tinción con azul de Coomassie; la unión era estequiométrica en la saturación. La cadena pesada (H) de BoNT/B se desplaza hasta 100 kDa, la cadena ligera (L) se desplaza hasta 50 kDa. El asterisco indica un fragmento proteolítico de GST-syt II 1-87.

50 La Fig. 2 muestra la localización del sitio de unión de BoNT/B dentro del dominio luminal de syt II. A) Los ensayos de unión se realizaron como en la Fig. 1A, usando los mutantes de truncamiento de syt II indicados. El panel superior muestra un esquema de los mutantes de truncamiento donde (+) indica unión y (-) indica ausencia de unión. B) Secuencia del extremo amino de syt I y II. La región subrayada (restos 40-60 en syt II; restos 32-52 en syt I) es crítica para la unión de BoNT/B; los asteriscos indican diferencias de secuencia. El TMD está recuadrado. C) Panel

ES 2 333 319 T3

superior - Un péptido, P21, que corresponde a los restos 40-60 de syt II más un resto de cys C-terminal se conjugó con perlas de agarosa y se usó para precipitar la toxina como se describe en (A); un péptido con la secuencia cambiada, P21S (IKMNDAEFFGKSNFQEKKLEKEC, SEC ID N°: 5), sirvió como control negativo. Panel inferior - P21, pero no P21S, bloqueaba la interacción entre BoNT/B y el fragmento 1-87 de syt II. Los ensayos de unión se realizaron como en (A), pero como una función de la concentración indicada de P21 o P21S.

La Fig. 3 muestra que la entrada de BoNT/B en células PC12 depende de la expresión de syt I y la carga previa de las células con gangliósidos. A) Las células PC12 se dejaron sin tratar o se precargaron con gangliósidos. Después, las células se incubaron con BoNT/B 50 nM durante 48 h, se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y se tiñeron usando un anticuerpo de conejo anti-BoNT/B; el anticuerpo secundario era un anticuerpo de cabra anti-conejo-FITC. La carga previa de las células con gangliósidos produjo actividad de unión a la toxina. B) Las células PC12 se precargaron (+) o no (-) con gangliósidos; después, las células se incubaron con (+) o sin (-) BoNT/B 50 nM durante 48 h y se recogieron. Veinte μ g de cada muestra se sometieron a SDS-PAGE y a análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos anti-syb II (C1 69-1) o anti-syt I (C1 41.1). La carga previa de las células con gangliósidos mediaba la entrada de la toxina, como se demuestra por la escisión de syb II. Se sondó con syt I para asegurar una carga equivalente en los geles. C) Los experimentos se realizaron como en el apartado (B) anterior, con la excepción de que se compararon células PC12 de tipo silvestre con las células syt I⁻ (Shoji-Kasai *et al.*, 1992). Se sondó con α/β -SNAP para asegurar una carga equivalente. En ausencia de syt I, BoNT/B no puede entrar en las células PC12 para escindir syb II, aunque las células se hayan precargado con gangliósidos. D) Entrada de BoNT/A y E en células PC12 Syt I⁻. Se incubaron células PC12 Syt I⁻ con BoNT/A 30 nM o BoNT/E 50 nM durante 48 h; la entrada se controló ensayando con respecto a la escisión de SNAP-25. Los asteriscos indican productos de escisión de SNAP-25.

La Fig. 4 demuestra que Syt II media la entrada de BoNT/B en células PC12. A) Se subclonó syt II de ratón de longitud completa en pCDNA3.1(-) y se usó para transfectar células PC12. Las células se seleccionaron con G418 y se establecieron varias líneas monoclonales independientes y se seleccionaron con respecto a la expresión de syt II por análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo de conejo anti-syt II; en los geles se cargaron 30 μ g de proteína de los clones syt II⁺ y 100 μ g de los clones syt II⁻. Los clones N° 1, 5 y 10 expresaban syt II (syt II⁺), los clones N° 8, 9 y 13 carecían de syt II (syt II⁻). Como el clon N° 5 expresaba bajos niveles de syt II (panel izquierdo), también se incluyó una muestra de 100 μ g de este clon en las transferencias de los clones de syt II⁻ para confirmar que este clon expresa syt II. B) Se decoraron células PC12 de tipo silvestre o syt II⁺ (clon N° 1) con BoNT/B 30 nM como se describe en la Fig. 3A. C) La entrada de BoNT/B (15 nM) en células PC12 se ensayó como se describe en la Fig. 3B. Se observó entrada de la toxina en todos los clones syt II⁺, y no se observó en ninguno de los clones syt II⁻. Como control, se analizó en paralelo una línea parental de células PC12.

La Fig. 5 demuestra que los fragmentos de syt II que contienen el sitio de unión a BoNT/B bloquean la unión y la entrada de la toxina en células syt II⁺. A) Las células se decoraron con BoNT/B como en la Fig. 3A en ausencia o presencia de los fragmentos de syt II indicados. Syt II 1-267 y 61-267 se purificaron usando un marcador de his6 en el extremo amino y syt II 1-87 se purificó como una proteína de fusión con GST y se eluyó de las perlas usando glutatión. Los fragmentos de 1-267 y 1-87 de syt, así como el péptido P21 (restos 40-60), bloqueaban la unión; 61-267 y P21S no tuvieron ningún efecto. Los fragmentos 1-267 y 61-267 de syt II forman agregados unidos a las membranas celulares (Bai *et al.*, 2000), como se visualiza con un anticuerpo anti-his6 en el panel inferior; en el caso de syt II 1-267, estos agregados también contenían BoNT/B. Las concentraciones finales de proteína recombinante y péptidos en el medio fueron 960 nM y 10 μ M, respectivamente; la concentración final de BoNT/B fue 30 nM. B) Se trataron células PC12 Syt II⁺ (clon N° 1) con BoNT/B 3° nM que se había premezclado con la concentración indicada del fragmento 1-267 de syt II en ausencia (panel superior) o presencia de gangliósidos (25 μ g/ml; panel inferior) durante 48 h. Las muestras se analizaron por inmunotransferencia como se describe en la Fig. 3B. La escisión de syb II se inhibió por el fragmento 1-267 de syt II; la inclusión de gangliósidos aumentó la capacidad del fragmento de syt de bloquear la escisión de syb II. El fragmento 61-267 no tuvo ningún efecto. C) Los experimentos se realizaron como en (A), pero usando los péptidos P21 o P21S.

La Fig. 6 muestra actividad dependiente de la captación de BoNT/B, seguido de la escisión de syb II en terminales nerviosas motoras de diafragma de rata. Se incubaron preparaciones de diafragma de rata con BoNT/B (5 nM) en solución de Ringer de mamífero. Se dejaron sin estimular (control), se estimularon con una alta concentración de potasio (estimuladas), o se estimularon en presencia de una mezcla de BoNT/B y el fragmento proteico syt II 1-267 ó 61-267 (1 μ M) más gangliósidos (25 μ g/ml). Despues se fijaron, se permeabilizaron y se bloquearon. Las terminales nerviosas de control (no estimuladas) muestran inmunofluorescencia brillante para syb II y un marcaje muy débil de BoNT/B. La estimulación durante la incubación con BoNT/B produjo una inmunofluorescencia de syb II reducida en gran medida, mientras que los niveles de BoNT/B aumentan notablemente. La estimulación en presencia de BoNT/B y syt II 1-267/gangliósidos tuvo como resultado la protección de las terminales nerviosas, observada como una conservación de la tinción de syb II y niveles reducidos en gran medida de la unión de BoNT/B. A) Cuantificación de los niveles de BoNT/B en diferentes condiciones. La estimulación aumenta en gran medida la unión de BoNT/B, y esto puede bloquearse por co- incubación con syt II 1-267/gangliósidos. El fragmento 61-267 de syt más gangliósidos no pudo bloquear la unión de BoNT/B. B) Cuantificación de los niveles de syb II. Los niveles de syb II muestran un patrón complementario a los observados con BoNT/B. Los niveles de inmunofluorescencia son elevados en tejido no estimulado, pero se reducen después de la estimulación. La inclusión de syt II 1-267/gangliósidos pero no de 61-267/gangliósidos con BoNT/B protege a syb II de la escisión. En los paneles (A) y (B), las barras de error representan el error típico de la media (N = 15-22).

La Fig. 7 muestra protección de ratones de la toxicidad de BoNT/B usando fragmentos de syt II. A) La toxicidad específica de BoNT/B en ratones hembra se determinó mediante un ensayo intravenoso de tiempo transcurrido hasta la muerte (Boroff y Fleck, 1966). La curva patrón se usó para convertir los valores de tiempo transcurrido hasta la muerte (minutos) en DL_{50}/ml . Los valores de DL_{50}/ml resultantes se usaron para calcular el % de neutralización de la toxicidad usando la expresión: $1 - [DL_{50}/\text{ml} (+ \text{fragmento de syt II})/DL_{50}/\text{ml} (- \text{fragmento de syt II})] \times 100$, donde (+ fragmento de syt II) se refiere a muestras que contienen toxina, gangliósidos y proteínas recombinantes y (- fragmentos de syt II) a muestras compuestas de toxina y gangliósidos únicamente. B) Los fragmentos de syt indicados ($5 \mu\text{M}$) se premezclaron con gangliósidos ($250 \mu\text{g}/\text{ml}$) y concentraciones de BoNT/B que están en el intervalo lineal de la curva patrón en el panel A (es decir, 10^5 - $10^6 \text{ DL}_{50}/\text{ml}$) durante 10 min a temperatura ambiente, y se inyectaron por vía intravenosa ($100 \mu\text{l}$) en ratones. El porcentaje de neutralización se determinó como se describe en el panel A. En todos los experimentos *in vivo*, las concentraciones indicadas corresponden a la concentración inicial antes de la inyección i.v.; el factor de dilución en el sistema circulatorio es de aproximadamente 1:10. C) Los experimentos se realizaron como se describe en el panel B, pero como una función de la concentración de syt II 1-267 ó 1-87. D) Inyección previa de gangliósidos ($250 \mu\text{g}/\text{ml}$) más mezclas de syt II 1-267 ($17 \mu\text{M}$) o 1-87 ($20 \mu\text{M}$) protege a los ratones de la exposición posterior a BoNT/B. Los experimentos se realizaron como en (B), con la excepción de que la toxina se inyectó 1 min después de la inyección del complejo del receptor. Nota: en los paneles (B-D), cada punto de datos representa la media de determinaciones al menos triplicadas; el error estaba dentro de +/- 10%.

La Fig. 8 muestra la localización del sitio de unión a BoNT/B dentro del dominio luminal de syt I. Los ensayos de unión se realizaron como se describe en la Fig. 2A, usando los mutantes de truncamiento de syt I indicados. El panel superior muestra un esquema de los mutantes de truncamiento donde (+) indica unión y (-) indica ausencia de unión.

La Fig. 9 demuestra la internalización simultánea y específica de anticuerpos contra el dominio luminal de syt I y BoNT/B en células PC12. A) BoNT/B y los anticuerpos α -syt I_N se unen simultáneamente a syt I. La co-immunoprecipitación del fragmento 1-265 de syt I ($1,5 \mu\text{M}$) con BoNT/B (300nM) se realizó como se describe en la sección de Métodos. La toxina inmunoprecipitada y syt I 1-265 se detectaron en transferencias de western usando ECL. B) Se precargaron células PC12 con gangliósidos y se incubaron con BoNT/B (50nM) más anticuerpos α -syt I_N ($10 \mu\text{l}/\text{ml}$) durante 10 min a 37°C en tampones de alta $[K^+]$. Después, las células se lavaron, se fijaron y se permeabilizaron como se describe en la sección de Métodos en el Ejemplo mostrado más adelante. Panel superior: las células PC12 pudieron captar anticuerpos α -syt I_N y BoNT/B después de la despolarización. Panel central: los experimentos se realizaron como se ha indicado anteriormente, con la excepción de que se usaron anticuerpos α -syt I_C - este anticuerpo no se captó después de la despolarización y por lo tanto sirve como control negativo. Panel inferior: los experimentos se realizaron como se ha descrito en el panel (A) anterior, con la excepción de que se usaron células syt I^- . Las células syt I^- no pudieron captar ni anticuerpo α -syt I_N ni BoNT/B.

35 Descripción detallada de la invención

En la presente memoria se describe que entre muchas proteínas que pueden unirse a BoNT/B, syt I y II son los receptores de BoNT/B que median la entrada de la toxina en la célula y la neurotoxicidad. También se describen el dominio de unión a BoNT/B y el dominio de unión a gangliósidos de syt I y II. Aunque syt I necesita tanto el dominio de unión a BoNT/B como el dominio de unión a gangliósidos además de gangliósidos para la unión a BoNT/B, syt II sólo necesita su dominio de unión a BoNT/B para unirse a BoNT/B. El conjunto de dominio de unión a gangliósidos junto con los gangliósidos puede aumentar la unión entre BoNT/B y syt II. La descripción de la presente memoria proporciona nuevas estrategias de prevención y tratamiento para la toxicidad de BoNT/B y el botulismo. La descripción de la presente memoria también proporciona nuevas herramientas para identificar agentes que puedan usarse para reducir la unión entre BoNT/B y syt I o II y, por lo tanto, la entrada de BoNT/B en la célula y la toxicidad.

En la técnica se sabe que la función y las secuencias de aminoácidos de syt I y II están conservadas entre las especies animales. Aunque la descripción de la presente memoria se basa en los descubrimientos con syt I de rata y syt II de ratón, los descubrimientos se aplican a todas las especies animales que tienen dominios de unión a BoNT/B de syt I o II o dominios de unión a gangliósidos conservados con respecto a los dominios correspondientes de syt I de rata y syt II de ratón. Por ejemplo, para los dominios de unión a BoNT/B de syt I y II y sus dominios de unión a gangliósidos, las secuencias de aminoácidos humanas, de rata y de ratón tienen una identidad de al menos 94%. Como ejemplos adicionales, los dominios de unión a BoNT/B de syt I de pollo (Nº de Acceso del GenBank P47191) y *Discopyge ommata* (Nº de Acceso del GenBank P24506 y P24505) tienen una identidad de 80% y 78% con el dominio de unión a BoNT/B de rata, respectivamente, y el dominio de unión a gangliósidos de syt I de *Discopyge ommata* tiene una identidad de aproximadamente 80% con el de syt I de rata. Es de esperar que para un dominio de unión a BoNT/B o un dominio de unión a gangliósidos de syt I o syt II de ser humano, rata y ratón, cualquier polipéptido que tenga una identidad de al menos 70% con uno de estos dominios en toda la longitud de los dominios conservará sus funciones en la unión a BoNT/B y a gangliósidos.

Las secuencias de nucleótidos de syt I de ratón y rata se proporcionan como SEC ID Nº: 1 y 3 (Nº de Acceso del GenBank D37792 y X52772), respectivamente, y las secuencias de aminoácidos correspondientes se proporcionan como SEC ID Nº: 2 y 4. Las secuencias de nucleótidos de syt II de ratón y rata se proporcionan como SEC ID Nº: 6 y 8 (Nº de Acceso del GenBank D37793 y M64488), respectivamente, y las secuencias de aminoácidos correspondientes se proporcionan como SEC ID Nº 7 y 9. Las secuencias de aminoácidos de syt I y syt II humanas se proporcionan como SEC ID Nº 5 y 10 (Nº de Acceso del GenBank NP_005630 y Q8N910), respectivamente. Para syt I y II murinas (de rata o ratón), los dominios de unión a BoNT/B son los aminoácidos 32-52 y 40-60, respectivamente, y los dominios

ES 2 333 319 T3

de unión a gangliósidos son los aminoácidos 53-79 y 61-87, respectivamente. Para syt I y II humanas, los dominios de unión a BoNT/B son los aminoácidos 33-53 y 37-57, respectivamente, y los dominios de unión a gangliósidos son los aminoácidos 54-80 y 58-84, respectivamente. En la técnica están disponibles las secuencias de aminoácidos de syt I y II de algunas otras especies animales y un especialista puede determinar fácilmente sus dominios de unión a BoNT/B y gangliósidos usando cualquier programa de alineamiento u otros métodos basados en la descripción de la presente memoria.

10 *Polipéptidos, ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras que contienen el dominio de unión a BoNT/B de syt I o II*

La expresión “polipéptido aislado” o “ácido nucleico aislado” usadas en la presente memoria se refieren a un polipéptido o ácido nucleico aislado de su entorno natural o preparado usando métodos sintéticos tales como los conocidos por un especialista habitual en la técnica. En cualquier caso no se requiere una purificación completa. Los polipéptidos y ácidos nucleicos pueden aislarse y purificarse a partir del material con el que están asociados normalmente de formas convencionales de tal manera que en la preparación purificada el polipéptido o el ácido nucleico sea la especie predominante en la preparación. Como mínimo, el grado de purificación debe ser tal que el material extraño en la preparación no interfiera con el uso del polipéptido o ácido nucleico de la manera descrita en la presente memoria. El polipéptido o ácido nucleico preferiblemente tiene una pureza de al menos aproximadamente 85%, más preferiblemente de al menos aproximadamente 95% y aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 99%.

Además, un ácido nucleico aislado debe tener una estructura que no sea idéntica a la de ningún ácido nucleico natural o a la de ningún fragmento de un ácido nucleico genómico natural que incluya más de tres genes separados. Un ácido nucleico aislado también incluye, sin limitación, (a) un ácido nucleico que tiene una secuencia de una molécula de ácido nucleico genómica natural o extracromosómica pero que no está flanqueada por las secuencias codificantes que flanquean la secuencia en su posición natural; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en un genoma procariota o eucariota de tal forma que la molécula resultante no sea idéntica a ningún vector o ADN genómico natural; (c) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que forma parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión. Se excluyen específicamente de esta definición ácidos nucleicos presentes en mezclas de clones, por ejemplo, como aparecen en una biblioteca de ADN tal como un ADNc o una biblioteca de ADN genómico. Un ácido nucleico aislado puede ser ADN o ARN modificado o no modificado, completamente o parcialmente monocatenario o bicatenario o incluso tricatenario. Un ácido nucleico puede modificarse química o enzimáticamente y puede incluir denominadas bases no convencionales tales como inosina.

También se hace referencia a un polipéptido aislado que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70%, 80%, 90% o 95% con la del dominio de unión a BoNT/B de syt I o II de rata, ratón o humano. Se excluye específicamente del polipéptido de la presente invención uno que contiene syt I o II de longitud completa. En una realización preferida, el polipéptido aislado tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre los aminoácidos 32-52 de la SEC ID Nº: 2 ó 4, los aminoácidos 33-53 de la SEC ID Nº 5; los aminoácidos 40-60 de la SEC ID Nº: 7 ó 9, o los aminoácidos 37-57 de la SEC ID Nº: 10.

Opcionalmente, el polipéptido aislado también contiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70%, 80%, 90% o 95% con el dominio de unión a gangliósidos de syt I o II de rata, ratón o humano. El dominio de unión a BoNT/B y el dominio de unión a gangliósidos presentes en el mismo polipéptido no tienen que proceder de la misma proteína y especie. Por ejemplo, un polipéptido puede contener un dominio de unión a BoNT/B de syt I de una especie y un dominio de unión a gangliósidos de syt II de otra especie. Los dominios de unión a gangliósidos de syt I y II son iguales que los dominios transmembrana. En una realización preferida de la presente invención, un polipéptido contiene además una secuencia de aminoácidos seleccionada entre los aminoácidos 53-79 de la SEC ID Nº: 2 ó 4, los aminoácidos 54-80 de la SEC ID Nº: 5, los aminoácidos 61-87 de la SEC ID Nº 7 ó 9, o los aminoácidos 58-84 de la SEC ID Nº: 10.

