



19



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**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.02.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.02.2010**

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

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

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 333 319 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

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 syntaxina, 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  
30 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 avidéz (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).  
35

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 (synt) 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 Synt I y II se unían a BoNT/B en presencia de gangliósidos; la constante de disociación para el complejo synt I-BoNT/B era de 2,3 nM y la constante de disociación para synt 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 synt 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 synt II, lo que indica que la toxina no se internalizaba (Nishiki *et al.*, 1996b). Aunque los estudios bioquímicos establecían claramente que synt 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 synt I, aunque de una manera independiente de gangliósidos (Li y Singh, 1998).  
55

Synt 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 citoplásmico (a.a. 88-422). El dominio citoplásmico 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.  
65

## 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.

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 N°: 7, los aminoácidos 40-267 de la SEC ID N°: 7, los aminoácidos 1-267 de la SEC ID N°: 7, los aminoácidos 1-422 de la SEC ID N°: 7 y (ii) un gangliósido.

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 N°: 7, los aminoácidos 40-267 de la SEC ID N°: 7, los aminoácidos 1-267 de la SEC ID N°: 7, los aminoácidos 1-422 de la SEC ID N°: 7 y (ii) un gangliósido.

La presente invención además proporciona 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 N°: 7, siempre que se excluya un polipéptido que comprende una sinaptotagmina I o II de longitud completa; y

detectar la unión del polipéptido a BoNT/B.

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.

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.

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

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 quiméricas, 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.

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

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 (IKMNDAEFFGKSNFQEKLEKEC, 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  $\mu$ 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<sup>-</sup> (Shoji-Kasai *et al.*, 1992). Se sondó con  $\alpha/\beta$ -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<sup>-</sup>. Se incubaron células PC12 Syt I<sup>-</sup> 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  $\mu$ g de proteína de los clones syt II<sup>+</sup> y 100  $\mu$ g de los clones syt II<sup>-</sup>. Los clones N° 1, 5 y 10 expresaban syt II (syt II<sup>+</sup>), los clones N° 8, 9 y 13 carecían de syt II (syt II<sup>-</sup>). Como el clon N° 5 expresaba bajos niveles de syt II (panel izquierdo), también se incluyó una muestra de 100  $\mu$ g de este clon en las transferencias de los clones de syt II<sup>-</sup> para confirmar que este clon expresa syt II. B) Se decoraron células PC12 de tipo silvestre o syt II<sup>+</sup> (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<sup>+</sup>, y no se observó en ninguno de los clones syt II<sup>-</sup>. 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<sup>+</sup>. 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  $\mu$ M, respectivamente; la concentración final de BoNT/B fue 30 nM. B) Se trataron células PC12 Syt II<sup>+</sup> (clon N° 1) con BoNT/B 3<sup>o</sup> 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  $\mu$ 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  $\mu$ M) más gangliósidos (25  $\mu$ g/ml). Después 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<sub>50</sub>/ml. Los valores de DL<sub>50</sub>/ml resultantes se usaron para calcular el % de neutralización de la toxicidad usando la expresión:  $1 - [\text{DL}_{50}/\text{ml} (+ \text{fragmento de syt II}) / \text{DL}_{50}/\text{ml} (- \text{fragmento de syt II})] \times 100$ , 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,  $10^5$ - $10^6$  DL<sub>50</sub>/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  $\pm 10\%$ .

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  $\alpha$ -syt I<sub>N</sub> se unen simultáneamente a syt I. La co-immunoprecipitación del fragmento 1-265 de syt I (1,5  $\mu\text{M}$ ) con BoNT/B (300 nM) 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 preincubaron células PC12 con gangliósidos y se incubaron con BoNT/B (50 nM) más anticuerpos  $\alpha$ -syt I<sub>N</sub> (10  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) durante 10 min a 37°C en tampones de alta [K<sup>+</sup>]. 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  $\alpha$ -syt I<sub>N</sub> 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  $\alpha$ -syt I<sub>C</sub> - 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<sup>-</sup>. Las células syt I<sup>-</sup> no pudieron captar ni anticuerpo  $\alpha$ -syt I<sub>N</sub> ni BoNT/B.

### 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 humana, 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

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.

#### 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 N°: 2 ó 4, los aminoácidos 33-53 de la SEC ID N° 5; los aminoácidos 40-60 de la SEC ID N°: 7 ó 9, o los aminoácidos 37-57 de la SEC ID N°: 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 N°: 2 ó 4, los aminoácidos 54-80 de la SEC ID N°: 5, los aminoácidos 61-87 de la SEC ID N° 7 ó 9, o los aminoácidos 58-84 de la SEC ID N°: 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 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 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  
35 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 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 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.

#### *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 20-25merico 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 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 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

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 por un especialista en la técnica.

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

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, 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.

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 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 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 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 de un vector que puede expresar el polipéptido en el sujeto humano o no humano.

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 deleciones 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*

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. 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. 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.

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



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.

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 (Kd), también pueden obtenerse constantes de activación y desactivación (ka y kd). 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).

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*

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 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 sistemas adecuados que se pueden usar para el ensayo adicional. En los siguientes ejemplos se proporcionan ejemplos de dichos sistemas.

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 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 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*

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, 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 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 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.

15

#### *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*

*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<sup>-</sup>). Una mezcla de gangliósidos de cerebro bovino (18% de GM<sub>1</sub>, 55% de GD<sub>1a</sub>, 10% de GT<sub>1b</sub> 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).

30

*Anticuerpos* - Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra syb II (69.1), syt I ( $\alpha$ -syt I<sub>N</sub>; 604-4,  $\alpha$ -syt I<sub>C</sub>; 41.1),  $\alpha/\beta$ -SNAP (77-1) y SNAP-25 (71.2) se proporcionaron por R. Jahn y S. Engers (Göttingen, 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.

35

*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).

45

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 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).

50

*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  $\mu$ g de proteína inmovilizada con las concentraciones indicadas de BoNT/B, A o E con (+; 25  $\mu$ g/ml) o sin (-) gangliósidos en 100  $\mu$ 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.

55

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 (IKMNDAEFFGKSNFQEKLEKEC, 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  $\mu$ l del gel de agarosa conjugado.

65

*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<sup>+</sup>), 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 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).

*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 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.

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 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.

*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 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 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 mM, NaCl 145 mM, KCl 5,6 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, glucosa 5,6 mM, ácido ascórbico 0,5 mM, BSA al 0,1% [pH 7,4]) o solución de alta [K<sup>+</sup>] (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<sub>N</sub>; clon 604.4) o el dominio citoplásmico de syt I (α-syt I<sub>c</sub>; clon 41.1). Las células se lavaron con medio de cultivo, se 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.

*Co-inmunoprecipitación* - Se purificó syt I 1-265 GST recombinante como se ha descrito anteriormente y se escindió del marcador GST usando trombina. Se incubaron cinco µl de anticuerpo monoclonal α-syt I<sub>N</sub> (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 policlonal anti-BoNT/B y α-syt I<sub>N</sub> (604.4).