Los ejemplos de polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los que contienen los aminoácidos 32-52 ó 32-79 de syt I de ratón o rata, los aminoácidos 33-53 ó 33-80 de syt I humano, los aminoácidos 40-60, 1-61, 1-87, 40-87, 40-267 ó 1-267 de syt II de ratón o rata, los aminoácidos 37-57, 1-57, 1-84, 37-84, 37-264 ó 1-264 de syt II humano o un fragmento de syt I o II de otra especie animal que corresponda a cualquiera de los fragmentos de syt I y II anteriores. Se entiende que pueden introducirse sustituciones, tales como sustituciones conservativas, en posiciones de aminoácidos no críticas y que esto no afectará materialmente a la función del dominio de unión a BoNT/B de syt I o II. También se hace referencia a un polipéptido aislado que contiene el dominio de unión a BoNT/B de syt I o II con dichas sustituciones. El polipéptido aislado de la invención puede incluir uno o más aminoácidos en los extremos N-terminal y C-terminal del dominio de unión a BoNT/B de syt I o II, cuando el aminoácido o los aminoácidos adicionales no afecten materialmente a la función del dominio (unión a BoNT/B). Cualquier aminoácido adicional puede tener un uso ventajoso en la purificación, detección o estabilización del polipéptido, aunque no necesariamente tiene este uso.

Para mejorar la estabilidad y/o propiedades de unión de un polipéptido, la molécula puede modificarse por medio de la incorporación de aminoácidos no naturales y/o enlaces químicos no naturales entre los aminoácidos. Dichas moléculas se denominan peptidomiméticos (H.U. Saragovi *et al.* Bio/Technology (1992), Vol 10, 773-778; S. Chen

et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) Vol 89, 5872-5876). La producción de estos compuestos se restringe a la síntesis química. Debe entenderse que un polipéptido puede modificarse para transformarse en un peptidomimético sin anular su función. Esto puede conseguirse fácilmente por un especialista en la técnica.

5 También se hace referencia a un ácido nucleico aislado que contiene un polinucleótido codificante o su complemento, donde el polinucleótido codificante tiene una secuencia codificante no interrumpida que codifica un polipéptido de la invención como se ha indicado anteriormente. Un ácido nucleico que contiene un polinucleótido que puede hibridar con el polinucleótido codificante o su complemento, en condiciones de hibridación rigurosas o moderadamente rigurosas, es útil para detectar el polipéptido codificante. Las condiciones de hibridación rigurosas se definen como 10 hibridación a 68°C en SSC 5x/solución de Denhardt 5x/SDS al 1,0%, y lavado en SSC 0,2x/SDS al 0,1% +/- 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a temperatura ambiente, y las condiciones de hibridación moderadamente rigurosas se definen como el lavado en el mismo tampón a 42°C. En la técnica se pueden adquirir fácilmente 15 directrices adicionales con respecto a estas condiciones, por ejemplo, por Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel *et al.* (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, N.Y.) en la Unidad 2.10. Un ácido nucleico que contiene un polinucleótido que tiene una identidad de al menos 80% con el polinucleótido codificante o su complemento a lo largo de toda la longitud del polinucleótido codificante también puede usarse como sonda para detectar el polinucleótido codificante. Se excluye específicamente de la presente invención un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica syt I o II de longitud completa.

20 En un aspecto relacionado, cualquier ácido nucleico descrito anteriormente puede proporcionarse en un vector de una manera conocida para los especialistas de la técnica. El vector puede ser un vector de clonación o un vector de expresión. En un vector de expresión, el polinucleótido que codifica el polipéptido está bajo el control transcripcional de una o más secuencias de control de la expresión no nativas que pueden incluir un promotor no encontrado de forma 25 nativa adyacente al polinucleótido de tal forma que el polipéptido codificado pueda producirse cuando el vector se proporcione a una célula hospedadora compatible o a un sistema de transcripción y traducción sin células. Dichos sistemas basados en células y sin células son bien conocidos para un especialista en la técnica. Se hace referencia a células que comprenden un vector que contiene dicho ácido nucleico. También se hace referencia a una célula hospedadora que tiene dicho ácido nucleico integrado en su genoma en un sitio no nativo.

30

Agentes para reducir la neurotoxicidad de BoNT/B

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un agente para uso en la reducción de la toxicidad celular de BoNT/B en células diana tales como neuronas. Como resultado, puede prevenirse o tratarse el botulismo. La expresión “reducción de la toxicidad celular de BoNT/B” incluye cualquier nivel de reducción de la toxicidad de BoNT/B. La toxicidad de BoNT/B puede reducirse reduciendo los niveles de proteína syt I o syt II en células diana, inhibiendo las 35 funciones celulares relacionadas con BoNT/B de syt I o II en células diana, o reduciendo la unión entre BoNT/B y syt I o II localizadas en la superficie celular de células diana. La unión entre BoNT/B y syt I o II puede reducirse bloqueando 40 la unión entre BoNT/B y sus dominios de unión presentes en syt I o II, o reduciendo la unión entre gangliósidos y los dominios de unión a gangliósido presentes en syt I o II. Un especialista en la técnica puede conseguir una reducción en las uniones anteriores bloqueando directamente las uniones o reduciendo la cantidad de syt I, syt II o gangliósidos.

45 *Reducción del nivel de proteína syt I y syt II*

Hay muchos métodos por medio de los cuales pueden reducirse los niveles de proteínas celulares tales como los niveles de syt I y syt II. Como ejemplo, los niveles celulares de syt I y syt II pueden reducirse usando la tecnología antisentido. Por ejemplo, puede dirigirse un oligonucleótido antisentido 20-25mérico contra el extremo 5' del ARNm de syt I o syt II con derivados de fosforotioato en los tres últimos pares de bases de los extremos 3' y 5' para aumentar la semivida y la estabilidad de los oligonucleótidos. Puede usarse un vehículo para el oligonucleótido antisentido. Un ejemplo de un vehículo adecuado es un liposoma catiónico. Por ejemplo, un oligonucleótido puede mezclarse con liposomas catiónicos preparados mezclando 1-alfa dioleilfosfatidiletanolamina con bromuro de dimetildioctadecilamonio en una relación de 5:2 en 1 ml de cloroformo. El disolvente se evaporará y los lípidos se resuspenderán por sonicación 55 en 10 ml de solución salina. Otra forma de usar un oligonucleótido antisentido es introducirlo por ingeniería genética en un vector de forma que el vector pueda producir un ARNc antisentido que bloquee la traducción de los ARNm que codifican syt I y syt II. De forma similar, también son adecuadas para inhibir la expresión de syt I y syt II técnicas de ARNi que ahora se están aplicando a sistemas de mamíferos. (Véase Zamore, *Nat. Struct. Biol.* 8:746:750 (2001)).

60

Syt I y II dominante negativa

También se hace referencia a la identificación de una syt I o syt II dominante negativa que pueda anular los efectos de BoNT/B sobre células que expresan syt I o syt II. Una syt I o syt II dominante negativa puede identificarse 65 introduciendo una mutación en un gen syt I o syt II, expresando el gen syt I o syt II mutado y el gen syt I o syt II de tipo silvestre en la misma célula hospedadora y determinando el efecto de las proteínas syt I o syt II mutadas sobre parámetros que están relacionados con la toxicidad de BoNT/B, que incluyen pero sin limitación la susceptibilidad de la célula hospedadora a BoNT/B, la integración de las proteínas syt I o syt II recién formadas en la membrana de la

ES 2 333 319 T3

célula hospedadora, la unión de syt I o syt II de tipo silvestre a BoNT/B y la captación del complejo de BoNT/B y syt I o syt II en las células. El gen *syt I* o *syt II* de tipo silvestre expresado en la célula hospedadora puede ser el gen *syt I* o *syt II* endógeno o un gen *syt I* o *syt II* introducido en la célula hospedadora. La proteína syt I o syt II dominante negativa identificada puede usarse para anular el efecto de la toxina BoNT/B, lo cual puede conseguirse fácilmente 5 por un especialista en la técnica.

Bloqueo de la unión entre BoNT/B y syt I o II

10 La identificación de syt I o II como receptores de BoNT/B así como las secuencias de unión a BoNT/B en los receptores permite a los especialistas en la técnica bloquear la unión entre BoNT/B y sus receptores por medio de muchas estrategias conocidas. Una estrategia es usar anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para los dominios de unión a BoNT/B de syt I o II para bloquear los sitios de unión a BoNT/B presentes en syt I o II. Como se necesitan gangliósidos para que BoNT/B se una a syt I y también aumentan la unión entre BoNT/B y syt II, 15 también pueden usarse anticuerpos específicos para los dominios de unión a gangliósidos presentes en syt I o II para bloquear o reducir la unión entre BoNT/B y syt I o II. Dado que en la presente memoria se describen las secuencias de aminoácidos de los dominios de unión a BoNT/B y a gangliósidos de syt I o II, está bien dentro de la capacidad de un especialista en la técnica generar anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para estos dominios.

20 Otra estrategia para bloquear la unión entre BoNT/B y syt I o II es usar un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de al menos 70%, 80%, 90% o 95% con un dominio de unión a BoNT/B de syt I o II de rata, ratón o humano, incluyendo las propias syt I o II, para competir con syt I o II localizadas en la superficie celular de células diana por la unión a BoNT/B. Los polipéptidos preferidos contienen un dominio de unión a BoNT/B de syt I o II de rata, ratón o humano. Para bloquear la unión entre BoNT/B y syt I o II en una especie específica, puede 25 usarse un dominio unión a BoNT/B de syt I o II de la misma especie o de una especie diferente. Como syt I necesita gangliósidos para unirse a BoNT/B, el polipéptido que contiene una secuencia relacionada con el dominio de unión a BoNT/B de syt I también debe contener una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de al menos 70%, 80%, 90% o 95% con un dominio de unión a gangliósidos de la rata, ratón o humano, y también deben emplearse 30 gangliósidos. En una realización preferida del método, se usa un dominio de unión a gangliósidos de la rata, ratón o humano. El dominio de unión a gangliósidos en un polipéptido puede proceder de syt I o II y de la misma especie o de una especie diferente del dominio de unión a BoNT/B de syt I. Preferiblemente, el dominio de unión a gangliósidos es el de syt I y de la misma especie que el dominio de unión a BoNT/B. El empleo de gangliósidos es opcional cuando el polipéptido se usa para competir con syt II en células diana. Los polipéptidos adecuados que pueden usarse en la 35 presente invención incluyen, pero sin limitación, los que contienen los aminoácidos 32-79 de syt I de ratón o rata, los aminoácidos 33-80 de syt I humana, los aminoácidos 40-60, 1-61, 1-87, 40-87, 40-267, 1-267 y 1-422 de syt II de ratón o rata, los aminoácidos 37-57, 1-58, 1-84, 37-84, 37-264, 1-264 y 1-419 de syt II humana, y fragmentos en otras especies animales que corresponden a los fragmentos de syt I o II anteriores. El polipéptido puede introducirse en un sujeto humano o no humano por medio de la administración del polipéptido directamente o por medio de la administración 40 de un vector que puede expresar el polipéptido en el sujeto humano o no humano.

40 Los especialistas en la técnica deben entender que en los dominios de unión a BoNT/B de syt I y II pueden introducirse mutaciones tales como sustituciones, inserciones y delecciones sin anular su actividad de unión a BoNT/B. Incluso algunas mutaciones pueden aumentar la actividad de unión. Evidentemente un polipéptido que contiene dichos mutantes puede usarse en el método de la presente invención. Los mutantes de dominio de unión a BoNT/B de syt I y II que retienen la actividad de unión a BoNT/B pueden identificarse usando los métodos de exploración descritos más adelante.

Identificación de agentes que pueden bloquear la unión entre BoNT/B y syt I o II

50 Los agentes que pueden bloquear la unión entre BoNT/B y syt I o II pueden explorarse empleando BoNT/B y un polipéptido que contenga un dominio de unión a BoNT/B de syt I y un dominio de unión a gangliósidos de syt I o II, o un dominio de unión a BoNT/B de syt II, en condiciones adecuadas para que BoNT/B se una al polipéptido. Se incluyen gangliósidos cuando el método se usa para explorar agentes que puedan bloquear la unión de BoNT/B-syt I. 55 Para la exploración de BoNT/B-syt II, es opcional la inclusión de gangliósidos y el dominio de unión a gangliósidos de syt II en el polipéptido. La unión entre BoNT/B y el polipéptido puede medirse en presencia de un agente de ensayo y compararse con la de un control que no se expone al agente de ensayo. Una unión menor que en el control en el grupo del agente de ensayo indica que el agente puede bloquear la unión entre BoNT/B y syt I o II. El dominio de unión a BoNT/B o el dominio de unión a gangliósidos de syt I o II usados en la presente memoria son de rata, ratón o humano. 60 En el método también puede usarse un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70%, 80%, 90% o 95% con el dominio de unión a BoNT/B o el dominio de unión a gangliósidos de syt I o II. Los polipéptidos preferidos para el ensayo de exploración son los dominios de unión a BoNT/B y gangliósidos de syt I y el dominio de unión a BoNT/B de syt II.

65 Hay muchos sistemas con los que estará familiarizado un especialista en la técnica para ensayar la unión entre BoNT/B y el dominio de unión a BoNT/B en syt I o II. En el método de exploración puede usarse cualquiera de estos sistemas. Las condiciones experimentales detalladas pueden determinarse fácilmente por un especialista en la técnica. Por ejemplo, la unión entre BoNT/B y el polipéptido descrito anteriormente puede medirse *in vitro* (sistema

ES 2 333 319 T3

sin células). También puede usarse un sistema de cultivo celular en el que syt I o II se expresan y se translocan a la membrana celular. Para el sistema de cultivo celular, además de la unión entre BoNT/B y syt I o II, también puede usarse la entrada de BoNT/B en las células y otros diversos parámetros tales como los descritos en los ejemplos presentados más adelante como indicador de la unión entre BoNT/B y syt I o II.

5 Para medir la unión entre BoNT/B y el dominio de unión a BoNT/B de syt I o II puede usarse cualquier método conocido por un especialista habitual en la técnica para medir la interacción proteína-proteína. Por ejemplo, dos métodos usados comúnmente son coimmunoprecipitación y columnas de afinidad. Otro método que puede usarse es resonancia de plasmón superficial (SPR). La SPR usa cambios en el índice de refracción para cuantificar la unión y disociación de macromoléculas a ligandos unidos covalentemente sobre una microplaca de oro fino dentro de una microcelda de flujo. Esta técnica se ha usado para estudiar interacciones proteína-proteína en muchos sistemas, incluyendo las interacciones de PA63 con EF y LF (Elliot, J. L. et al., *Biochemistry* 39: 6706-6713, 2000). Proporciona alta sensibilidad y precisión, la capacidad de observar la unión y liberación a tiempo real y el consumo de únicamente pequeñas cantidades de proteína. Además de la constante de disociación en equilibrio (K_d), también pueden obtenerse constantes de activación y desactivación (k_a y k_d). Típicamente, la proteína a estudiar está unida covalentemente a una matriz de carboximetil dextrano unida a la microplaca de oro. La unión de un ligando proteico a la proteína inmovilizada produce un cambio en el índice de refracción de la capa de dextrano/proteína, y esto se cuantifica por SPR. Para estas mediciones puede usarse un instrumento BIACore 2000 (Pharmacia Biotech).

10 20 Para el sistema de cultivo celular, la unión de BoNT/B a syt I o II puede ensayarse marcando las células, describiéndose ejemplos de esto en los ejemplos proporcionados más adelante.

Identificación de agentes que se unen al dominio de unión a BoNT/B de syt I o II

25 Pueden usarse agentes que pueden unirse al dominio de unión de BoNT/B de syt I o II para bloquear la unión entre BoNT/B y syt I o II. Estos agentes pueden identificarse proporcionando un polipéptido que contenga un dominio de unión a BoNT/B de syt I o II a un agente de ensayo, y determinando si el agente se une al dominio de unión a BoNT/B. El dominio de unión a BoNT/B o el dominio de unión a gangliósidos de syt I o II usados en la presente memoria 30 son los de rata, ratón o humano. También puede usarse en el método un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70%, 80%, 90% o 95% con el dominio de unión a BoNT/B de syt I o II. Los polipéptidos preferidos son los dominios de unión a BoNT/B de los propios syt I y syt II. Opcionalmente, los agentes identificados por el método se ensayan adicionalmente con respecto a la capacidad de bloquear la entrada de BoNT/B en las células o neutralizar la toxicidad de BoNT/B. Un especialista en la técnica estará familiarizado con los 35 sistemas adecuados que se pueden usar para el ensayo adicional. En los siguientes ejemplos se proporcionan ejemplos de dichos sistemas.

40 El especialista en la técnica estará familiarizado con muchos sistemas en este campo para ensayar la unión entre un polipéptido y un agente. En el método de la presente invención puede usarse cualquiera de estos sistemas. El especialista en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones experimentales detalladas. Por ejemplo, puede proporcionarse un polipéptido que contenga aminoácidos del dominio de unión a BoNT/B de syt I o II sobre un sustrato adecuado y exponerse a un agente de ensayo. La unión del agente al polipéptido puede detectarse por la pérdida de capacidad del polipéptido de unirse a un anticuerpo o por el marcaje del polipéptido si el agente está marcado con radiactividad, fluorescencia u otras características. En otro ejemplo, un polipéptido que contiene el dominio de unión a BoNT/B de syt I o II puede expresarse en una célula hospedadora, y la célula después se expone a un agente de ensayo. A continuación, el polipéptido puede aislarse, por ejemplo por inmunoprecipitación o electroforesis, y puede determinarse la unión entre el polipéptido y el agente. Como se ha mencionado anteriormente, una manera de determinar la 45 unión entre el polipéptido y el agente es marcar el agente con radiactividad o fluorescencia de forma que el polipéptido que se une al agente se vuelva radiactivo o fluorescente después de la unión. Si el agente de ensayo es un polipéptido, también pueden usarse ejemplos de técnicas específicas para ensayar la unión proteína/proteína como las descritas anteriormente. Debe indicarse que cuando el dominio de unión a BoNT/B de syt I o II usado en el ensayo de exploración 50 tiene secuencias flanqueantes, puede ser necesario confirmar que un agente se une al dominio de unión a BoNT/B en lugar de a las secuencias flanqueantes, lo cual puede conseguirse fácilmente por un especialista en la técnica.

Agentes que pueden explorarse

55 Los agentes explorados en los métodos de exploración anteriores pueden ser, por ejemplo, una molécula de alto peso molecular tal como un polipéptido (incluyendo, por ejemplo, un polipéptido que contiene un dominio de unión a BoNT/B mutante de syt I o II, o un anticuerpo monoclonal o policlonal contra el dominio de unión a BoNT/B o la longitud completa de syt I o II), un polisacárido, un lípido, un ácido nucleico, una molécula orgánica o inorgánica de bajo peso molecular, o similares.