*Experimentos en hemidiafragma de rata* - Se pusieron hemidiafragmas de rata en solución de Ringer enfriada con hielo (en mM: NaCl 138,8, KCl 4, NaHCO<sub>3</sub> 12, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 2, glucosa 1 l) gasificada con 95% de CO<sub>2</sub>/5% de O<sub>2</sub>. La estimulación se realizó con una solución similar en la que la concentración de KCl se aumentó a 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 inmunomarcarse con 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  $DL_{50}$  para ratones (20-22 g; Institute of Cancer Research strain) usando métodos convencionales (Schantz y Kautter, 1978). El valor de  $DL_{50}$  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  $10^8$   $DL_{50}/mg$ . Para los estudios de neutralización de la toxina, se usó el ensayo más rápido de tiempo 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  $\mu l$  de BoNT/B (expresado en min) frente a la toxicidad específica de BoNT/B que se determinó usando el método convencional descrito anteriormente ( $\log [DL_{50}/ml]$ ). Dentro del intervalo lineal,  $10^4$ - $10^6$   $DL_{50}/ml$ , este gráfico se usó para convertir el tiempo transcurrido hasta la muerte determinado experimentalmente, desde la inyección intravenosa de dosis relativamente grandes de toxina, en valores de  $DL_{50}/ml$ . Para los experimentos de neutralización de la toxina, se premezcló BoNT/B con gangliósidos solos (250  $\mu g/ml$ ) 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  $\mu l$ . 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 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  $[DL_{50}/ml]$  aparente usando la curva patrón, y el porcentaje de neutralización se calculó usando la expresión:  $1 - [DL_{50}/ml(+ \text{ fragmento de syt II})/DL_{50}/ml (- \text{ fragmento de syt II})] \times 100$ , donde (+ fragmento de syt II) se refiere a muestras que contienen toxina, gangliósidos y proteínas recombinantes y (- fragmentos de syt II) se refiere a muestras que estaban compuestas de toxina y gangliósidos únicamente.

## 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 avidéz que fragmentos más grandes de syt II ya que la unión detectable requeriría 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  $\text{Ca}^{2+}$ . 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 (Lomneth *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<sup>-</sup>) (Shoji-Kasai *et al.*, 1992). Esta línea celular es capaz de realizar una exocitosis inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , 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<sup>-</sup> 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 SNAP-25 en células de tipo silvestre (datos no mostrados) y syt I<sup>-</sup> (Fig. 3D). De esta manera, las dos toxinas pueden entrar en las células PC12 syt I<sup>-</sup> 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<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>, 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<sup>+</sup>. 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 también contiene BoNT/B unida, como se muestra por la inmunoreactividad 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 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 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 puede proporcionar ninguna protección.

*Actividad dependiente de la entrada de BoNT/B en vesículas que contienen syt I* - Los datos anteriores sugieren 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 anticuerpos dirigidos contra el dominio luminal N-terminal de syt I (Juzans *et al.*, 1996; Mateoli *et al.*, 1992). En primer lugar, se demostró que un anticuerpo anti-dominio luminal de syt I ( $\alpha$ -syt I<sub>N</sub>) 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 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 en el mismo compartimiento en respuesta a la estimulación. Se precargaron células PC12 con gangliósidos y se despolarizaron con una alta [K<sup>+</sup>] para inducir la exocitosis de vesículas secretoras en presencia de anticuerpos  $\alpha$ -syt I<sub>N</sub> 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  $\alpha$ -syt I<sub>N</sub> como BoNT/B 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  $\alpha$ -syt I<sub>N</sub>, no se captó un anticuerpo dirigido contra el dominio citoplásmico de syt I ( $\alpha$ -syt I<sub>C</sub>) (Fig. 9B), lo que demuestra que la tinción con el anticuerpo del dominio luminal no se debe a una pérdida de integridad de las membranas celulares. Además, los anticuerpos  $\alpha$ -syt I<sub>N</sub> y BoNT/B no se captaron en células PC12 syt I<sup>-</sup> (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 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 citoplásmico ( $\alpha$ -syt I<sub>C</sub>) de syt I.

Se obtuvieron resultados similares usando células PC12 syt II<sup>+</sup> - BoNT/B entró en vesículas que contenían syt I de una manera dependiente de la actividad (datos no mostrados). Los presentes solicitantes no han podido localizar syt II en las líneas celulares syt II<sup>+</sup> 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 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 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 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<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> DL<sub>50</sub>) 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 DL<sub>50</sub> 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 DL<sub>50</sub>/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 DL<sub>50</sub> aparente/ml. Después de esta conversión, los valores de DL<sub>50</sub> 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- $\mu$ M. 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. Kowalchuk, 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.