En el mercado están disponibles baterías de agentes para la exploración en forma de diversas bibliotecas químicas, 60 incluyendo bibliotecas peptídicas. Los ejemplos de dichas bibliotecas incluyen las de ASINEX (es decir, la Combined Wisdom Library de 24.000 moléculas orgánicas sintetizadas manualmente) y CHEMBRIDGE CORPORATION (es decir, la biblioteca DIVERSet™ de 50.000 compuestos químicos sintetizados manualmente; la biblioteca SCREEN-Set™ de 24.000 compuestos químicos sintetizados manualmente; la biblioteca CNS-Set™ de 11.000 compuestos;

la biblioteca Cherry-Pick™ de hasta 300.000 compuestos) y la biblioteca lineal, biblioteca multimérica y biblioteca cíclica (Tecnogen (Italia)). Una vez que se ha identificado un agente con la actividad deseada, puede explorarse una biblioteca de derivados de ese agente para conseguir moléculas mejores. La presentación en fagos también es una estrategia adecuada para encontrar nuevos inhibidores de la interacción entre BoNT/B y syt I o II.

5

Métodos para detectar BoNT/B o *Clostridium botulinum*

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar BoNT/B o *Clostridium botulinum*. El 10 método implica exponer una muestra que se sospecha que contiene BoNT/B a un agente que contiene un polipéptido que tiene un dominio de unión a BoNT/B de syt II, y detectar la unión del polipéptido a BoNT/B. La inclusión de gangliósidos y el dominio de unión a gangliósidos de syt II en el polipéptido es opcional. El dominio de unión a BoNT/B o el dominio de unión a gangliósidos de syt I o II usado en la presente memoria son los de rata, ratón o humano. En el método también puede usarse un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad 15 de al menos 70%, 80%, 90% o 95% con el dominio de unión a BoNT/B o el dominio de unión a gangliósidos de syt I o II.

Kits

20

Cualquier producto descrito en la presente memoria puede combinarse con uno o más reactivos o tampones distintos, o similares, en forma de un kit útil, por ejemplo, para fines de diagnóstico, preventivos o terapéuticos, de acuerdo con el conocimiento de un especialista en la técnica.

25 La invención se entenderá mejor después de considerar los siguientes ejemplos no limitantes.

Materiales y Métodos

30 *Líneas celulares, gangliósidos y toxinas* - Y. Shoji-Kasai y M. Takahashi (Tokyo, Japan) (Shoji-Kasai *et al.*, 1992) proporcionaron amablemente una línea celular PC12 con déficit de syt I (Syt I⁻). Una mezcla de gangliósidos de cerebro bovino (18% de GM₁, 55% de GD_{1a}, 10% de GT_{1b} y 2% de otros gangliósidos), denominada en lo sucesivo gangliósidos, se obtuvo en Calbiochem. Las BoNT/A, B y E se purificaron como se describe (Dasgupta *et al.*, 1970; Evans *et al.*, 1986; Schmidt y Siegel, 1986).

35

Anticuerpos - Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra syb II (69.1), syt I (α -syt I_N; 604-4, α -syt I_C; 41.1), α/β -SNAP (77-1) y SNAP-25 (71.2) se proporcionaron por R. Jahn y S. Engers (Gottingen, Germany). Los anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra syt II se proporcionaron amablemente por M. Fukuda (Ibaraki, Japan) (Fukuda y Mikoshiba, 2000). Los anticuerpos anti-BoNT/A, B y E se generaron inmunizando conejos con neurotoxina purificada tratada con formalina; los anticuerpos se purificaron por afinidad usando neurotoxina inmovilizada.

40

45 *ADNc y proteínas recombinantes* - Los ADNc que codificaban syt I de rata (Perin *et al.*, 1990), syt II y IX de ratón (Fukuda y Mikoshiba, 2000) y syt IV de rata (Vician *et al.*, 1995) se proporcionaron por T.C. Sudhof (Dallas, TX), M. Fukuda (Ibaraki, Japan) y H. Herschman (Los Angeles, CA) respectivamente. El syb II de longitud completa se generó como una proteína de fusión con GST como se describe (Lewis *et al.*, 2001) usando un ADNc proporcionado por R. Scheller (Stanford, CA).

50 Para explorar la actividad de unión a la toxina, se generaron versiones truncadas de syt I, II, IV y IX que carecían del dominio C2B pero contenían todos los demás dominios. También se generaron varias construcciones adicionales (truncamientos y quimeras, como se indica en las figuras) por PCR, se subclonaron en pGEX-2T y se expresaron y 55 purificaron como se describe (Chapman *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 2001). Syt II 1-267 y 61-267 también se subclonaron en pTrcHis y se purificaron como proteínas de fusión a His6 marcadas en el extremo N-terminal como se describe (Chapman *et al.*, 1996).

55

Ensayos de precipitación - Se inmovilizaron proteínas recombinantes como proteínas de fusión con GST unidas a perlas de glutatión-Sepharose. A menos que se indique otra cosa, se mezclaron 10 μ g de proteína inmovilizada con las concentraciones indicadas de BoNT/B, A o E con (+; 25 μ g/ml) o sin (-) gangliósidos en 100 μ l de solución salina tamponada con Tris (TBS; Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) más Triton X-100 al 0,5% durante 1 hora a 4°C. Las perlas se lavaron tres veces, las proteínas unidas se solubilizaron por ebullición en SDS-tampón de muestra, se sometieron a SDS-PAGE y se visualizaron por tinción con Azul de Coomassie o por análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos anti-toxina. En todas las transferencias se muestra la inmunorreactividad para la cadena pesada de la toxina.

60

Se sintetizaron un péptido correspondiente a los restos 40-60 de syt II de ratón, P21, y una versión de este péptido con la secuencia cambiada, P21S (IKMNDAEFFGKSNFQEKK, SEC ID N°: 5) (Biotech Center, UW-Madison) con una cys C-terminal añadida que se usó para conjugarlos con perlas de agarosa (a 1 mg/ml) usando un Kit Sulfolink (Pierce). En los ensayos de precipitación se usaron cincuenta μ l del gel de agarosa conjugado.

Líneas de células PC12 y análisis de inmunotransferencia - se cultivaron células PC12 como se describe (Klenchin *et al.*, 1998). Para generar células que expresaran syt II (syt II⁺), se subclonó syt II de ratón de longitud completa en pCDNA3.1 (-) (ClonTech) y se utilizó para transfectar células PC12 por electroporación. Las células transfectadas se seleccionaron con G418 (1 mg/ml) y se establecieron varias líneas de células monoclonales independientes. Las 5 células se recogieron en PBS más Triton X-100 al 0,5%, SDS al 0,05% y PMSF 5 mM y se incubaron durante 30 min a 4°C en un agitador. Las muestras se centrifugaron a 21.000 x g durante 10 min, y la concentración de proteína en el sobrenadante se determinó usando BCA (Pierce). Las muestras se sometieron a SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia; y las manchas de transferencia se revelaron usando quimioluminiscencia aumentada (ECL) (Pierce).

10

Entrada de BoNT en células PC12 - En los experimentos sin carga previa, las células se dejaron crecer hasta una confluencia de 70% y se incubaron con BoNT durante 48 horas. Para el experimento en el que las células se precargaron con gangliósidos, las células se dejaron crecer hasta una confluencia de 80% seguido de incubación en medio sin suero más 250 µg/ml de gangliósidos. Veinticuatro horas después, el medio sin suero/gangliósidos se reemplazó por medio 15 completo y las células se incubaron con toxina durante 48 h. Las células se recogieron y la entrada de CNT se ensayó por un análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos dirigidos contra syb II o SNAP-25.

15

Para los experimentos de bloqueo, se generaron syt II 1-267 y syt II 61-267 como proteínas de fusión con his6; se generó syt II 1-87 como una proteína de fusión con GST que se eluyó de las perlas usando glutatión 10 mM más 20 Triton X-100 al 0,5%. Los fragmentos proteicos o péptidos se premezclaron con BoNT/B en 200 µl de TBS durante 1 h a 4°C antes de añadirlos a 2 ml de medio de cultivo celular (por pocillo en una placa de 6 pocillos). En algunos casos, también se añadieron gangliósidos en el tampón de unión (Fig. 5B, panel inferior). La concentración final de BoNT/B fue 30 nM, la concentración final de gangliósidos fue 25 µg/ml y la [fragmento de syt] final se indica en la descripción de los dibujos.

25

Unión de BoNT/B a células PC12 - Las células tratadas con toxina, con o sin preincubación con fragmentos de syt, se lavaron tres veces con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% (15 min a temperatura ambiente), se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% (10 min a temperatura ambiente) y se tiñeron con un anticuerpo primario de conejo anti-BoNT/B y un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con FITC (Jackson Laboratories). En 30 los ensayos competitivos del fragmento de syt II descritos en la Fig. 5, los fragmentos 1-267 y 61-267 de syt II forman agregados unidos a las células (Bai *et al.*, 2000) - éstos se visualizaron usando un anticuerpo primario de ratón anti-his6 (Qiagen) y un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con Rodamina (Jackson Laboratories). Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron como se ha descrito para los experimentos de terminales nerviosas motoras. Se debe indicar que para estos experimentos se retiró el detergente libre de los fragmentos de syt recombinante lavando 35 las proteínas inmovilizadas con tampones sin detergente antes de la elución. Sin embargo, en el caso de syt II 1-87, fueron necesarios bajos niveles de Triton X-100 para eluir la proteína de las perlas; debido a esto, se realizaron experimentos usando este fragmento dentro de un periodo de 6 h para evitar los efectos del detergente en las células.

Experimentos de captación de anticuerpo y toxina - Las células se trataron con solución de control (HEPES 15 40 mM, NaCl 145 mM, KCl 5,6 mM, CaCl₂ 2,2 mM, MgCl₂ 0,5 mM, glucosa 5,6 mM, ácido ascórbico 0,5 mM, BSA al 0,1% [pH 7,4]) o solución de alta [K⁺] (igual que la solución de control pero ajustada a NaCl 95 mM y KCl 56 mM), durante 10 min a 37°C, en presencia de BoNT/B más 10 µl de anticuerpo monoclonal contra el dominio luminal (α -syt I_N; clon 604.4) o el dominio citoplásmico de syt I (α -syt I_C; clon 41.1). Las células se lavaron con medio de cultivo, se 45 incubaron durante 30 min a 37°C, se fijaron y se permeabilizaron. Para marcar BoNT/B se usó un anticuerpo primario de conejo anti-BoNT/B; la tinción se visualizó usando un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con FITC. Se usaron anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón conjugados con Rodamina para visualizar los anticuerpos contra syt I internalizados. Se recogieron imágenes confocales con un microscopio confocal Bio-Rad MRC 1000 (Keck Center for Biological Imaging, UW-Madison) usando un objetivo de inmersión en aceite de 100 aumentos.

50

Co-inmunoprecipitación - Se purificó syt I 1-265 GST recombinante como se ha descrito anteriormente y se es-55 cindió del marcador GST usando trombina. Se incubaron cinco µl de anticuerpo monoclonal α -syt I_N (604.4) con BoNT/B (300 nM), con o sin Syt I 1-265 1,5 µM en 100 µl de TBS más Triton X-100 al 0,5% y gangliósidos (25 µg/ml) durante 1 h a 4°C. Se añadieron treinta µl de perlas Fast Flow con Proteína G (Pharmacia), las muestras se mezclaron durante 1 h, las perlas se lavaron tres veces en tampón de unión y el material unido se analizó por SDS-PAGE e inmunotransferencia usando un anticuerpo políclonal anti-BoNT/B y α -syt I_N (604.4).

55

Experimentos en hemidiafragma de rata - Se pusieron hemidiafragmas de rata en solución de Ringer enfriada con hielo (en mM: NaCl 138,8, KCl 4, NaHCO₃ 12, KH₂PO₄ 1, MgCl₂ 2, CaCl₂ 2, glucosa 1 l) gasificada con 95% de CO₂/5% de O₂. La estimulación se realizó con una solución similar en la que la concentración de KCl se aumentó a 60 45 mM, y la concentración de NaCl se redujo de forma apropiada. Los hemidiafragmas se incubaron con solución de Ringer de alto contenido de potasio que contenía BoNT/B 5 nM durante 10 min a temperatura ambiente. En algunos experimentos, la BoNT/B se premezcló con el fragmento 1-267 de syt II o el fragmento 61-267, ambos mezclados con 25 µg/ml de gangliósidos. Al final del periodo de estimulación/incubación, las preparaciones se fijaron (paraformaldehído al 4%), se permeabilizaron (Triton X-100 al 0,3%) y se bloquearon en suero de cabra antes de inmunomarcar con 65 un anticuerpo de conejo anti-BoNT/B y un anticuerpo monoclonal anti-Syb II. La inmunofluorescencia se visualizó usando un anticuerpo anti-conejo conjugado con FITC y un anticuerpo anti-ratón conjugado con TRITC. Una región de músculo adyacente al sitio de la entrada del nervio (en la que se van a encontrar un gran número de terminales nerviosas superficiales) se puso en una cámara de visualización con un fondo de vidrio que comprendía un solo cu-

breobjetos. Se obtuvieron imágenes de inmunofluorescencia usando un microscopio Nikon TE300, con una cámara CCD enfriada microMAX controlada por el software MetaMorph. Las intensidades de fluorescencia se cuantificaron usando el software ImageJ.

5 *Neutralización de la actividad de BoNT/B in vivo* - Para cada lote de BoNT/B, se determinó el valor de DL₅₀ para ratones (20-22 g; Institute of Cancer Research strain) usando métodos convencionales (Schantz y Kautter, 1978). El valor de DL₅₀ corresponde a la cantidad de toxina, introducida por inyección intraperitoneal, que produce la muerte de 50% después de 4 días. Las preparaciones de BoNT/B de los presentes solicitantes tuvieron actividades de aproximadamente 10⁸ DL₅₀/mg. Para los estudios de neutralización de la toxina, se usó el ensayo más rápido de tiempo
10 transcurrido hasta la muerte utilizando la vía intravenosa (Boroff y Fleck, 1966). Primero se generó una curva patrón en la que se representa la relación entre el tiempo transcurrido hasta la muerte de los ratones que recibieron inyecciones intravenosas de 100 µl de BoNT/B (expresado en min) frente a la toxicidad específica de BoNT/B que se determinó usando el método convencional descrito anteriormente (log [DL₅₀/ml]). Dentro del intervalo lineal, 10⁴-10⁶ DL₅₀/ml, este gráfico se usó para convertir el tiempo transcurrido hasta la muerte determinado experimentalmente, desde la
15 inyección intravenosa de dosis relativamente grandes de toxina, en valores de DL₅₀/ml. Para los experimentos de neutralización de la toxina, se premezcló BoNT/B con gangliósidos solos (250 µg/ml) o gangliósidos más los fragmentos de syt II indicados durante 10 min a temperatura ambiente y después la mezcla se inyectó por vía intravenosa en ratones. En todos los experimentos, el volumen total de inyección siempre fue de 100 µl. La neutralización de la toxina se indica por una extensión en el tiempo transcurrido hasta la muerte de ratones inyectados con toxina sola frente a la
20 inyección con toxina que se había premezclado con fragmentos de syt/gangliósidos. El aumento en el tiempo transcurrido hasta la muerte se convirtió en una reducción en la [DL₅₀/ml] aparente usando la curva patrón, y el porcentaje de neutralización se calculó usando la expresión: 1-[DL₅₀/ml(+ fragmento de syt II)/DL₅₀/ml (- fragmento de syt II)] x 100, donde (+ fragmento de syt II) se refiere a muestras que contienen toxina, gangliósidos y proteínas recombinantes y (- fragmentos de syt II) se refiere a muestras que estaban compuestas de toxina y gangliósidos únicamente.
25

Resultados

30 *Una región dentro del dominio luminal de syt I y II media interacciones directas con BoNT/B* - Para ensayar las interacciones directas de syt·BoNT, se inmovilizaron fragmentos de syt I y II como proteínas de fusión con GST y se usaron como matriz de afinidad para precipitar BoNT/A, B o E en presencia y ausencia de gangliósidos. Para estos experimentos, se incluyeron otras dos isoformas de syt, syt IV y IX, así como syb II de longitud completa, como controles negativos. La estructura de los fragmentos de syt se muestra en la Fig. 1A (panel superior). Como cada fragmento contiene un dominio transmembrana, los ensayos de unión incluían Triton X-100 al 0,5%; de esta manera, los gangliósidos se presentaron como micelas mixtas. En contraste con un estudio previo (Li y Singh, 1998), no se observó unión detectable de BoNT/A o E a ninguna de las proteínas inmovilizadas (Fig. 1A, panel central), incluso cuando se emplearon concentraciones relativamente elevadas de BoNT/A y E (300 nM; datos no mostrados), lo que indica que estas toxinas no se unen a los fragmentos de syt usados en los ensayos de los presentes solicitantes.

40 En condiciones idénticas, se observó que BoNT/B se une a syt I y II. Aunque las interacciones de syt I·BoNT/B eran estrictamente dependientes de los gangliósidos, syt II se unía a BoNT/B en ausencia de gangliósidos (Fig. 1A, panel central). La reducción de la concentración de la proteína de fusión GST-syt II inmovilizada en perlas reveló que los gangliósidos pueden aumentar las interacciones de syt II·BoNT/B (Fig. 1A, panel inferior), pero esta interacción es claramente menos dependiente de los gangliósidos. Estos descubrimientos son coherentes con los datos previos que demuestran que syt II se une a BoNT/B de forma más fuerte que syt I (Nishiki *et al.*, 1996a); supuestamente, la mayor afinidad de la interacción de syt II·BoNT/B se basa menos en los gangliósidos. Las interacciones de syt I/II·BoNT/B son específicas, ya que no se detectó la unión a una región análoga de syt IV o IX, o a syb II de longitud completa (Fig. 1A, panel central).

50 Si syt I y II son receptores fisiológicamente relevantes para BoNT/B, la unión debe estar mediada por la región de syt que queda expuesta en el exterior de las células - es decir, el dominio luminal - durante los ciclos de exocitosis y endocitosis. Para esclarecer cómo se une BoNT/B a syt II, primero se usaron quimeras de syt II/IX. El intercambio de los dominios luminales de estas proteínas fue suficiente para transferir la actividad de unión de BoNT/B desde syt II a syt IX (Fig. 1B), lo que indica que la unión de BoNT/B está mediada por el dominio luminal de syt II. De forma coherente con este descubrimiento, un fragmento más corto de syt II, compuesto únicamente del dominio luminal y transmembrana (restos 1-87), mediaba la unión estequiométrica de la toxina (Fig. 1C).

Se usó un análisis de truncamiento para localizar adicionalmente el sitio de unión a la toxina de las syt I y II. Dentro del dominio luminal de syt II, los restos 40-60, que están adyacentes al dominio transmembrana, son críticos para la unión a la toxina (Fig. 2A). Se ha indicado que el fragmento 61-267 de syt II puede unirse a gangliósidos a través de su dominio transmembrana (restos 61-87) (Kozaki *et al.*, 1998), aunque este fragmento no puede usarse a BoNT/B en presencia de gangliósidos (Fig. 2A, panel central). Estos datos sugieren que los gangliósidos no median directamente la unión a la toxina en las condiciones de ensayo de los presentes solicitantes, sino que más bien cooperan con el dominio luminal para formar sitios de unión a BoNT/B de alta afinidad. La región proximal a la membrana análoga de syt I (restos 32-52) también era crítica para la unión de BoNT/B (Fig. 8). Este segmento está muy conservado entre syt I y II (Fig. 2B); las diferencias de secuencias minoritarias pueden explicar las diferencias de afinidad para BoNT/B (Nishiki *et al.*, 1996a). Se ha indicado que el dominio luminal aislado de syt II (restos 1-61) pero no de syt I (restos 1-53), se une a BoNT/B (Fig. 2A y Fig. 8). Este resultado probablemente se debe a los rigurosos requisitos de

gangliósidos para las interacciones de syt I·BoNT/B; la delección del dominio transmembrana de syt I anula la unión de gangliósidos (Kozaki *et al.*, 1998) y por lo tanto reduce la actividad de unión a BoNT/B.

Los estudios de localización descritos anteriormente sugieren que los restos 40-60 de syt II comprenden el dominio de unión a BoNT/B. Para ensayar esto directamente, se inmovilizó un péptido sintético (P21) que corresponde a este segmento de syt II en perlas y se usó como matriz de afinidad. Este péptido se une directamente a BoNT/B, aunque con menos avidez que fragmentos más grandes de syt II ya que la unión detectable requería mayores concentraciones de la toxina (Fig. 2C, panel superior). Una versión de secuencia cambiada de este péptido, P21S, sirvió como control negativo. Además P21, pero no P21S, pudo inhibir competitivamente las interacciones de syt II·BoNT/B (Fig. 2C, panel inferior). P21 también inhibió las interacciones de syt I·BoNT/B (datos no mostrados). Conjuntamente, estos estudios establecen que los restos 40-60 de syt II median en gran medida la unión de BoNT/B.

Syt I media la unión dependiente de gangliósidos y la entrada de BoNT/B en células PC12 - Los experimentos descritos anteriormente demuestran que syt I y II se unen a BoNT/B por medio de una región conservada en sus ectodominios. Sin embargo, la cuestión clave es si syt I o II median la entrada de la toxina; particularmente, ¿son receptores proteicos funcionales para BoNT/B? Para responder esta cuestión primero se usaron células PC12, una línea celular neuroendocrina que sirve como sistema modelo para estudiar la exocitosis inducida por Ca^{2+} . Estas células expresan los sustratos para todas las CNT pero son resistentes a la entrada de BoNT/B, probablemente debido a la falta de receptores funcionales de la toxina (Lommeth *et al.*, 1991). Las células PC12 expresan syt I y IX y niveles muy bajos de syt IV; no se expresan otras isoformas de syt a niveles significativos (Zhang *et al.*, 2002). Como syt IX y IV no se unen a BoNT/B y syt I se une sólo en presencia de gangliósidos (Fig. 1A, panel central), la resistencia a la toxina podría deberse al hecho de que estas células contienen bajos niveles de gangliósidos en comparación con las neuronas (Walton *et al.*, 1988). Se ensayó esta idea precargando gangliósidos exógenos en la membrana plasmática de células PC12 de tipo silvestre. Como se muestra en la Fig. 3A, se observó una unión detectable a la toxina únicamente cuando las células se cargaron con gangliósidos. Después se determinó si la toxina puede entrar en las células tratadas con gangliósidos. Para controlar la entrada, se ensayó la escisión del sustrato citoplásmico de BoNT/B, syb II (Schiavo *et al.*, 1992) por análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos anti-syb II. La escisión de syb II por BoNT/B se produjo sólo cuando las células primero se precargaron con gangliósidos (Fig. 3B). Estos datos son coherentes con un modelo en el que syt I y los gangliósidos cooperan para mediar la unión y la entrada de BoNT/B, y están de acuerdo con datos bioquímicos que demuestran que la toxina se une a syt I sólo en presencia de gangliósidos. Para ensayar adicionalmente este modelo, los presentes solicitantes aprovecharon una línea celular PC12 que carece de syt I (Syt I⁻) (Shoji-Kasai *et al.*, 1992). Esta línea celular es capaz de realizar una exocitosis inducida por Ca^{2+} , supuestamente a través de la acción redundante de syt IX (Fukuda *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002). Como se muestra en la Fig. 3C, BoNT/B no pudo escindir syb II en células PC12 syt I⁻ cargadas con gangliósido. Estos datos indican que para la entrada de la toxina son necesarios tanto syt I como gangliósidos.

También se ensayó la entrada de BoNT/A y E en células PC12. La entrada se controló ensayando la escisión de su sustrato SNAP-25 (Blasi *et al.*, 1993a; Schiavo *et al.*, 1993). BoNT/A escinde SNAP-25 entre los restos 197-198, eliminando de esta manera 9 aminoácidos; BoNT/E escinde entre los restos 180-181 y retira 26 restos (Schiavo *et al.*, 1993). La incubación de las células con concentraciones nM de BoNT/A y E produjo grados similares de escisión de SANP-25 en células de tipo silvestre (datos no mostrados) y syt I⁻ (Fig. 3D). De esta manera, las dos toxinas pueden entrar en las células PC12 syt I⁻ que no se han precargado con gangliósidos. Estos experimentos demuestran que no se necesitan syt I/II para la entrada de BoNT/A y E en células PC12, y que las células syt I⁻ son competentes para captar al menos algunas CNT.

Syt II es suficiente para mediar la entrada de BoNT/B en células PC12 - Para determinar directamente si syt II puede funcionar como receptor para BoNT/B, los presentes solicitantes aprovecharon la observación de que esta isoforma de syt puede unirse a BoNT/B en alguna medida en ausencia de gangliósidos (Fig. 1A). Se generaron líneas de células PC12 que expresaban de forma estable syt II (Syt II⁺, Fig. 4A) y se observó que se unían a BoNT/B sin precargar las células con gangliósidos exógenos (Fig. 4B). Un descubrimiento clave fue que la expresión de syt II era suficiente para reconstituir la entrada de la toxina en las células transfectadas, como se demuestra por la escisión de syt II (Fig. 4C). La eficacia de la escisión era proporcional al nivel de expresión de syt II y no se observó escisión en células que carecían de syt II (Fig. 4C, panel derecho). Estos descubrimientos demuestran que syt II puede funcionar como receptor de BoNT/B sin precargar las células con gangliósidos exógenos.

Para ensayar adicionalmente si la unión y la entrada están mediadas por interacciones directas entre BoNT/B y el dominio luminal de syt II, se determinó si fragmentos de syt II que contenían el sitio de unión a BoNT/B inhibían la acción de la toxina. Como se muestra en la Fig. 5A, los fragmentos correspondientes a los restos 1-267, 1-87 y 40-60 (P21) de syt II bloqueaban la unión de BoNT/B a células PC12 syt II⁺. El fragmento 61-267 de syt II, que carece del dominio luminal, y el péptido de secuencia cambiada P21S no podían bloquear la unión de la toxina. Los presentes solicitantes observaron que syt II 1-267 y 61-267 contienen un dominio de oligomerización dentro de los restos 61-140 y también se unen a las membranas a través de su dominio C2A, formando de esta manera agregados (Bai *et al.*, 2000). Estos agregados se visualizan en la Fig. 5A (paneles inferiores) usando un anticuerpo anti-his6 que reconoce un marcador his6 presente en estos fragmentos de syt recombinantes. El fragmento 1-267 de syt II también contiene BoNT/B unida, como se muestra por la inmunorreactividad anti-BoNT/B en los agregados de syt II (Fig. 5A, panel superior). Por el contrario, los agregados de 61-267 de syt II asociados a las células no contenían BoNT/B (Fig. 5A, panel inferior).

Lo que es más importante, la titulación de syt II 1-267 produjo una protección dependiente de la dosis de la escisión de syb II; el fragmento 61-267 no tenía efecto protector (Fig. 5B, panel superior). La inclusión de gangliósidos aumentó la eficacia de la protección aproximadamente 3 veces (Fig. 5B, panel inferior), supuestamente facilitando la unión ya sólida de syt II 1-267 a BoNT/B (Fig. 1A, panel inferior). Este resultado es coherente con la observación 5 de que el compañero de unión con la máxima afinidad por BoNT/B está compuesto de gangliósidos más syt II (Fig. 1A, panel inferior; Nishiki *et al.*, 1996a)). Como control, mezclas de gangliósidos y fragmento 61-267 de syt II no pudieron impedir la escisión de syb II (Fig. 5B, panel inferior). P21 también produjo una protección dependiente de la dosis, aunque a concentraciones >10 veces mayores en comparación con el fragmento 1-267 (Fig. 5C), supuestamente porque se une menos fuertemente a BoNT/B que los fragmentos más largos de syt II. Existe la preocupación de que 10 bajos niveles de detergente asociado con los dominios transmembrana presente en algunos de los fragmentos de syt puedan afectar a la captación y acción de la toxina. Sin embargo, no se observó ninguna toxicidad aparente usando estos fragmentos. Además, la capacidad del fragmento 1-267 de bloquear la acción de la toxina no puede deberse a la toxicidad del detergente asociado, ya que el fragmento 61-267 tiene el mismo dominio transmembrana aunque no 15 puede proporcionar ninguna protección.

Actividad dependiente de la entrada de BoNT/B en vesículas que contienen syt I - Los datos anteriores sugieren 15 un modelo en el que BoNT/B puede entrar en células PC12 por la unión al dominio luminal de syt I o II. Este modelo predice que BoNT/B ejercerá la internalización de syt I/II desde la superficie celular en los mismos orgánulos y que la internalización debe ser dependiente de la actividad. La exocitosis/endocitosis de vesículas puede rastrearse usando 20 anticuerpos dirigidos contra el dominio luminal N-terminal de syt I (Juzans *et al.*, 1996; Mateeoli *et al.*, 1992). En primer lugar, se demostró que un anticuerpo anti-dominio luminal de syt I (α -syt I_N) y BoNT/B pueden unirse a syt I simultáneamente (Fig. 1A). Éste es el resultado esperado, ya que el anticuerpo reconoce los doce primeros aminoácidos 25 en el extremo N de syt I, mientras que el sitio de unión a BoNT/B está en el extremo C-terminal del dominio luminal.

Los presentes solicitantes aprovecharon este descubrimiento y determinaron si el anticuerpo y la toxina se captan 30 en el mismo compartimiento en respuesta a la estimulación. Se precargaron células PC12 con gangliósidos y se despolarizaron con una alta [K⁺] para inducir la exocitosis de vesículas secretoras en presencia de anticuerpos α -syt I_N y BoNT/B. Se dejó que la exocitosis y la endocitosis continuaran durante 10 minutos, seguido de lavados extensivos para retirar el anticuerpo unido a la superficie y la toxina. Se observó que tanto los anticuerpos α -syt I_N como BoNT/B 35 se internalizaban en el mismo compartimiento. La despolarización de las células aumentaba significativamente la internalización del anticuerpo y de BoNT/B; en el control sólo se observaron bajos niveles de internalización, debido a la exocitosis espontánea y reciclado.

A diferencia del anticuerpo α -syt I_N, no se captó un anticuerpo dirigido contra el dominio citoplásмico de syt I (α -syt I_C) (Fig. 9B), lo que demuestra que la tinción con el anticuerpo del dominio luminal no se debe a una pérdida de 40 integridad de las membranas celulares. Además, los anticuerpos α -syt I_N y BoNT/B no se captaron en células PC12 syt I⁻ (Fig. 9B), lo que establece además que la captación requiere la exposición del dominio luminal de syt I y no se debe a una endocitosis masiva. Estos descubrimientos demuestran que el dominio luminal de syt I se expone en la superficie 45 de células PC12 durante la exocitosis, y que BoNT/B entra en las células PC12 a través de orgánulos que contienen syt I. Esta última observación se confirmó adicionalmente por la co-localización de BoNT/B con un anticuerpo dirigido contra el dominio citoplásмico (α -syt I_C) de syt I.

Se obtuvieron resultados similares usando células PC12 syt II⁺ - BoNT/B entró en vesículas que contenían syt I de 50 una manera dependiente de la actividad (datos no mostrados). Los presentes solicitantes no han podido localizar syt II en las líneas celulares syt II⁺ usando anticuerpos disponibles actualmente. Sin embargo, syt II se localiza junto con syt I en vesículas secretoras en cerebro y probablemente se dirigirá a orgánulos que contienen syt I en las células PC12 (Osborne *et al.*, 1999):

Actividad dependiente de la captación de BoNT/B en terminales nerviosas motoras - La causa de muerte por 55 intoxicación con BoNT/B es la asfixia debido al bloqueo de la neurotransmisión en el diafragma. Por lo tanto, los presentes solicitantes ampliaron sus estudios para explorar el mecanismo de la entrada de la toxina en neuronas en este tejido. Se observaron únicamente bajos niveles de asociación de BoNT/B con terminales nerviosas motoras en el diafragma de rata en condiciones en reposo. Sin embargo, la estimulación con KCl produce un espectacular aumento en los niveles de BoNT/B (5,7 veces; Fig. 6A) y una pérdida concomitante de inmunorreactividad con syb II (3,2 veces, Fig. 6B). El aumento de unión de BoNT/B y la pérdida de syb II se anularon prácticamente por incubación con el fragmento 1-267 de syt II/gangliósidos, pero no por una mezcla de syt II 61-267/gangliósidos (Fig. 6A, B). Estos 60 datos demuestran que la captación de BoNT/B es dependiente de la actividad en su diana natural. Además, la unión y entrada de la toxina puede impedirse por fragmentos de syt II que contienen el sitio de unión a la toxina mientras que los fragmentos de syt que no tienen el sitio de unión a la toxina no tienen efecto.

La inhibición competitiva de interacciones de syt-BoNT/B neutraliza a BoNT/B in vivo - Los experimentos descritos anteriormente demuestran que BoNT/B entra en las células PC12 y en las terminales nerviosas motoras a través de interacciones con syt I/II más gangliósidos. Para establecer adicionalmente la relevancia fisiológica de los descubrimientos anteriores, se determinó si fragmentos de syt II que contienen el sitio de unión a BoNT/B pueden neutralizar 65 los efectos de la toxina *in vivo*. Para estos estudios, se usó un método rápido para evaluar la toxicidad en el que la inyección intravenosa de grandes cantidades (10^5 - 10^6 DL₅₀) de BoNT/B en ratones producía la muerte en una escala de tiempo de minutos a horas, en lugar de los ensayos de letalidad de cuatro días convencionales (en los que 1 DL₅₀ se define como la cantidad de toxina que produce 50% de muerte después de cuatro días) (Boroff y Fleck, 1966; Schantz

y Kautter, 1978). Este ensayo reduce el período de tiempo durante el cual los animales están expuestos a la toxina. Para este fin, en primer lugar se estableció una curva patrón para relacionar los valores de DL₅₀/ml determinados clásicamente con los valores de tiempo transcurrido hasta la muerte que se determinaron usando el ensayo rápido (Fig. 7A). Después, este gráfico se usó para convertir el tiempo transcurrido hasta la muerte medido experimentalmente en unidades de DL₅₀ aparente/ml. Después de esta conversión, los valores de DL₅₀ aparente/ml se usaron para calcular el % de neutralización de la toxina por mezclas de syt/gangliósido.

El intervalo de [syt II 1-267] que se ensayó en ratones no produjo una protección sustancial en ausencia de gangliósidos. Los fragmentos 1-267 y 1-87 de syt II, junto con gangliósidos, neutralizaban la mayor parte de la toxicidad de BoNT/B en ratones (Fig. 7B). Los presentes solicitantes creen que para que el propio syt II 1-267 proporcione protección *in vivo*, se necesitan dosis mayores.

Syt II 61-267 más gangliósidos no neutralizaba la toxina (Fig. 7B), estableciéndose además el papel esencial del dominio luminal de syt II para la entrada de la toxina *in vivo*. Se determinaron las potencias de syt II 1-267 y 1-87 (Fig. 7C); los dos fragmentos produjeron una protección dependiente de la dosis a concentraciones sub-μM. Finalmente, la inyección intravenosa previa con fragmentos 1-267 ó 1-87 de syt II, mezclados con gangliósidos, neutralizaba 70-80% de BoNT/B que se inyectó 1 minuto después (Fig. 7D), lo que indica que los animales pueden protegerse antes de la exposición a la toxina.

La presente invención no pretende limitarse a los ejemplos anteriores, sino que más bien comprende todas las variaciones y modificaciones incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Bibliografía

- Arnon, S.S., R. Schechter, T.V. Inglesby, D.A. Henderson, J.G. Bartlett, M.S. Ascher, E. Eitzen, A.D. Fine, J. Hauer, M. Layton, S. Lillibridge, M.T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T.M. Perl, P.K. Russell, D.L. Swerdlow, and K. Tonat.** 2001. *Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management.* *Jama.* 285:1059-70.
- Bai, J., C.A. Earles, J.L. Lewis, and E.R. Chapman.** 2000. Membrane-embedded synaptotagmin penetrates cis or trans target membranes and clusters via a novel mechanism. *J Biol Chem.* 275:25427-35.
- Blasi, J., E.R. Chapman, E. Link, T. Binz, S. Yamasaki, P. De Camilli, T.C. Sudhof, H. Niemann, and R. Jahn.** 1993a. *Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25.* *Nature.* 365:160-3.
- Blasi, J., E.R. Chapman, S. Yamasaki, T. Binz, H. Niemann, and R. Jahn.** 1993b. *Botulinum neurotoxin CI blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin.* *Embo J.* 12:4821-8.
- Boroff, D.A., and U. Fleck.** 1966. Statistical analysis of a rapid *in vivo* method for the titration of the toxin of *Clostridium botulinum*. *J Bacteriol.* 92:1580-1.
- Bullens, R.W., G.M. O'Hanlon, E. Wagner, P.C. Molenaar, K. Furukawa, J.J. Plomp, and H.J. Willison.** 2002. Complex gangliosides at the neuromuscular junction are membrane receptors for autoantibodies and *botulinum neurotoxin* but redundant for normal synaptic function. *J Neurosci.* 22:6876-84.
- Chapman, E.R.** 2002. Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:498-508.
- Chapman, E.R., S. An, J.M. Edwardson, and R. Jahn.** 1996. A novel function for the second C2 domain of synaptotagmin. Ca2+ -triggered dimerization. *J Biol Chem.* 271:5844-9.
- Dasgupta, B.R., L.J. Berry, and D.A. Boroff.** 1970. Purification of *Clostridium botulinum* type A toxin. *Biochim Biophys Acta.* 214:343-9.
- Dolly, J.O., J. Black, R.S. Williams, and J. Melling.** 1984. Acceptors for *botulinum neurotoxin* reside on motor nerve terminals and mediate its internalization. *Nature.* 307:457-60.
- Evans, D.M., R.S. Williams, C.C. Shone, P. Hambleton, J. Melling, and J.O. Dolly.** 1986. *Botulinum neurotoxin* type B. Its purification, radioiodination and interaction with rat-brain synaptosomal membranes. *Eur J Biochem.* 154:409-16.
- Fukuda, M., J.A. Kowalchyk, X. Zhang, T.F. Martin, and K. Mikoshiba.** 2001. Synaptotagmin IX regulates Ca2+-dependent secretion in PC12 cells. *J Biol Chem.*
- Fukuda, M., and K. Mikoshiba.** 2000. Distinct self-oligomerization activities of synaptotagmin, family. Unique calcium-dependent oligomerization properties of synaptotagmin VII *J Biol Chem.* 275:28180-5.