- Halpern, J.L., and E.A. Neale. 1995. Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport. *Curr Top Microbiol Immunol.* 195:221-41.
- Hatheway, C.L. 1995. Botulism: the present status of the disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 195:55-75.
- 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.
- Jahn, R., and H. Niemann. 1994. Molecular mechanisms of clostridial neurotoxins. *Ann N Y Acad Sci.* 733:245-55.
- 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.
- Kerner, J. 1817. Medizinische Polizen. Vergiftung durch verorbene Wurste. *Tübinger Blatter.* 3:1-25.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lomneth, 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.
- Mahant, N., P.D. Clouston, and I.T. Lorentz. 2000. The current use of botulinum toxin. *J Clin Neurosci.* 7:389-94.
- 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.
- Montecucco, C. 1986. How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *TIBS*:314-317.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Schantz, E., and D. Kautter. 1978. Standardized assay for *Clostridium botulinum* toxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61:96-99.
- 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.
- 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.
- 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.

**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.

**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.

**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.

**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.

**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 Kowalchuk, and T.F. Martin.** 2002. Ca<sup>2+</sup>-dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Neuron*. 34:599-611.

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 N°: 7, los aminoácidos 40-267 de la SEC ID N°: 7, los aminoácidos 1-267 de la SEC ID N°: 7, los aminoácidos 1-422 de la SEC ID N°: 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 N°: 7, los aminoácidos 40-267 de la SEC ID N°: 7, los aminoácidos 1-267 de la SEC ID N°: 7, los aminoácidos 1-422 de la SEC ID N°: 7 y (ii) un gangliósido.

15 3. 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 N°: 7 con la condición de que se excluya un polipéptido que comprende una sinaptotagmina I o II de longitud completa; y

detectar la unión del polipéptido a BoNT/B.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

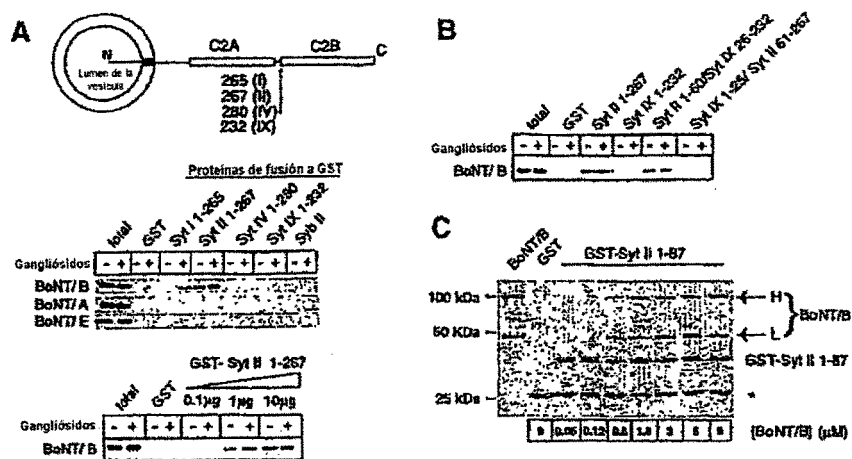


FIG. 1

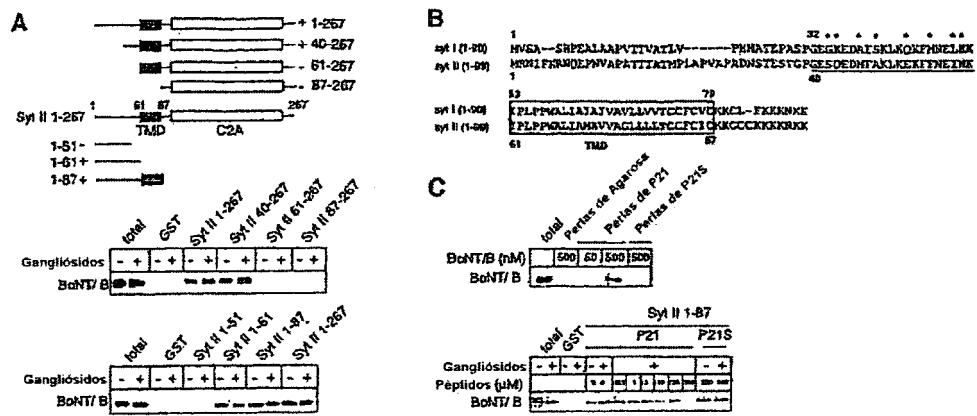


FIG. 2

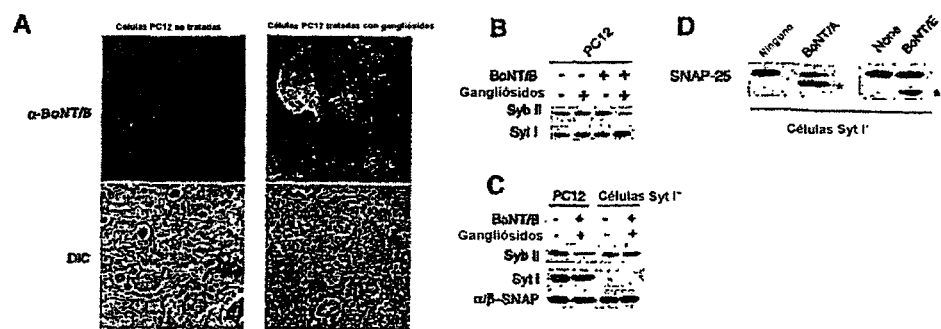


FIG. 3

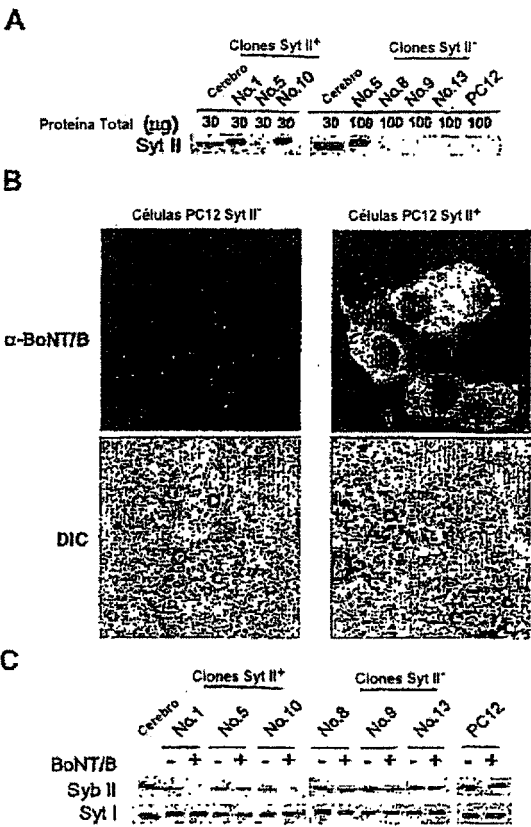


FIG. 4

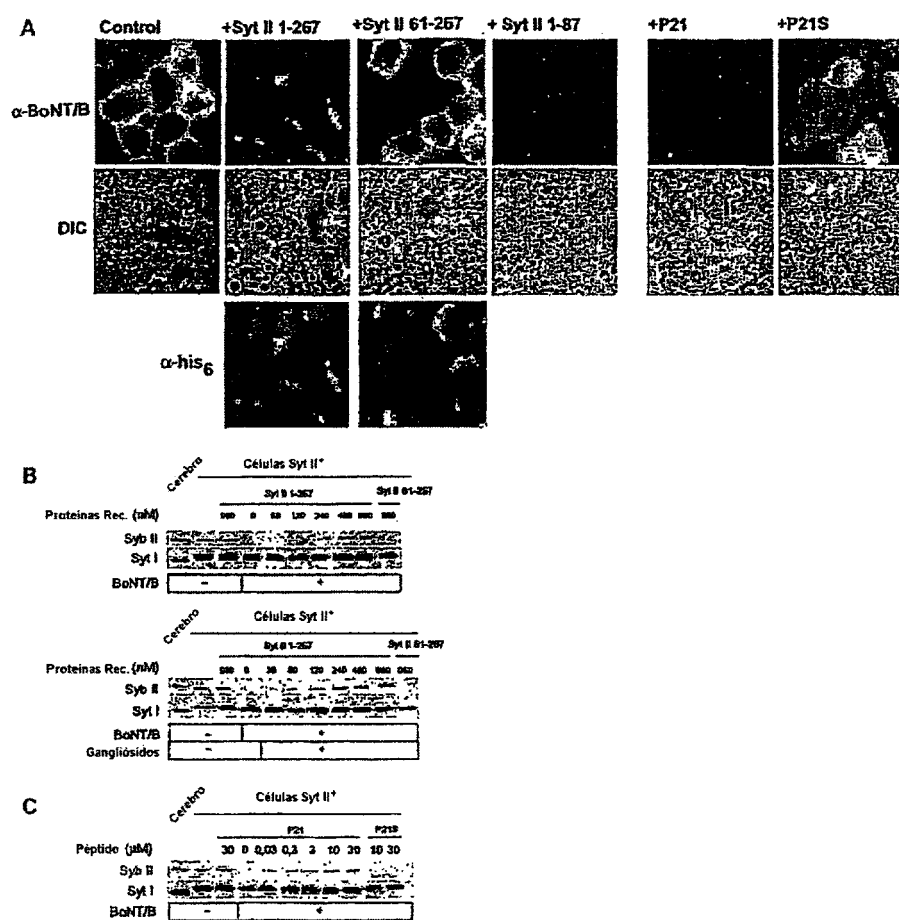


FIG. 5

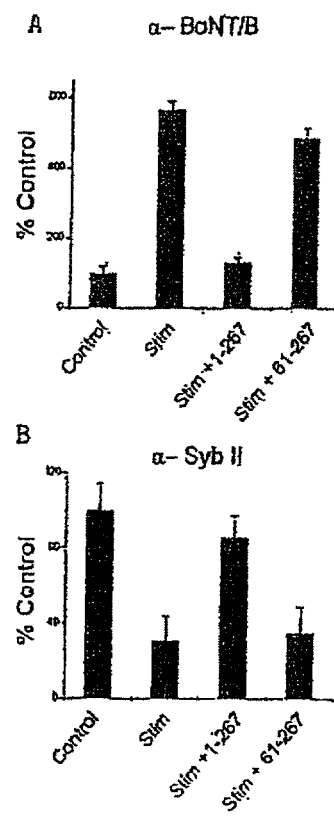


FIG. 6



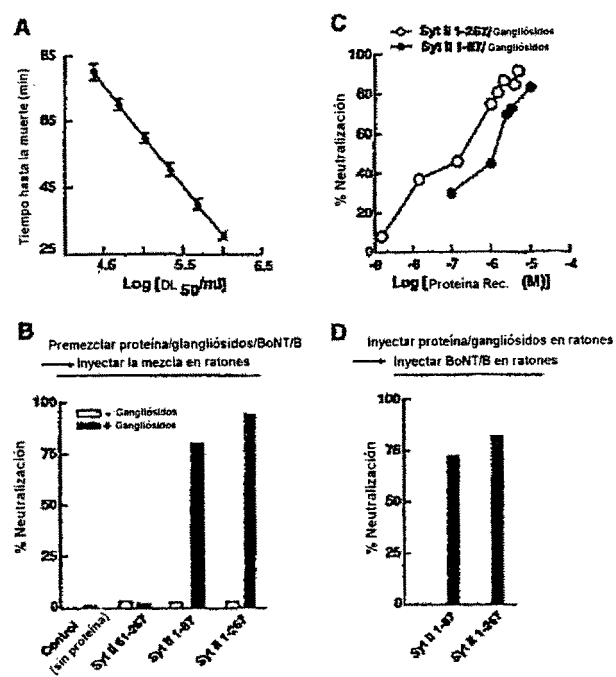


FIG. 7

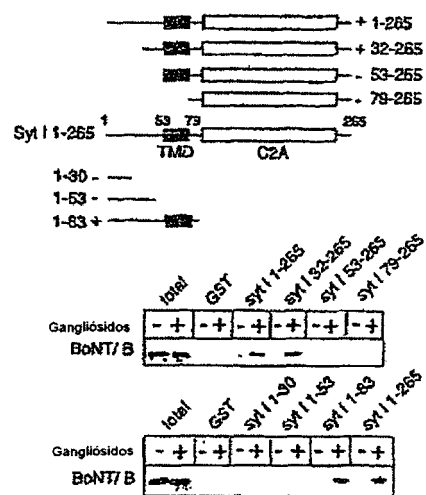