ES 2 333 319 T3

- 5 **Halpern, J.L., and E.A. Neale.** 1995. Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport. *Curr Top Microbiol Immunol.* 195:221-41.
- 10 **Hatheway, C.L.** 1995. Botulism: the present status of the disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 195:55-75.
- 15 **Herreros, J., T. Ng, and G. Schiavo.** 2001. Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell.* 12:2947-60.
- 20 **Jahn, R., and H. Niemann.** 1994. Molecular mechanisms of clostridial neurotoxins. *Ann N Y Acad Sci.* 733:245-55.
- 25 **Juzans, P., J. Molgo, L. Faille, and D. Angaut-Petit** 1996. Synaptotagmin II immunoreactivity in normal and botulinum type-A treated mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch.* 431:R283-4.
- 30 **Kerner, J.** 1817. Medizinische Polizen. Vergiftung durch verborbene Wurste. *Tübinger Blätter.* 3:1-25.
- 35 **Kitamura, M., K. Takamiya, S. Aizawa, and K. Furukawa.** 1999. Gangliosides are the binding substances in neural cells for tetanus and *botulinum toxins* in mice. *Biochim Biophys Acta.* 1441:1-3.
- 40 **Kozaki, S., Y. Kamata, S. Watarai, T. Nishiki, and S. Mochida.** 1998. Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Microb Pathog.* 25:91-9.
- 45 **Lewis, J.L., M. Dong, C.A. Earles, and E.R. Chapman.** 2001. The transmembrane domain of syntaxin 1A is critical for cytoplasmic domain protein-protein interactions. *J Biol Chem.* 276:15458-65.
- 50 **Li, L., and B.R. Singh.** 1998. Isolation of synaptotagmin as a receptor for types A and E *botulinum neurotoxin* and analysis of their comparative binding using a new microliter plate assay. *J Nat Toxins.* 7:215-26.
- 55 **Lommeth, R., T.F. Martin, and B.R. DasGupta.** 1991. *Botulinum neurotoxin* light chain inhibits norepinephrine secretion in PC12 cells at an intracellular membranous or cytoskeletal site. *J Neurochem.* 57:1413-21.
- 60 **Mahant, N., P.D. Clouston, and I.T. Lorentz.** 2000. The current use of *botulinum toxin*. *J Clin Neurosci.* 7:389-94.
- 65 **Matteoli, M., K. Takei, MS. Perin, T.C. Sudhof, and P. De Camilli.** 1992. Exo-endocytotic recycling of synaptic vesicles in developing processes of cultured hippocampal neurons. *J Cell Biol.* 117:849-61.
- 70 **Montecucco, C.** 1986. How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *TIBS*:314-317.
- 75 **Nishiki, T., Y. Kamata, Y. Nemoto, A. Omori, T. Ito, M. Takahashi, and S. Kozaki.** 1994. Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem.* 269:10498-503.
- 80 **Nishiki, T., Y. Tokuyama, Y. Kamata, Y. Nemoto, A. Yoshida, K. Sato, M. Sekiguchi, M. Takahashi, and S. Kozaki.** 1996a. The high-affinity binding of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. *FEBS Lett.* 378:253-7.
- 85 **Nishiki, T., Y. Tokuyama, Y. Kamata, Y. Nemoto, A. Yoshida, M. Sekiguchi, M. Takahashi, and S. Kozaki.** 1996b. Binding of botulinum type B neurotoxin to Chinese hamster ovary cells transfected with rat synaptotagmin H cDNA. *Neurosci Lett.* 208:105-8.
- 90 **Osborne, S.L., J. Herreros, P.I. Bastiaens, and G. Schiavo.** 1999. Calcium-dependent oligomerization of synaptotagmins I and II. Synaptotagmins I and II are localized on the same synaptic vesicle and heterodimerize in the presence of calcium. *J Biol Chem.* 274:59-66.
- 95 **Perin, M.S., VA. Fried, GA. Mignery, R. Jahn, and T.C. Sudhof.** 1990. Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature.* 345:260-3.
- 100 **Schantz, E., and D. Kautter.** 1978. Standardized assay for *Clostridium botulinum* toxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61:96-99.
- 105 **Schengrund, C.L., B.R. DasGupta, C.A. Hughes, and N.J. Ringler.** 1996. Ganglioside-induced adherence of botulinum and *tetanus neurotoxins* to adducin. *J Neurochem.* 66:2556-61.
- 110 **Schengrund, C.L., B.R. DasGupta, and N.J. Ringler.** 1993. Ganglioside GD3 enhances adherence of botulinum and *tetanus neurotoxins* to bovine brain synapsin I. *Neurosci Lett.* 158:159-62.
- 115 **Schengrund, C.L., N.J. Ringler, and B.R. Dasgupta.** 1992. Adherence of botulinum and *tetanus neurotoxins* to synaptosomal proteins. *Brain Res Bull.* 29:917-24.

- Schiavo, G., F. Benfenati, B. Poulain, O. Rossetto, P. Polverino de Laureto, B.R. DasGupta, and C. Montecucco. 1992. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*. 359:832-5.
- 5 Schiavo, G., M. Matteoli, and C. Montecucco. 2000. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev*. 80:717-66.
- Schiavo, G., S.L. Osborne, and J.G. Sgouros. 1998. Synaptotagmins: more isoforms than functions? *Biochem Biophys Res Commun*. 248:1-8.
- 10 Schiavo, G., A. Santucci, B.R. Dasgupta, P.P. Mehta, J. Jontes, F. Benfenati, M.C. Wilson, and C. Montecucco. 1993. Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. *FEBS Lett*. 335:99-103.
- 15 Schmidt, J. J., and L.S. Siegel. 1986. Purification of type E *botulinum neurotoxin* by high-performance ion exchange chromatography. *Anal Biochem*. 156:213-9.
- Shoji-Kasai, Y., A. Yoshida, K. Sato, T. Hoshino, A. Ogura, S. Kondo, Y. Fujimoto, R. Kuwahara, R. Kato, and M. Takahashi. 1992. Neurotransmitter release from synaptotagmin-deficient clonal variants of PC12 cells. *Science*. 256:1821-3.
- 20 Simpson, L.L. 1981. The origin, structure, and pharmacological activity of *botulinum toxin*. *Pharmacol Rev*. 33:155-88.
- Vician, L., I.K. Lim, G. Ferguson, G. Tocco, M. Baudry, and H.R. Herschman. 1995. Synaptotagmin IV is an immediate early gene induced by depolarization in PC12 cells and in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:2164-8.
- 25 Walton, K.M., K. Sandberg, T.B. Rogers, and R.L. Schnaar. 1988. Complex, ganglioside expression and tetanus toxin binding by PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*. 263:2055-63.
- Zhang, X., M.J. Kim-Miller, M. Fukuda, J.A. Kowalchyk, and T.F. Martin. 2002. Ca²⁺-dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for Ca²⁺-triggered exocytosis. *Neuron*. 34:599-611.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un agente que reduce la unión entre BoNT/B y su receptor en la superficie celular en la fabricación de
un medicamento para reducir la toxicidad de BoNT/B en un sujeto humano o un sujeto animal no humano, donde el
agente comprende (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre los aminoácidos
1-87 de la SEC ID Nº: 7, los aminoácidos 40-267 de la SEC ID Nº: 7, los aminoácidos 1-267 de la SEC ID Nº: 7, los
aminoácidos 1-422 de la SEC ID Nº: 7 y (ii) un gangliósido.
- 10 2. Uso de un agente que reduce la unión entre BoNT/B y su receptor en la superficie celular para uso en la reducción
de la toxicidad de BoNT/B en un sujeto humano o un sujeto animal no humano, donde el agente comprende (i) un
polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre los aminoácidos 1-87 de la SEC ID Nº:
7, los aminoácidos 40-267 de la SEC ID Nº: 7, los aminoácidos 1-267 de la SEC ID Nº: 7, los aminoácidos 1-422 de
la SEC ID Nº: 7 y (ii) un gangliósido.
- 15 3. Un método para detectar BoNT/B o *Clostridium botulinum* que comprende las etapas de:

exponer una muestra que se sospecha que contiene BoNT/B a un polipéptido que comprende los aminoácidos 40-
60 de la SEC ID Nº: 7 con la condición de que se excluya un polipéptido que comprende una sinaptotagmina I o II de
20 longitud completa; y

detectar la unión del polipéptido a BoNT/B.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

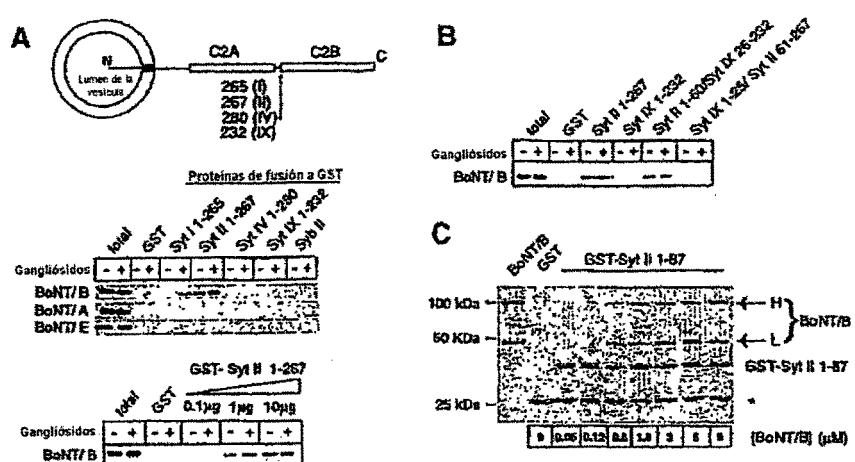


FIG. 1

ES 2 333 319 T3

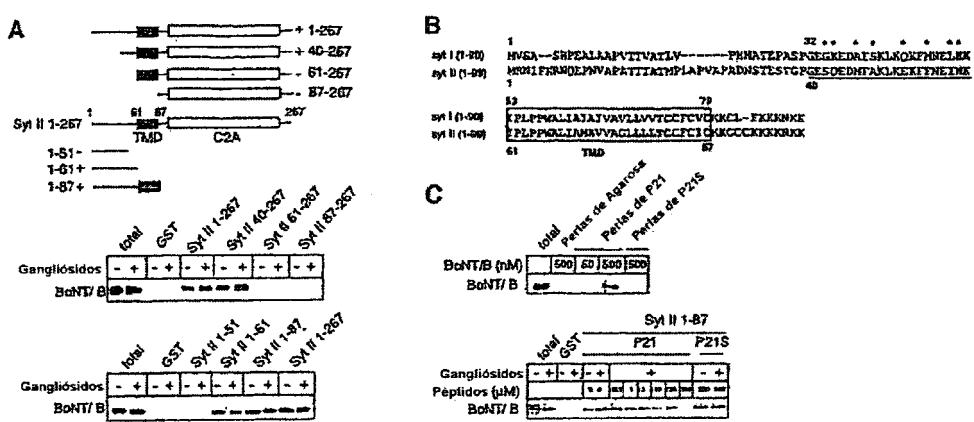


FIG. 2

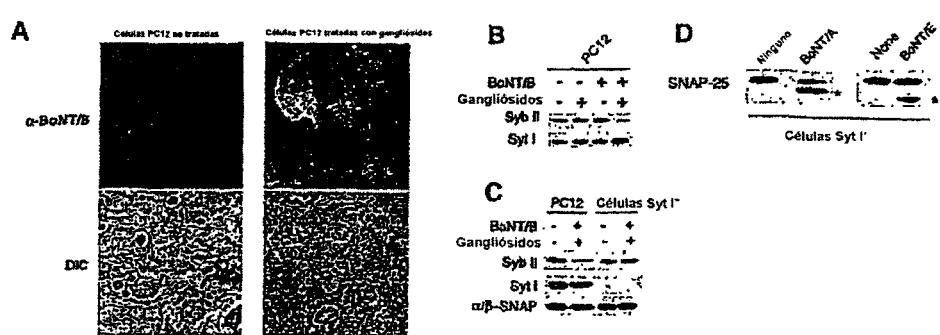


FIG. 3

ES 2 333 319 T3

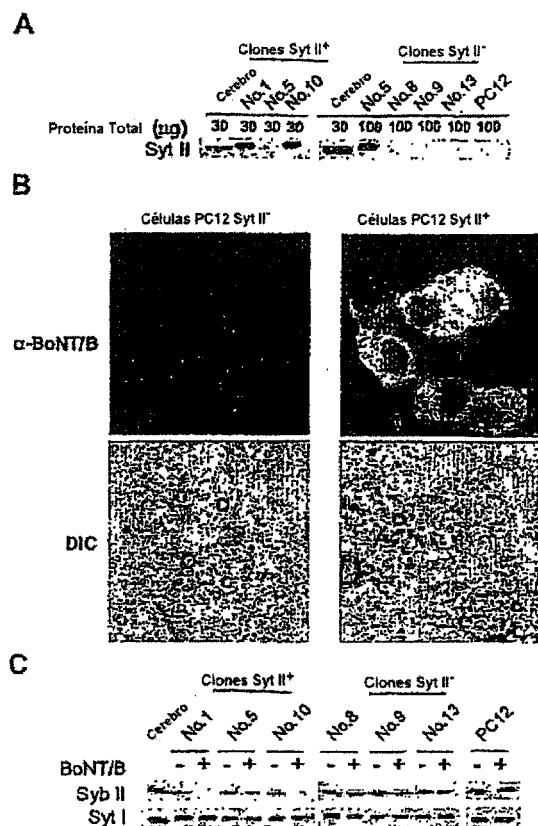


FIG. 4

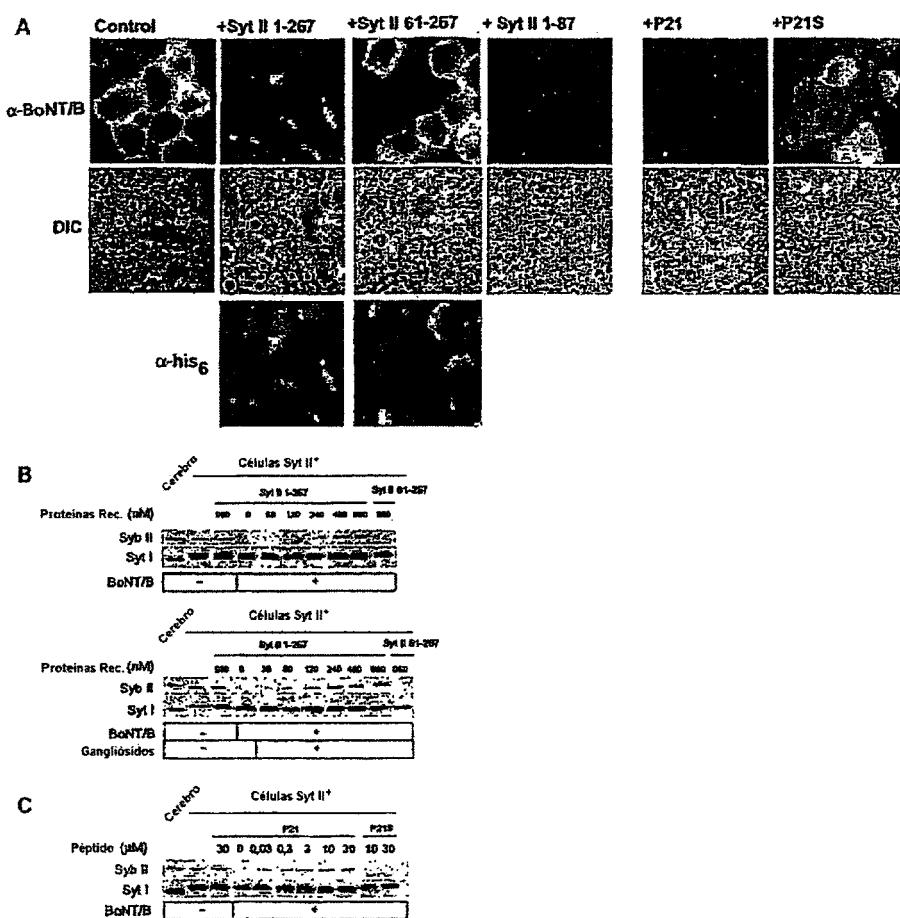


FIG. 5

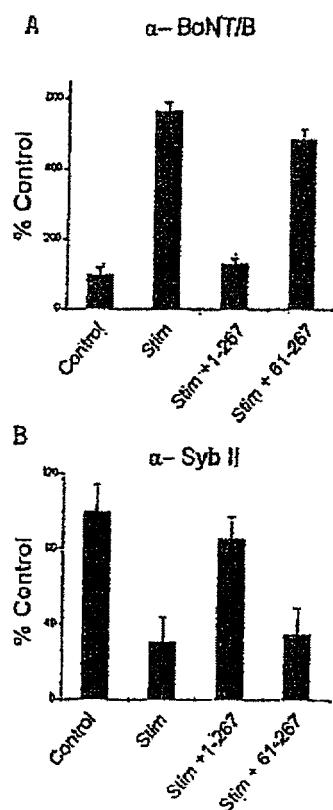


FIG. 6

ES 2 333 319 T3

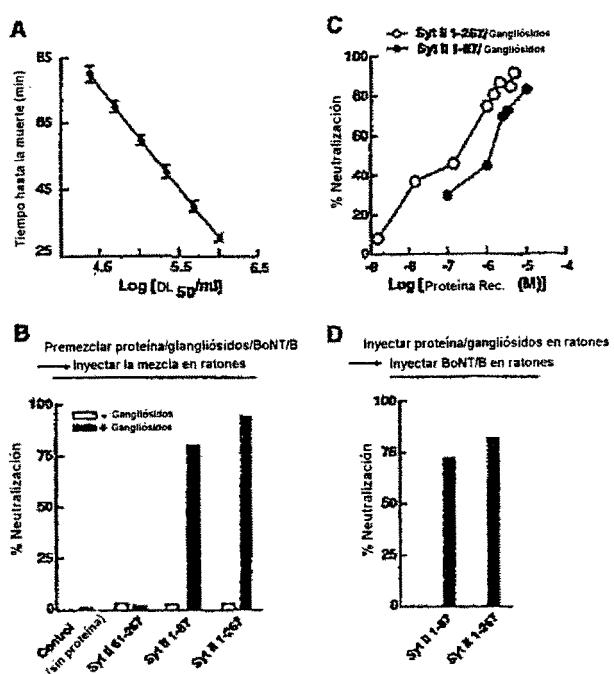


FIG. 7

ES 2 333 319 T3

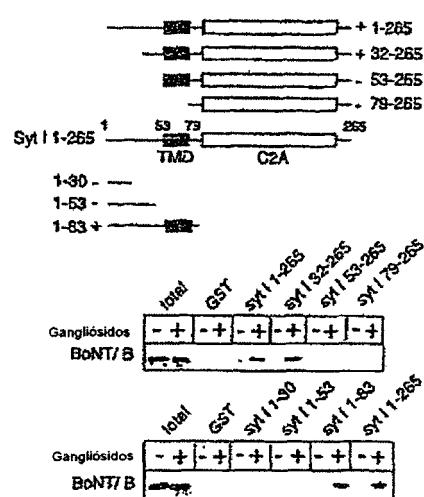


FIG. 8

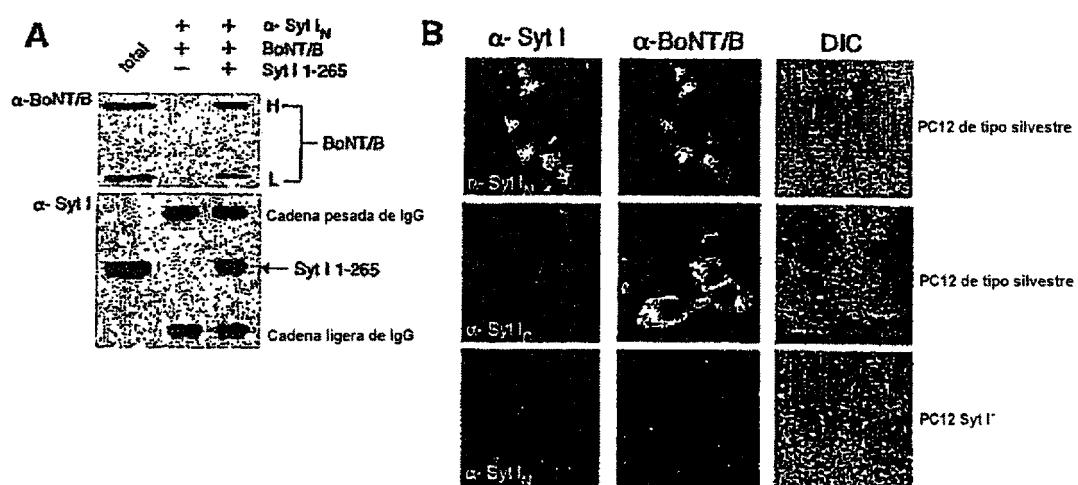


FIG. 9

ES 2 333 319 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Chapman, Edwin R.
Dong, Min
5

<120> RECEPTORES DE LA NEUROTOXINA BOTULÍNICA B Y SU USO

<130> 960296.99004
10

<150> 60/422.951
<151> 31-10-2002

15 <150> 60/498.128
<151> 27-08-2003

<160> 10
20

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
25 <211> 2381
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

30 <220>
<221> CDS
<222> (525)..(1790)

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (618)..(680)

40 <223> Dominio de unión a BoNT/B

<220>
<221> misc_feature
45 <222> (681)..(761)

<223> Dominio de unión a gangliósidos o dominio transmembrana

<400>1
50 accggggcaa gcccccaaggg tcctgctcac ccaacagggg gctcagggtcc ccgaagtgtg 60
tgcagggcg ggccggccag ctgggaccag ctggtgccc tagaaaaacct cacccacacc 120
cacacccaca caccctttt gtgttgcaagg ctgccccctct gagagcggag gcagcgagag 180
55 agtaactcggtt tgccctcgcac cggtccgcgg ttagagcagc ggggaccaag actcgcacca 240
tctcccggtc ggtcctcgct ccagttccc tctgaatcct acacttcata tgtagacacc 300
ttactcaact ggcattttgtt agtcaagtct cctctgcate caaggaaaag aagactttgg 360
60 cgcgctcgaa caaccaacat aagcagtctg atcagaagac attcaaattg ccgtcccgag 420
agctccagca gaacatctcg ttaagattga agaaaggaga ttccaaaagg acaaaaaacc 480
caaatactcc agactacccc cagcagacat ccgctgaacc aaaa atg gtg agt gcc
65 Met Val Ser Ala
1
agt cgt cct gag gcc ctg gct gcc cct gtc acc act gtt gcg acc ctt 584

ES 2 333 319 T3

	5	Ser Arg Pro Glu Ala Leu Ala Ala Pro Val Thr Thr Val Ala Thr Leu 5 10 15 20	
5	gat gtc cca cac aac gcc act gag cca gcc agt cct ggg gaa ggg aag gaa Val Pro His Asn Ala Thr Glu Pro Ala Ser Pro Gly Glu Gly Lys Glu 25 30 35		632
10	gat gcc ttt tcc aag ctg aag cag aag ttt atg aat gaa ctg cat aaa Asp Ala Phe Ser Lys Leu Lys Gln Lys Phe Met Asn Glu Leu His Lys 40 45 50		680
15	atc cca ttg cca ccg tgg gcc tta att gcc ata gcc ata gtt gtc gtc Ile Pro Leu Pro Pro Trp Ala Leu Ile Ala Ile Ala Ile Val Ala Val 55 60 65		728
20	ctt cta gtc gtg acc tgc tgc ttc tgt gtc tgt aag aaa tgt ttg ttc Leu Leu Val Val Thr Cys Cys Phe Cys Val Cys Lys Lys Cys Leu Phe 70 75 80		776
25	aaa aag aaa aac aag aag gga aag gaa aag gga ggg aag aac gcc Lys Lys Lys Asn Lys Lys Gly Lys Glu Lys Gly Gly Lys Asn Ala 85 90 95 100		824
30	att aac atg aaa gac gtg aaa gac tta ggg aag acc atg aag gat cag Ile Asn Met Lys Asp Val Lys Asp Leu Gly Lys Thr Met Lys Asp Gln 105 110 115		872
35	gcc ctt aag gat gac gat gtc gaa act gga ctg act gat gga gaa gaa Ala Leu Lys Asp Asp Asp Ala Glu Thr Gly Leu Thr Asp Gly Glu Glu 120 125 130		920
40	aag gag gag ccc aag gaa gag gag aaa ctg gga aag ctt caa tat tca Lys Glu Pro Lys Glu Glu Lys Leu Gly Lys Leu Gln Tyr Ser 135 140 145		968
45	ctg gac tat gac ttc cag aat aac cag ctg ctg gtg gga atc atc cag Leu Asp Tyr Asp Phe Gln Asn Asn Gln Leu Leu Val Gly Ile Ile Gln 150 155 160		1016
50	gct gct gaa ctg ccc gcc ctg gac atg gga ggc aca tct gat cca tac Ala Ala Glu Leu Pro Ala Leu Asp Met Gly Gly Thr Ser Asp Pro Tyr 165 170 175 180		1064
55	gtc aaa gtc ttc ctg ctg ccc gac aaa aag aag aag ttt gag aca aca aaa Val Lys Val Phe Leu Leu Pro Asp Lys Lys Lys Phe Glu Thr Lys 185 190 195		1112
60	gtc cac cgg aaa acc ctc aat cca gtc ttc aat gaa cag ttt act ttc Val His Arg Lys Thr Leu Asn Pro Val Phe Asn Glu Gln Phe Thr Phe 200 205 210		1160
65	aag gtg cca tac tcg gaa tta ggt ggc aag aca ctg gtg atg gct gtg Lys Val Pro Tyr Ser Glu Leu Gly Gly Lys Thr Leu Val Met Ala Val 215 220 225		1208
70	tat gat ttt gac cgc ttc tcc aag cac gac atc att gga gag ttc aaa Tyr Asp Phe Asp Arg Phe Ser Lys His Asp Ile Ile Gly Glu Phe Lys 230 235 240		1256
75	gtt cct atg aac acc gtg gat ttt ggc cac gtc acc gag gag tgg cgc Val Pro Met Asn Thr Val Asp Phe Gly His Val Thr Glu Glu Trp Arg		1304

ES 2 333 319 T3

	245	250	255	260	
5	gat ctc cag agt gct gag aaa gaa gag caa gag aaa ctg ggt gac atc Asp Leu Gln Ser Ala Glu Glu Glu Gln Glu Lys Leu Gly Asp Ile 265 270 275				1352
10	tgc ttc tcc ctc cgc tac gtc cct act gcc ggc aag ctg act gtt gtc Cys Phe Ser Leu Arg Tyr Val Pro Thr Ala Gly Lys Leu Thr Val Val 280 285 290				1400
15	att ctg gaa gcc aag aac ctg aag aag atg gat gtg ggt ggc tta tct Ile Leu Glu Ala Lys Asn Leu Lys Lys Met Asp Val Gly Gly Leu Ser 295 300 305				1448
20	gat ccc tat gta aag att cac ctg atg cag aac ggc aag aga ctg aag Asp Pro Tyr Val Lys Ile His Leu Met Gln Asn Gly Lys Arg Leu Lys 310 315 320				1496
25	aag aaa aag aca acg att aag aag aac aca ctt aac ccc tac tac aat Lys Lys Lys Thr Thr Ile Lys Lys Asn Thr Leu Asn Pro Tyr Tyr Asn 325 330 335 340				1544
30	gag tcc ttc agc ttt gaa gtt ccg ttc gag caa atc cag aaa gtg caa Glu Ser Phe Ser Phe Glu Val Pro Phe Glu Gln Ile Gln Lys Val Gln 345 350 355				1592
35	gtg gtg gta act gtt ttg gac tat gac aag att ggc aag aac gac gcc Val Val Val Thr Val Leu Asp Tyr Asp Lys Ile Gly Lys Asn Asp Ala 360 365 370				1640
40	atc ggc aaa gtc ttt gtg ggc tac aac agc acc ggc gca gag ctg cga Ile Gly Lys Val Phe Val Gly Tyr Asn Ser Thr Gly Ala Glu Leu Arg 375 380 385				1688
45	cac tgg tca gac atg ctg gcc aac ccc cgg cga ccc atc gcc cag tgg His Trp Ser Asp Met Leu Ala Asn Pro Arg Arg Pro Ile Ala Gln Trp 390 395 400				1736
50	cac act ctg cag gta gag gag gtt gat gcc atg ctg gct gtc aag His Thr Leu Gln Val Glu Glu Glu Val Asp Ala Met Leu Ala Val Lys 405 410 415 420				1784
55	aag taa agggaaaaag aaggctttct gcgtctgcc acgttagtgct ctttagccag Lys				1840
60	tatctgtaaa tacctcagta atatgggtcc tttcagtttc cagccatgca ttccctgatac aatccagttg tacitcagat cctgttttaa tttgcacaaa tttaagtgtt gaaagccccct atgccttca tcataccact gccctccaaa tctacttttc tttaagcaa tatgtatgtgt agatagagca tgactgaaat gtattgtatc acaccgttgt atataccagt atgctaaaga tttatttcta gtttgttat ttgtatgtt taagcgttc ctaatctgt tatatctaga tgtttttaat aagatgttct attttaaact atgttaattt actgagatat aggagaactg ataatatatt atatggtaaa tatagtatcg tctgcattcc agcaaaaata tcaatttgaa aggcactagt acagttaaac caacatctta aaggacaact taaacctgaa ctttcttattt				1900 1960 2020 2080 2140 2200 2260 2320
65					

ES 2 333 319 T3

aatccttga gtaccaagat ttgctcacac gacatcttg atgggtgaac ccaattttgt 2380
5 a 2381
<210> 2
<211> 421
10 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 2

15 Met Val Ser Ala Ser Arg Pro Glu Ala Leu Ala Ala Pro Val Thr Thr
1 5 10 15

20 Val Ala Thr Leu Val Pro His Asn Ala Thr Glu Pro Ala Ser Pro Gly
20 25 30

25 Glu Gly Lys Glu Asp Ala Phe Ser Lys Leu Lys Gln Lys Phe Met Asn
35 40 45

30 Glu Leu His Lys Ile Pro Leu Pro Pro Trp Ala Leu Ile Ala Ile Ala
50 55 60

35 Ile Val Ala Val Leu Leu Val Val Thr Cys Cys Phe Cys Val Cys Lys
65 70 75 80

40 Lys Cys Leu Phe Lys Lys Asn Lys Lys Gly Lys Glu Lys Gly
85 90 95

45 Gly Lys Asn Ala Ile Asn Met Lys Asp Val Lys Asp Leu Gly Lys Thr
100 105 110

50 Met Lys Asp Gln Ala Leu Lys Asp Asp Asp Ala Glu Thr Gly Leu Thr
115 120 125

55 Asp Gly Glu Glu Lys Glu Glu Pro Lys Glu Glu Lys Leu Gly Lys
130 135 140

60 Leu Gln Tyr Ser Leu Asp Tyr Asp Phe Gln Asn Asn Gln Leu Leu Val
145 150 155 160

65 Gly Ile Ile Gln Ala Ala Glu Leu Pro Ala Leu Asp Met Gly Gly Thr
165 170 175

70 Ser Asp Pro Tyr Val Lys Val Phe Leu Leu Pro Asp Lys Lys Lys
180 185 190

ES 2 333 319 T3

Phe Glu Thr Lys Val His Arg Lys Thr Leu Asn Pro Val Phe Asn Glu
195 200 205

5 Gln Phe Thr Phe Lys Val Pro Tyr Ser Glu Leu Gly Gly Lys Thr Leu
210 215 220

10 Val Met Ala Val Tyr Asp Phe Asp Arg Phe Ser Lys His Asp Ile Ile
225 230 235 240

15 Gly Glu Phe Lys Val Pro Met Asn Thr Val Asp Phe Gly His Val Thr
245 250 255

20 Glu Glu Trp Arg Asp Leu Gln Ser Ala Glu Lys Glu Glu Gln Glu Lys
260 265 270

25 Leu Gly Asp Ile Cys Phe Ser Leu Arg Tyr Val Pro Thr Ala Gly Lys
275 280 285

30 Leu Thr Val Val Ile Leu Glu Ala Lys Asn Leu Lys Lys Met Asp Val
290 295 300

35 Gly Gly Leu Ser Asp Pro Tyr Val Lys Ile His Leu Met Gln Asn Gly
305 310 315 320

40 Lys Arg Leu Lys Lys Lys Lys Thr Thr Ile Lys Lys Asn Thr Leu Asn
325 330 335

45 Pro Tyr Tyr Asn Glu Ser Phe Ser Phe Glu Val Pro Phe Glu Gln Ile
340 345 350

50 Gln Lys Val Gln Val Val Val Thr Val Leu Asp Tyr Asp Lys Ile Gly
355 360 365

55 Lys Asn Asp Ala Ile Gly Lys Val Phe Val Gly Tyr Asn Ser Thr Gly
370 375 380

60 Ala Glu Leu Arg His Trp Ser Asp Met Leu Ala Asn Pro Arg Arg Pro
385 390 395 400

65 Ile Ala Gln Trp His Thr Leu Gln Val Glu Glu Val Asp Ala Met
405 410 415

Leu Ala Val Lys Lys
420

ES 2 333 319 T3

<210> 3
 <211> 4654
 <212> ADN
 5 <213> *Rattus rattus*

 <220>
 <221> CDS
 10 <222> (526)..(1791)

 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (619)..(681)
 <223> Dominio de unión a BoNT/B

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (682)..(762)
 <223> Dominio de unión a gangliósidos o dominio transmembrana
 25 <400> 3

	ctctgaccga gttcagcccc cagtgtctt cctccaccc tcctgcagg ggcagcatcg	60
30	gcagttggca gtgggcaact tgaggctgta accagggcaa gccccccaggg tcctgctcac	120
	ccgacaggggg gctcagctcc ccaaaggggt gtgtgcaggg cgggggcggc cagctgggac	180
	cagctggtgg cccttagaaaa cctcacccac acccacacac cccttttgtt ttgcaggctg	240
35	cccctctgag agcggaggca gcgagagttac tcgcgtgcct cgccacggtc cgccgtgaga	300
	gctgcggggga ccaagactcg caccacctcc cggtcctcgc tccagggaaaa gaagacttga	360
	aagtgcgttga gcaaccaaca tccgcagtca gatcggaaaga ctctgccctg gccatccccca	420
40	gagcgccacc agaacgtctc attaagattt aagaaaagatt ccgagaagaa caaaacccccc	480
	caaatactcc ataataccct gcagaacatt tcacttgaac caaaa atg gtg agt gcc	537
	Met Val Ser Ala	
45	1	
	agt cat cct gag gcc ctg gcc cct gtc acc act gtt gcg acc ctt	585
	Ser His Pro Glu Ala Leu Ala Ala Pro Val Thr Thr Val Ala Thr Leu	
	5 10 15 20	
50	gtc cca cac aat gcc act gag cca gcc agt cct ggg gaa ggg aag gaa	633
	Val Pro His Asn Ala Thr Glu Pro Ala Ser Pro Gly Glu Gly Lys Glu	
	25 30 35	
55	gat gcc ttt tcc aag ctg aag cag aag ttt atg aat gag ctg cat aaa	681
	Asp Ala Phe Ser Lys Leu Lys Gln Lys Phe Met Asn Glu Leu His Lys	
	40 45 50	
60	att cca ttg cca ccg tgg gcc tta ata gcc ata gtt gct gtc	729
	Ile Pro Leu Pro Pro Trp Ala Leu Ile Ala Ile Ala Ile Val Ala Val	
	55 60 65	
	ctt tta gtc gta acc tgc tgc ttt tgt gtc tgt aag aaa tgt ttg ttc	777
	Leu Leu Val Val Thr Cys Cys Phe Cys Val Cys Lys Lys Cys Leu Phe	
	70 75 80	
65	aaa aag aaa aac aag aag aag ggg aag gaa aag gga gga aag aac gcc	825

ES 2 333 319 T3

	Lys Lys Lys Asn Lys Lys Gly Lys Glu Lys Gly Gly Lys Asn Ala 85 90 95 100	
5	att aac atg aaa gac gtg aaa gac tta ggg aag acc atg aag gat cag Ile Asn Met Lys Asp Val Lys Asp Leu Gly Lys Thr Met Lys Asp Gln 105 110 115	873
10	gcc ctt aag gat gac gat gct gaa acc gga ctg act gat gga gaa gaa Ala Leu Lys Asp Asp Asp Ala Glu Thr Gly Leu Thr Asp Gly Glu Glu 120 125 130	921
15	aag gaa gag ccc aag gaa gag gag aaa ctg gga aag ctc caa tat tca Lys Glu Pro Lys Glu Glu Lys Leu Gly Lys Leu Gln Tyr Ser 135 140 145	969
20	ctg gac tat gac ttc cag aat aac cag ctg ttg gtg gga atc atc cag Leu Asp Tyr Asp Phe Gln Asn Asn Gln Leu Leu Val Gly Ile Ile Gln 150 155 160	1017
25	gct gct gaa ctg ccc gcc ctg gac atg ggg ggt aca tcc gat cca tac Ala Ala Glu Leu Pro Ala Leu Asp Met Gly Gly Thr Ser Asp Pro Tyr 165 170 175 180	1065
30	gtc aaa gtc ttc ctg ctg cct gaa aaa aag aag aaa ttt gag act aaa Val Lys Val Phe Leu Leu Pro Glu Lys Lys Lys Phe Glu Thr Lys 185 190 195	1113
35	gtc cac cgg aaa acc ctc aat cca gtc ttc aat gaa caa ttt act ttc Val His Arg Lys Thr Leu Asn Pro Val Phe Asn Glu Gln Phe Thr Phe 200 205 210	1161
40	aag gta ccc tac tcg gaa tta ggt ggc aaa acc ctg gtg atg gct gtg Lys Val Pro Tyr Ser Glu Leu Gly Gly Lys Thr Leu Val Met Ala Val 215 220 225	1209
45	tat gac ttt gat cgc ttc tcc aag cac gac atc atc gga gag ttc aaa Tyr Asp Phe Asp Arg Phe Ser Lys His Asp Ile Ile Gly Glu Phe Lys 230 235 240	1257
50	gtt cct atg aac acc gtg gat ttt ggc cat gtg acc gag gag tgg cgc Val Pro Met Asn Thr Val Asp Phe Gly His Val Thr Glu Glu Trp Arg 245 250 255 260	1305
55	gat ctc cag agc gct gag aaa gaa gag caa gag aaa ctg ggt gac atc Asp Leu Gln Ser Ala Glu Lys Glu Glu Gln Glu Lys Leu Gly Asp Ile 265 270 275	1353
60	tgc ttc tcc ctc cgc tac gtc cct act gcc ggc aaa ctg act gtt gtc Cys Phe Ser Leu Arg Tyr Val Pro Thr Ala Gly Lys Leu Thr Val Val 280 285 290	1401
65	att ctg gaa gcc aag aac ctg aag aag atg gat gtg ggt ggc tta tct Ile Leu Glu Ala Lys Asn Leu Lys Lys Met Asp Val Gly Gly Leu Ser 295 300 305	1449
	gat ccc tac gtg aag att cac ctg atg cag aac ggt aag agg ctg aag Asp Pro Tyr Val Lys Ile His Leu Met Gln Asn Gly Lys Arg Leu Lys 310 315 320	1497
	aag aaa aag acg acg att aag aag aac aca ctc aac ccc tac tac aac Lys Lys Lys Thr Thr Ile Lys Lys Asn Thr Leu Asn Pro Tyr Tyr Asn	1545