FIG. 8

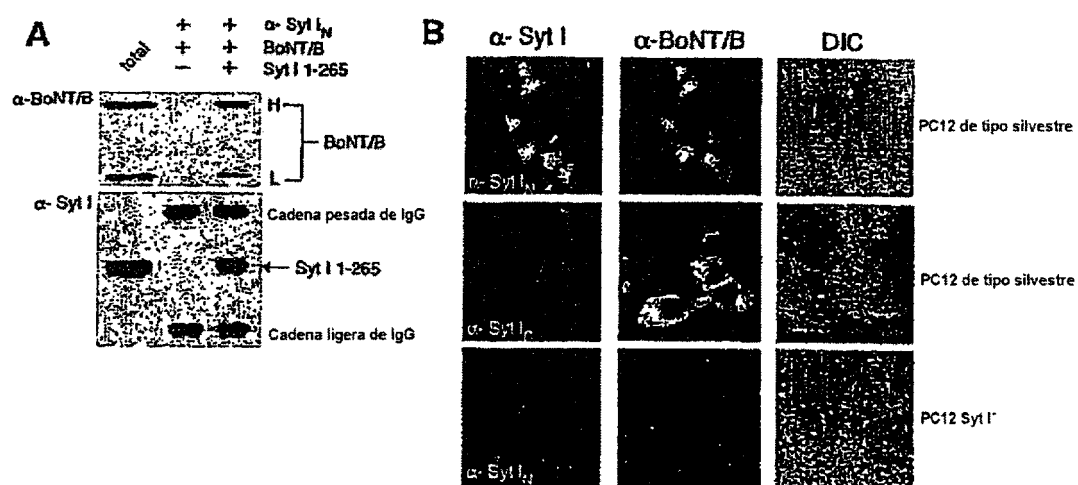


FIG. 9

# 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  
 20  
 <160> 10  
 <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 gccccaggg tcctgctcac ccaacagggg gctcaggtcc ccgaagtgtg 60  
 tgcagggcgg gggcgccag ctgggaccag ctggtggccc tagaaaacct caccacacacc 120  
 cacaccaca caccctttt gtgttgccag ctgcccctct gagagcggag gcagcgagag 180  
 55  
 agtactcgtt tgcctcgac cggtcgcgg tgagagcagc ggggaccaag actcgacca 240  
 tctcccggtc ggtcctcgtt ccagtttccc tctgaatcct acacttcata tgtagacacc 300  
 ttactcaact ggcatttgtt agtcaagtct cctctgcac 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 536  
 Met Val Ser Ala  
 65  
 agt cgt cct gag gcc ctg gct gcc cct gtc acc act gtt gcg acc ctt 584