ES 2 333 319 T3

	325	330	335	340	
5	gag tcc ttc agc ttt gaa gtt ccg ttc gag caa atc cag aaa gtg caa Glu Ser Phe Ser Phe Glu Val Pro Phe Glu Gln Ile Gln Lys Val Gln 345 350 355				1593
10	gtg gtg gta act gtt ttg gac tat gac aag att ggc aag aac gac gcc Val Val Val Thr Val Leu Asp Tyr Asp Lys Ile Gly Lys Asn Asp Ala 360 365 370				1641
15	atc gac aaa gtc ttc gtt ggt tac aac agc act ggg gcg gag ctg cga Ile Asp Lys Val Phe Val Gly Tyr Asn Ser Thr Gly Ala Glu Leu Arg 375 380 385				1689
20	cac tgg tca gac atc ctg gcc aac ccc egg cga ccc atc gca cag tgg His Trp Ser Asp Ile Leu Ala Asn Pro Arg Arg Pro Ile Ala Gln Trp 390 395 400				1737
25	cac act ctg cag gta gag gag gtt gat gcc atg ctg gct gtc aag His Thr Leu Gln Val Glu Glu Val Asp Ala Met Leu Ala Val Lys 405 410 415 420				1785
30	aag taa aggaaaaacg aaggctttct gcatctgcc acatagtct ctttagccag Lys				1841
35	tatctgtaaa tacctcagta atatgggtcc ttttggttcc cagccatgca ttccctgatac aatccagfgg tacttcaaatt cctgttttaa tttgcacaaa tttaagtgtt gaaagccctt atgccctcca tcataaccact gccctccaaa tctactcttc tttaagccaa tatgtatgt agatagagca tgactgaaat tatgtattgt atcacactgt tgtatatacc agtatgctaa agatttatit ctagtttgtt tatttgtatg ttgttaagcgt ttccctaacct gtgtatatact 40 agatgtttt aataagatgt cctattttaa actatgtaaa ttgactgaga tataagactg ataatatatt atatggtaaa tatagtatcg tgtgcattcc agcaaaaata tcaacttgaa aggcactagt acagttaaac caacatctta aaggacaact taaacctgag ctttctattg 45 aatcccttga gtaccaagat tcgctcacac aacacctttg atggcgaac ccaattttgt agaattcttt cacaggcaaa tagcatgacc tgagcagcat ctggcgtgac ctcaaggaag 50 caaagccaca aaccagaata gcatctgtct gtctgtaccc gcaaagccaa agccatgctt cgctcttaca gtcaaggaag caatgaacag gagccaatgc gttccctacca ctgcattctag 55 catagcttca tggtggtgtt ctctgtgtgt gcgtgtgca ggcgtaaaagt gtatgcacgt gtgtatgtgt ggtgcattgcc tttgtttggg gttagggtgg gggaggagga gctgaggaa 60 gtcagcgttt ctgaaatatt ggcctgcgtt ttaaacagaa aattatacgat ctccattgtc acatttatat aaaacgtgca acctggaaat tctgatccgg atttcaccccc aatattgatt ccaaaaggta ttgcgtgag actttgtaac aaaatatttt attatacAAA accagattag 65 aaggaatgca gaatattttt aacgcagcaa tctgtgctt ttccacaaaag tgactttgtg				1901
70					1961
75					2021
80					2081
85					2141
90					2201
95					2261
100					2321
105					2381
110					2441
115					2501
120					2561
125					2621
130					2681
135					2741
140					2801
145					2861
150					2921

ES 2 333 319 T3

	gtaaaacagac agtattgtaa ccccacgaaa agacggaata taacagttag ccatagttct	2981
5	gaatgcactt cgacgaagcc aaaacagaca gctagtgate ttttatatg ctcttttac	3041
	gtgagttta atttgcctt taaacaaagg tgaaacaaaa ccaagaacaa gttctcgcaa	3101
10	actgaagcaa cctcttatgt acactagaatg cttgacttag gaggagttt taaatgttct	3161
	caatgttatt ctgttagtaaa tggcactatt atgaagccac tagtcattcc atatgagtct	3221
	taaggacggc tctgtgtaac actgtgactg cccctgtgc ttagacacgt agtttcctca	3281
15	gtggatagca ctcaacttac tccgttagtga tattgtaaaca atactgccat tccctttac	3341
	tgcactgccc aacatgtgtg tagcacaaac agtttcatt cctaaggacc aattcagaac	3401
20	tgaacagcta tgcataaggac agaaagatac atagaccggg tgtgggagaa cacacagcat	3461
	tttgtcaaca ctgtgacta gtcacatttg tcctgctgcc ggtagacagc cacttcagga	3521
25	agtgagcctg ctacctaaca ccgttcttag actcttcctcc cacttgcata tggccccgt	3581
	tttcacctcc aggtcacaga gaatggcaac atcctgaagg gagagaccat cticacatct	3641
30	accaaaataa aatggaggaa tgctaagcat ggcctcgtgc ttgatctta ggaatttagct	3701
	ccgtgttttgc gacaaaactc aagagaatcc ccaatagggc tggtggtaga cttaagcac	3761
35	ggggtcggct gtcctcctg cacacacaac acaaaagcta acccctgggt gtgattttcc	3821
	cctcatgaga gaagaggcaa accctttgcc ctteactccc atcacagcaa actttcagac	3881
	ctagaacaga cacacaggac aaggagcaa tcctcccta tggatgaaca gcacgtttcc	3941
40	aacattaaaa ccacagatga taggaaacac atactcatag gtgagttaaa cagcagttta	4001
	aacaggagac tcaaattgagg ggcttccta tctaaggat caagtcctac caaagagaag	4061
45	gaacaccta aataccagac actgacattt aatttcatac tctcccgact ttagttgtac	4121
	acaatggaac atttcgagg acgcagctcc gagctgccga actgacatta ctccctgcat	4181
	tacaatgata ctgcacatt ctttgcaac actgccaaca tgggattgtc accatagat	4241
50	tagttggtag tatatcattc tcttgcgtac cggtgactgg acctgcttc tgaccaagat	4301
	ccatcctctg ataagccaca tgcacccatc tgacaatgca gtgtgaagtc ttggaaatgt	4361
55	atgccttaga aagatcctag ttgccttgcgtac gtatacttac tgcctgcttgcgtac	4421
	tgtgtggatt ttctctgtgt ctggtagaaa tggatgggtg ttttcttgcgtac ccataaggct	4481
60	tgtgacccgc gagccaaattc ctttagctgt actttccctt catttttgcataatgtttt	4541
	aaattctgtt tcactttgtg tagtgaaccc catggtagtt ttctgattgt tggtaaaaaaa	4601
65	aatgacttaa catattacat ggacactcaa taaaaatgtt ttatccctgt tta	4654

ES 2 333 319 T3

<210> 4

<211> 421

<212> PRT

5 <213> *Rattus rattus*

<400> 4

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

ES 2 333 319 T3

225	Val Met Ala Val Tyr Asp Phe Asp Arg Phe Ser Lys His Asp Ile Ile	230	235	240	
5	Gly Glu Phe Lys Val Pro Met Asn Thr Val Asp Phe Gly His Val Thr	245	250	255	
10	Glu Glu Trp Arg Asp Leu Gln Ser Ala Glu Lys Glu Glu Gln Glu Lys	260	265	270	
15	Leu Gly Asp Ile Cys Phe Ser Leu Arg Tyr Val Pro Thr Ala Gly Lys	275	280	285	
20	Leu Thr Val Val Ile Leu Glu Ala Lys Asn Leu Lys Lys Met Asp Val	290	295	300	
25	Gly Gly Leu Ser Asp Pro Tyr Val Lys Ile His Leu Met Gln Asn Gly	305	310	315	320
30	Lys Arg Leu Lys Lys Lys Lys Thr Thr Ile Lys Lys Asn Thr Leu Asn	325	330	335	
35	Pro Tyr Tyr Asn Glu Ser Phe Ser Phe Glu Val Pro Phe Glu Gln Ile	340	345	350	
40	Gln Lys Val Gln Val Val Val Thr Val Leu Asp Tyr Asp Lys Ile Gly	355	360	365	
45	Lys Asn Asp Ala Ile Asp Lys Val Phe Val .Gly Tyr Asn Ser Thr Gly	370	375	380	
50	Ala Glu Leu Arg His Trp Ser Asp Ile Leu Ala Asn Pro Arg Arg Pro	385	390	395	400
55	Ile Ala Gln Trp His Thr Leu Gln Val Glu Glu Glu Val Asp Ala Met	405	410	415	
60	Leu Ala Val Lys Lys	420			
	<210> 5				
	<211> 422				
	<212> PRT				
	<213> <i>Homo sapiens</i>				
65	<220>				
	<221> MISC_FEATURE				

ES 2 333 319 T3

<222> (33)..(53)

<223> Dominio de unión a BoNT/B

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (54)..(80)

10 <223> Dominio de unión a gangliósidos o dominio transmembrana

15 <400> 5

Met Val Ser Glu Ser His His Glu Ala Leu Ala Ala Pro Pro Val Thr
1 5 10 15

20 Thr Val Ala Thr Val Leu Pro Ser Asn Ala Thr Glu Pro Ala Ser Pro
25 30

25

Gly Glu Gly Lys Glu Asp Ala Phe Ser Lys Leu Lys Glu Lys Phe Met
35 40 45

30

Asn Glu Leu His Lys Ile Pro Leu Pro Pro Trp Ala Leu Ile Ala Ile
50 55 60

35

Ala Ile Val Ala Val Leu Leu Val Leu Thr Cys Cys Phe Cys Ile Cys
65 70 75 80

40

Lys Lys Cys Leu Phe Lys Lys Asn Lys Lys Lys Gly Lys Glu Lys
85 90 95

45

Gly Gly Lys Asn Ala Ile Asn Met Lys Asp Val Lys Asp Leu Gly Lys
100 105 110

50

Thr Met Lys Asp Gln Ala Leu Lys Asp Asp Asp Ala Glu Thr Gly Leu
115 120 125

55

Thr Asp Gly Glu Glu Lys Glu Glu Pro Lys Glu Glu Glu Lys Leu Gly
130 135 140

60

Lys Leu Gln Tyr Ser Leu Asp Tyr Asp Phe Gln Asn Asn Gln Leu Leu
145 150 155 160

65

Val Gly Ile Ile Gln Ala Ala Glu Leu Pro Ala Leu Asp Met Gly Gly
165 170 175

70

Thr Ser Asp Pro Tyr Val Lys Val Phe Leu Leu Pro Asp Lys Lys Lys
180 185 190

75

Lys Phe Glu Thr Lys Val His Arg Lys Thr Leu Asn Pro Val Phe Asn
195 200 205

ES 2 333 319 T3

Glu Gln Phe Thr Phe Lys Val Pro Tyr Ser Glu Leu Gly Gly Lys Thr
 210 215 220
 5
 Leu Val Met Ala Val Tyr Asp Phe Asp Arg Phe Ser Lys His Asp Ile
 225 230 235 240
 10 Ile Gly Glu Phe Lys Val Pro Met Asn Thr Val Asp Phe Gly His Val
 245 250 255
 15 Thr Glu Glu Trp Arg Asp Leu Gln Ser Ala Glu Lys Glu Glu Gln Glu
 260 265 270
 20 Lys Leu Gly Asp Ile Cys Phe Ser Leu Arg Tyr Val Pro Thr Ala Gly
 275 280 285
 25 Lys Leu Thr Val Val Ile Leu Glu Ala Lys Asn Leu Lys Lys Met Asp
 290 295 300
 30 Val Gly Gly Leu Ser Asp Pro Tyr Val Lys Ile His Leu Met Gln Asn
 305 310 315 320
 35 Gly Lys Arg Leu Lys Lys Lys Thr Thr Ile Lys Lys Asn Thr Leu
 325 330 335
 Asn Pro Tyr Tyr Asn Glu Ser Phe Ser Phe Glu Val Pro Phe Glu Gln
 340 345 350
 40 Ile Gln Lys Val Gln Val Val Val Thr Val Leu Asp Tyr Asp Lys Ile
 355 360 365
 45 Gly Lys Asn Asp Ala Ile Gly Lys Val Phe Val Gly Tyr Asn Ser Thr
 370 375 380
 50 Gly Ala Glu Leu Arg His Trp Ser Asp Met Leu Ala Asn Pro Arg Arg
 385 390 395 400
 55 Pro Ile Ala Gln Trp His Thr Leu Gln Val Glu Glu Glu Val Asp Ala
 405 410 415
 60 Met Leu Ala Val Lys Lys
 420
 <210> 6
 <211> 1876
 65 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

ES 2 333 319 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (16)..(1284)
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (133)..(195)
 10 <223> Dominio de unión a BoNT/B

 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (196)..(276)
 <223> Dominio de unión a gangliósidos o dominio transmembrana

 20 <400> 6

atccccctatg ccacc atg aga aac atc ttc aag agg aac cag gag cca aat Met Arg Asn Ile Phe Lys Arg Asn Gln Glu Pro Asn 1 5 10	51
gtg gct ccg gcc acc acc act gcc aca atg ccc ctt gca ccc gtc gca Val Ala Pro Ala Thr Thr Ala Thr Met Pro Leu Ala Pro Val Ala 15 20 25	99
cct gcc gac aac tct aca gag agc acg ggt cct ggg gag agc caa gaa Pro Ala Asp Asn Ser Thr Glu Ser Thr Gly Pro Gly Glu Ser Gln Glu 30 35 40	147
gac atg ttc gcc aag ctg aag gag aaa ttc ttc aat gag atc aac aag Asp Met Phe Ala Lys Leu Lys Glu Lys Phe Phe Asn Glu Ile Asn Lys 45 50 55 60	195
atc ccc ttg ccc ccc tgg gct ctg atc gcc atg gct gtg gtt gct ggc Ile Pro Leu Pro Pro Trp Ala Leu Ile Ala Met Ala Val Val Ala Gly 65 70 75	243
ctc ctg ctg ctc acc tgt tgc ttc tgc atc tgt aag aag tgc tgc tgc Leu Leu Leu Leu Thr Cys Cys Phe Cys Ile Cys Lys Lys Cys Cys Cys 80 85 90	291
aag aag aag aag aac aag aag gag aag ggc aaa ggc atg aag aac gcc Lys Lys Lys Asn Lys Lys Glu Lys Gly Lys Gly Met Lys Asn Ala 95 100 105	339
atg aac atg aag gac atg aaa ggg ggc cag gat gac gat gat gca gag Met Asn Met Lys Asp Met Lys Gly Gly Gln Asp Asp Asp Ala Glu 110 115 120	387
aca ggc ctg act gaa gga gaa ggt gaa ggc gag gag gag aaa gag cca Thr Gly Leu Thr Glu Gly Glu Gly Glu Glu Glu Lys Glu Pro 125 130 135 140	435
gag aac ctg ggc aaa ttg cag ttt tct ctg gac tat gat ttc cag gcc Glu Asn Leu Gly Lys Leu Gln Phe Ser Leu Asp Tyr Asp Phe Gln Ala 145 150 155	483
aac cag ctc acc gtc ggt gtc ctg cag gct gcg gaa ctc cca gcc ctg Asn Gln Leu Thr Val Gly Val Leu Gln Ala Ala Glu Leu Pro Ala Leu 160 165 170	531

ES 2 333 319 T3

gac atg ggt ggc aca tca gac cct tat gtc aaa gtc ttc ctc ctc cca Asp Met Gly Gly Thr Ser Asp Pro Tyr Val Lys Val Phe Leu Leu Pro 175 180 185	579
5 gac aag aag aag aaa tat gag act aag gtg cat cgg aag acg ctg aac Asp Lys Lys Lys Tyr Glu Thr Lys Val His Arg Lys Thr Leu Asn 190 195 200	627
10 cca gcc ttc aat gag aca ttc act ttc aag gtg cca tac cag gag tta Pro Ala Phe Asn Glu Thr Phe Thr Phe Lys Val Pro Tyr Gln Glu Leu 205 210 215 220	675
15 gca ggc aag acc ctg gtg atg gca atc tat gac ttt gac cgc ttc tct Ala Gly Lys Thr Leu Val Met Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Arg Phe Ser 225 230 235	723
20 aag cat gac atc atc ggg gag gtg aag gta ccc atg aac aca gtg gac Lys His Asp Ile Ile Gly Glu Val Lys Val Pro Met Asn Thr Val Asp 240 245 250	771
25 ctt ggc cag ccc atc gag gaa tgg aga gac cta caa ggc gga gag aag Leu Gly Gln Pro Ile Glu Glu Trp Arg Asp Leu Gln Gly Glu Lys 255 260 265	819
30 gaa gag cca gag aag ttg ggt gac atc tgt acc tcc ttg cgc tac gtg Glu Glu Pro Glu Lys Leu Gly Asp Ile Cys Thr Ser Leu Arg Tyr Val 270 275 280	867
35 ccc aca gct ggg aag ctc acc gtc tgt atc ctg gag gcc aag aac ctg Pro Thr Ala Gly Lys Leu Thr Val Cys Ile Leu Glu Ala Lys Asn Leu 285 290 295 300	915
40 aag aag atg gac gta ggg ggc ctt tca gac ccc tat gtg aag atc cac Lys Lys Met Asp Val Gly Leu Ser Asp Pro Tyr Val Lys Ile His 305 310 315	963
45 ctg atg cag aac ggt aag aga ctc aag aag aag acg aca gtg aag Leu Met Gln Asn Gly Lys Arg Leu Lys Lys Lys Thr Thr Val Lys 320 325 330	1011
50 aag aag acc ctg aac ccc tac ttc aac gag tcc ttc agc ttc gag atc Lys Lys Thr Leu Asn Pro Tyr Phe Asn Glu Ser Phe Ser Phe Glu Ile 335 340 345	1059
55 ccc ttt gag cag atc cag aaa gtc cag gtg gtc gtc acc gtg cta gac Pro Phe Glu Gln Ile Gln Lys Val Gln Val Val Val Thr Val Leu Asp 350 355 360	1107
60 tac gac aaa ctg ggc aag aat gaa gcc atc gga aag atc ttt gta ggc Tyr Asp Lys Leu Gly Lys Asn Glu Ala Ile Gly Lys Ile Phe Val Gly 365 370 375 380	1155
65 agc aac gcc aca ggc acc gag ttg cgg cac tgg tcc gac atg ctg gcc Ser Asn Ala Thr Gly Thr Glu Leu Arg His Trp Ser Asp Met Leu Ala 385 390 395	1203
aac cct cgg agg ccc att gcc cag tgg cac tct ctt aag cct gag gaa Asn Pro Arg Arg Pro Ile Ala Gln Trp His Ser Leu Lys Pro Glu Glu 400 405 410	1251
gaa gtg gat gct ctt ctg ggc aag aac aag tag gtc ccc agc cgg ccg gtg ccac	1304

ES 2 333 319 T3

Glu Val Asp Ala Leu Leu Gly Lys Asn Lys
 415 420

5 gcccctaagg agccacgccc ccgaggcgcc acgccccctg aggacactga cgagatccag 1364
 agctataaat acctcagtttta cgcgaccctt gaggtttctt catttgttttgcggtgtgtcc 1424
 10 tgtttttcttccttccctttttctt ctttttaaaag accaacttcc ttttggtggc tgtgtgaaga 1484
 gagtccccca agaggtgaaa gaaaagcctg gctctgttat tgtcccccggc gcggtccttg 1544
 15 ttgcacatgcggcc tttcacggtt tcccccttac cccaagtggg gcccctact gtcagacagt 1604
 tgaagcacta actgcttttc ctgggttttg gaccaacaac atggcaagca cattctgttt 1664
 cttgactgtg aaggcaacat agtggccagc attgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 1724
 20 tatgtgtgtg tgtacacctg tatgtgccc tccatccccca cctgcctgtt ttgaacatct 1784
 ctcttcattt tctggaaatga gtcatggaca gtgaagccat gtgagaggag aatgtcttca 1844
 25 gagactccaa gggaaagcaa gcccactgcc tg 1876

<210> 7

30 <211> 422

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

35 <400> 7

Met	Arg	Asn	Ile	Phe	Lys	Arg	Asn	Gln	Glu	Pro	Asn	Val	Ala	Pro	Ala
1														15	

40	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Met	Pro	Leu	Ala	Pro	Val	Ala	Pro	Ala	Asp	Asn
														30		

45	Ser	Thr	Glu	Ser	Thr	Gly	Pro	Gly	Glu	Ser	Gln	Glu	Asp	Met	Phe	Ala
														45		

50	Lys	Leu	Lys	Glu	Lys	Phe	Phe	Asn	Glu	Ile	Asn	Lys	Ile	Pro	Leu	Pro

55	Pro	Trp	Ala	Leu	Ile	Ala	Met	Ala	Val	Val	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu
														80	

60	Thr	Cys	Cys	Phe	Cys	Ile	Cys	Lys	Cys	Cys	Cys	Lys	Lys	Lys	Lys
													95		

65	Asn	Lys	Lys	Glu	Lys	Gly	Lys	Met	Lys	Asn	Ala	Met	Asn	Met	Lys
														110	

65	Asp	Met	Lys	Gly	Gly	Gln	Asp	Asp	Asp	Ala	Glu	Thr	Gly	Leu	Thr
														125	

ES 2 333 319 T3

Glu Gly Glu Gly Glu Gly Glu Glu Lys Glu Pro Glu Asn Leu Gly
 130 135 140

5 Lys Leu Gln Phe Ser Leu Asp Tyr Asp Phe Gln Ala Asn Gln Leu Thr
 145 150 155 160

10 Val Gly Val Leu Gln Ala Ala Glu Leu Pro Ala Leu Asp Met Gly Gly
 165 170 175

15 Thr Ser Asp Pro Tyr Val Lys Val Phe Leu Leu Pro Asp Lys Lys Lys
 180 185 190

20 Lys Tyr Glu Thr Lys Val His Arg Lys Thr Leu Asn Pro Ala Phe Asn
 195 200 205

25 Glu Thr Phe Thr Phe Lys Val Pro Tyr Gln Glu Leu Ala Gly Lys Thr
 210 215 220

30 Leu Val Met Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Arg Phe Ser Lys His Asp Ile
 225 230 235 240

35 Ile Gly Glu Val Lys Val Pro Met Asn Thr Val Asp Leu Gly Gln Pro
 245 250 255

40 Ile Glu Glu Trp Arg Asp Leu Gln Gly Gly Glu Lys Glu Glu Pro Glu
 260 265 270

45 Lys Leu Gly Asp Ile Cys Thr Ser Leu Arg Tyr Val Pro Thr Ala Gly
 275 280 285

50 Lys Leu Thr Val Cys Ile Leu Glu Ala Lys Asn Leu Lys Lys Met Asp
 290 295 300

55 Val Gly Gly Leu Ser Asp Pro Tyr Val Lys Ile His Leu Met Gln Asn
 305 310 315 320

60 Gly Lys Arg Leu Lys Lys Lys Lys Thr Thr Val Lys Lys Lys Thr Leu
 325 330 335

65 Asn Pro Tyr Phe Asn Glu Ser Phe Ser Phe Glu Ile Pro Phe Glu Gln
 340 345 350

Ile Gln Lys Val Gln Val Val Thr Val Leu Asp Tyr Asp Lys Leu
 355 360 365

ES 2 333 319 T3

Gly Lys Asn Glu Ala Ile Gly Lys Ile Phe Val Gly Ser Asn Ala Thr
370 375 380

5 Gly Thr Glu Leu Arg His Trp Ser Asp Met Leu Ala Asn Pro Arg Arg
 385 390 395 400

Pro Ile Ala Gln Trp His Ser Leu Lys Pro Glu Glu Glu Val Asp Ala
405 410 415

Leu Leu Gly Lys Asn Lys
420

15 <210> 8

<211> 2681

<212> ADN

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

<221> CDS

25 <222> (115)..(1383)

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (232)..(294)

<223> Dominio de unión a BoNT/B

<220>

35 <221> misc_feature

<222> (295)..(375)

<223> Dominio de unión a gangliósidos o dominio transmembrana

40 <400> 8

gggagccgat cggtgtggc tggtgagaa ggcagggga gtctggccc ccgaagtcca 60

45 ggtccctct tccccactccc gcgcgggcca gcgcgtgcggc tccctctgc cacc atg 117
Met
1

50 aga aac atc ttc aag agg aac cag gag ccc att gtg gct ccg gcc acc 165
 Arg Asn Ile Phe Lys Arg Asn Gln Glu Pro Ile Val Ala Pro Ala Thr
 5 10 15

acc act gcc aca atg cct ctg gca ccc gcc gca cct gcc gat aac tct 213
 Thr Thr Ala Thr Met Pro Leu Ala Pro Ala Ala Pro Ala Asp Asn Ser
 55 20 25 30

aca gag agc acg ggc acc ggg gag agc caa gaa gac atg ttc gcc aag 261
 Thr Glu Ser Thr Gly Thr Gly Glu Ser Gln Glu Asp Met Phe Ala Lys
 35 40 45

ctg aag gac aaa ttc ttc aat gag atc aac aag atc cct ttg ccc ccc 309
 Leu Lys Asp Lys Phe Phe Asn Glu Ile Asn Lys Ile Pro Leu Pro Pro
 50 55 60 65

tgg gct ctc att gcc atg gcc gtg gtt gct ggc ctc ctc ctc ctc acc 352

ES 2 333 319 T3

	Trp Ala Leu Ile Ala Met Ala Val Val Ala Gly Leu Leu Leu Thr		
	70	75	80
5	tgc tgc ttc tgc atc tgt aag aag tgc tgc aag aag aag aaa aac Cys Cys Phe Cys Ile Cys Lys Lys Cys Cys Cys Lys Lys Lys Asn		405
	85	90	95
10	aag aag gag aag ggc aaa ggc atg aag aac gcc atg aac atg aag gac Lys Lys Glu Lys Gly Lys Met Lys Asn Ala Met Asn Met Lys Asp		453
	100	105	110
15	atg aag ggg ggc cag gat gat gac gac gcg gag aca ggc ctg act gaa Met Lys Gly Gly Gln Asp Asp Asp Asp Ala Glu Thr Gly Leu Thr Glu		501
	115	120	125
20	gga gaa gga gaa ggc gag gag gag aaa gag ccg gag aac ctg ggc aaa Gly Glu Gly Glu Gly Glu Glu Lys Glu Pro Glu Asn Leu Gly Lys		549
	130	135	140
	145		
25	ttg cag ttt tct ctg gac tat gat ttc caa gcc aac cag ctc acc gtg Leu Gln Phe Ser Leu Asp Tyr Asp Phe Gln Ala Asn Gln Leu Thr Val		597
	150	155	160
30	ggc gtc ctg cag gct gct gaa ctc ccg gcc ctg gac atg ggt ggc acg Gly Val Leu Gln Ala Ala Glu Leu Pro Ala Leu Asp Met Gly Gly Thr		645
	165	170	175
35	tca gac cct tac gtc aaa gtc ttc ctc ctc cca gac aag aag aag aaa Ser Asp Pro Tyr Val Lys Val Phe Leu Leu Pro Asp Lys Lys Lys		693
	180	185	190
40	tat gag acc aag gtg cac ccg aag aca ctg aac cca gcc ttc aac gaa Tyr Glu Thr Lys Val His Arg Lys Thr Leu Asn Pro Ala Phe Asn Glu		741
	195	200	205
45	act ttc act ttc aag gtg cca tac cag gag tta gga ggc aaa acc ctg Thr Phe Thr Phe Lys Val Pro Tyr Gln Glu Leu Gly Gly Lys Thr Leu		789
	210	215	220
	225		
50	gtg atg gct atc tat gac ttt gac ccg ttc tct aag cat gac atc atc Val Met Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Arg Phe Ser Lys His Asp Ile Ile		837
	230	235	240
55	ggg gag gtg aaa gtg ccc atg aac acg gtg gac ctt ggc cag ccc atc Gly Glu Val Lys Val Pro Met Asn Thr Val Asp Leu Gly Gln Pro Ile		885
	245	250	255
60	gag gaa tgg aga gac cta caa ggc gga gag aag gaa gag cca gag aag Glu Glu Trp Arg Asp Leu Gln Gly Gly Glu Lys Glu Pro Glu Lys		933
	260	265	270
65	ctg ggt gac atc tgt acc tcc ttg ccg tac gtg ccc act gct ggg aag Leu Gly Asp Ile Cys Thr Ser Leu Arg Tyr Val Pro Thr Ala Gly Lys		981
	275	280	285
70	ctc acc gtc tgt atc ctg gag gcc aag aac ctg aag aag atg gat gtg Leu Thr Val Cys Ile Leu Glu Ala Lys Asn Leu Lys Lys Met Asp Val		1029
	290	295	300
	305		
75	ggg ggc ctc tca gac ccc tat gtg aag atc cac ttg atg cag aat ggc Gly Gly Leu Ser Asp Pro Tyr Val Lys Ile His Leu Met Gln Asn Gly		1077

ES 2 333 319 T3

	310	315	320	
5	aag aga ctc aag aag aag aag acg acg gtg aag aag aag acc ttg aac Lys Arg Leu Lys Lys Lys Thr Thr Val Lys Lys Lys Thr Leu Asn 325 330 335			1125
10	ccc tac ttc aat gag tca ttc agc ttc gag atc ccc ttt gag cag atc Pro Tyr Phe Asn Glu Ser Phe Ser Phe Glu Ile Pro Phe Glu Gln Ile 340 345 350			1173
15	cag aaa gtc cag gtg gtc acc gtg cta gac tat gac aaa ctg ggc Gln Lys Val Gln Val Val Val Thr Val Leu Asp Tyr Asp Lys Leu Gly 355 360 365			1221
20	aag aat gaa gcc atc gga aag atc ttc gta ggc agc aac gct aca ggc Lys Asn Glu Ala Ile Gly Lys Ile Phe Val Gly Ser Asn Ala Thr Gly 370 375 380 385			1269
25	acg gag ctg cgg cac tgg tcc gac atg ctg gcg aac cct cgg agg ccc Thr Glu Leu Arg His Trp Ser Asp Met Leu Ala Asn Pro Arg Arg Pro 390 395 400			1317
30	atc gcc cag tgg cac tct ctg aag cct gag gaa gaa gtg gat gct ctt Ile Ala Gln Trp His Ser Leu Lys Pro Glu Glu Glu Val Asp Ala Leu 405 410 415			1365
35	ctg ggc aag aac aag tag gcagcggcgc ctggggccac gccccagagg Leu Gly Lys Asn Lys 420			1413
40	acactgacga gctccagagc tatcaataacc tcagttatgc gaccttagag gtttcttcatt ttgtttgcgg tgtgtcctgt tttcctttcc tttttctttt tttgtctttt taaaaaccaa cttccttttgcggctatgt gaagaggccc ctaagacgtg aaagagaagc ctggctctgt tattgtccccca ggagctgtcc ttgttgcatg ccctatcaeg gttccccctc accccaagtg ggccctcta ctgtcagagt ggaagcactt cctgcttttc ctgggttttgc gaccaacaaa gtggcaagca cattctgtgt ctcgactgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgt tgtgtgtgtg tgtgtgtgtc cacgtgtgcc catccatccc caccttgcct ctgtttggaa tatctcttcg tttctggaat gagtcacgga caatgatgcc gtgtgagaga ggaaagtctt caggtactcc gaggtgagga gagcccactg cttaagtggc cagaggccag aagctctcat agtcccttgcg aaaggccatt tggaagacgc aagatgtgt actggatgtt ttccgaacta ggaccaaagg cttgatgcca tcccagactc cctcttgcgtca gtcatggctt ccccaaggagt ggggctttgg gatcattcat gaaaataaac tatttactcg actggtcggg ttcagccagg gaccggccage tccaggatgt cattcttgcgtt gacgacatca aactttgaag aaacagaagt cccatttactc agctctggat ctttgcctcg tccagtgaaa ggcagatgtt ctttccctct gcagagtaca agcagtgcgt tcatttgcgt tcacgcacca tctgcttttgc ctttgcgtt cctttttgtg taagtggaaa aataccatct gacgataagt gctttgcaca gagccagaga		1473	
45				1533
50				1593
55				1653
60				1713
65				1773
				1833
				1893
				1953
				2013
				2073
				2133
				2193
				2253
				2313
				2373

ES 2 333 319 T3

cctattagag ggatgcttgg gtgttagtt cccttgaggt ccaggtaagg aggagggtgtc	2433
aagaagggga gcgttgggtgg acagtgacaa gctagacatt gcagagctcc tcacaactcc	2493
tattcctgac cctctggacc ctgtgaccct cagtgtatggt agccggagta gcccaggcag	2553
10 accttaggag aggccccgtc ctcccttcc tttagacagtt ttctcagaat gccaggaaac	2613
acagcgatt catttcagat gggtgttggaa gaaaatgtgc taaggttgc accctatgtt	2673
20 cggaattc	2681
15 <210> 9	
<211> 422	
<212> PRT	
20 <213> <i>Rattus norvegicus</i>	
<400> 9	
25 Met Arg Asn Ile Phe Lys Arg Asn Gln Glu Pro Ile Val Ala Pro Ala	
1 5 10 15	
30 Thr Thr Thr Ala Thr Met Pro Leu Ala Pro Ala Ala Pro Ala Asp Asn	
20 25 30	
35 Ser Thr Glu Ser Thr Gly Thr Gly Glu Ser Gln Glu Asp Met Phe Ala	
35 40 45	
40 Lys Leu Lys Asp Lys Phe Phe Asn Glu Ile Asn Lys Ile Pro Leu Pro	
50 55 60	
45 Pro Trp Ala Leu Ile Ala Met Ala Val Val Ala Gly Leu Leu Leu	
65 70 75 80	
50 Thr Cys Cys Phe Cys Ile Cys Lys Lys Cys Cys Cys Lys Lys Lys	
85 90 95	
55 Asn Lys Lys Glu Lys Gly Met Lys Asn Ala Met Asn Met Lys	
100 105 110	
60 Asp Met Lys Gly Gly Gln Asp Asp Asp Asp Ala Glu Thr Gly Leu Thr	
115 120 125	
65 Glu Gly Glu Gly Glu Glu Glu Lys Glu Pro Glu Asn Leu Gly	
130 135 140	
70 Lys Leu Gln Phe Ser Leu Asp Tyr Asp Phe Gln Ala Asn Gln Leu Thr	
145 150 155 160	

ES 2 333 319 T3

Val Gly Val Leu Gln Ala Ala Glu Leu Pro Ala Leu Asp Met Gly Gly
 165 170 175

5 Thr Ser Asp Pro Tyr Val Lys Val Phe Leu Leu Pro Asp Lys Lys Lys
 180 185 190

10 Lys Tyr Glu Thr Lys Val His Arg Lys Thr Leu Asn Pro Ala Phe Asn
 195 200 205

15 Glu Thr Phe Thr Phe Lys Val Pro Tyr Gln Glu Leu Gly Gly Lys Thr
 210 215 220

20 Leu Val Met Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Arg Phe Ser Lys His Asp Ile
 225 230 235 240

25 Ile Gly Glu Val Lys Val Pro Met Asn Thr Val Asp Leu Gly Gln Pro
 245 250 255

30 Ile Glu Glu Trp Arg Asp Leu Gln Gly Gly Glu Lys Glu Glu Pro Glu
 260 265 270

35 Lys Leu Gly Asp Ile Cys Thr Ser Leu Arg Tyr Val Pro Thr Ala Gly
 275 280 285

40 Lys Leu Thr Val Cys Ile Leu Glu Ala Lys Asn Leu Lys Lys Met Asp
 290 295 300

45 Val Gly Gly Leu Ser Asp Pro Tyr Val Lys Ile His Leu Met Gln Asn
 305 310 315 320

50 Gly Lys Arg Leu Lys Lys Lys Lys Thr Thr Val Lys Lys Lys Thr Leu
 325 330 335

55 Asn Pro Tyr Phe Asn Glu Ser Phe Ser Phe Glu Ile Pro Phe Glu Gln
 340 345 350

60 Ile Gln Lys Val Gln Val Val Val Thr Val Leu Asp Tyr Asp Lys Leu
 355 360 365

65 Gly Lys Asn Glu Ala Ile Gly Lys Ile Phe Val Gly Ser Asn Ala Thr
 370 375 380

Gly Thr Glu Leu Arg His Trp Ser Asp Met Leu Ala Asn Pro Arg Arg
 385 390 395 400

Pro Ile Ala Gln Trp His Ser Leu Lys Pro Glu Glu Val Asp Ala

ES 2 333 319 T3

405

410

415

5 Leu Leu Gly Lys Asn Lys
 420

10 <210> 10

10 <211> 419

10 <212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

15 <220>

15 <221> MISC_FEATURE

15 <222> (37)..(57)

15 <223> Dominio de unión a BoNT/B

20 <220>

20 <221> MISC_FEATURE

20 <222> (58)..(84)

20 25 <223> Dominio de unión a gangliósidos o dominio transmembrana

25 <400> 10

30 Met Arg Asn Ile Phe Lys Arg Asn Gln Glu Pro Ile Val Ala Pro Ala
 1 5 10 15

35 Thr Thr Thr Ala Thr Met Pro Ile Gly Pro Val Asp Asn Ser Thr Glu
 20 25 30

40 Ser Gly Gly Ala Gly Glu Ser Gln Glu Asp Met Phe Ala Lys Leu Lys
 35 40 45

45 Glu Lys Leu Phe Asn Glu Ile Asn Lys Ile Pro Leu Pro Pro Trp Ala
 50 55 60

50 Leu Ile Ala Ile Ala Val Val Ala Gly Leu Leu Leu Leu Thr Cys Cys
 65 70 75 80

55 Phe Cys Ile Cys Lys Lys Cys Cys Cys Lys Lys Lys Asn Lys Lys
 85 90 95

60 Glu Lys Gly Lys Gly Met Lys Asn Ala Met Asn Met Lys Asp Met Lys
 100 105 110

65 Gly Gly Gln Asp Asp Asp Asp Ala Glu Thr Gly Leu Thr Glu Gly Glu
 115 120 125

70 Gly Glu Gly Glu Glu Lys Glu Pro Glu Asn Leu Gly Lys Leu Gln
 130 135 140

ES 2 333 319 T3

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

ES 2 333 319 T3

385

390

395

400

5 Gln Trp His Ser Leu Lys Pro Glu Glu Val Asp Ala Leu Leu Gly
405 410 415

10 Lys Asn Lys

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65