# ES 2 333 319 T3

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

# 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 Lys 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 gcc 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 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 aggggaaaag aagcctttct gcgtctgccc acgtagtgtct ctttagccag Lys	1840			
60	tatctgtaaa tacctcagta atatgggtcc tttcagtttc cagccatgca ttcttgatac	1900			
65	aatccagtgg tacttcagat cctgttttta tttgcacaaa ttttaagtgt gaaagcccct	1960			
	atgcccttca tcataccact gccctccaaa tctactcttc ttttaagcaa tatgatgtgt	2020			
	agatagagca tgactgaaat gtattgtatc acaccgttgt atataccagt atgctaaaga	2080			
	tttatttcta gtttgtgtat ttgtatgttg taagcgittc ctaatctgtg tatatctaga	2140			
	tgtttttaat aagatgttct attttaaaact atgtaaattg actgagatat aggagaactg	2200			
	ataatatatt atatggtaaa tatagtatcg totgcattcc agcaaaaata tcaatttgaa	2260			
	aggcactagt acagttaaac caacatctta aaggacaact taaacctgaa ctttctattg	2320			

# ES 2 333 319 T3

aatecttttga gtaccaagat ttgctcacac gacatctttg atgggtgaac ccaattttgt 2380

a 2381

<210> 2

<211> 421

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Pro Tyr Val Lys Val Phe Leu Leu Pro Asp Lys 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 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

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

25 <400> 3

ctctgaccga gttcagcccc cagtgtcttt cctccacctc ctctgcagc ggcagcatcg 60
gcagttggca gtgggcaact tgaggctgta accagggcaa gccccaggg tcctgctcac 120
30 cggacagggg gctcagctcc ccaaaggggt gtgtgcaggg cgggggcggc cagctgggac 180
cagctgggtg ccctagaaaa cctcaccac acccacacac cccttttggtg ttgcaggctg 240
35 cccctctgag agcggaggca gcgagagtac tcgctgcct cgcaccggtc cgcgggtgaga 300
gctgcgggga ccaagactcg caccacctcc cggtcctcgc tccaggaaaa gaagacttga 360
aagtgcctga gcaaccaaca tccgcagtca gatcggaaga ctctgcctg gccatcccca 420
40 gagcgccacc agaacgtctc attaagattg aagaaagatt ccgagaagaa caaaaccccc 480
caaatactcc ataataccct gcagaacatt tcaattgaac caaaa atg gtg agt gcc 537
Met Val Ser Ala
1

45 agt cat cct gag gcc ctg gcc 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 gcc ata gtt gcg gtc 729
Ile Pro Leu Pro Pro Trp Ala Leu Ile Ala Ile Ala Val Ala Val
55 60 65

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

aaa aag aaa aac aag aag aag ggg aag gaa aag gga gga aag aac gcc 825

```

# ES 2 333 319 T3

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

# 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 cgg 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 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	1785
30	aag taa agggaaaacg aagcctttct gcatctgccc acatagtgct ctttagccag Lys				1841
35	tatctgtaaa tacctcagta atatgggtcc ttttggtttc cagccatgca ttcctgatac aatccagtggt tacttcaaat cctgttttaa ttgacaaaa ttttaagtga gaaagccctt				1901
40	atgccctcca tcataccact gccctccaaa tctactcttc ttttaagcaa tatgatgtgt agatagagca tgactgaaat tatgtattgt atcacactgt tgtatatacc agtatgctaa				1961
45	agatttatit ctagttitgtg tatttgtatg ttgtaagcgt ttccctaacct gtgtatatct agatgttttt aataagatgt cctattttta actatgtaaa ttgactgaga tatagagctg				2021
50	ataatatatt atatggtaaa tatagtatcg tgtgcattcc agcaaaaata tcaacttgaa aggcactagt acagftaaac caacatctta aaggacaact taaacctgag ctttctattg				2081
55	aatcctttga gtaccaagat tcgctcacac aacacctttg atgggcgaac ccaattttgt agaattcttt cacaggcaaa tagcatgacc tgagcagcat ctgggctgac ctcaaggaag				2141
60	caaagccaca aaccagaata gcatctgtct gtctgtacct gcaaagccaa agccatgctt cgctcttaca gtcaaggaag caatgaacag gagccaatgc gttcctacca ctgcatctag				2201
65	catagcttca tgggtggtgt ctctgtgtgt gcgtgtgcaa gcgtgaaagt gtatgcacgt gtgtatgtgt ggtgcatgcc tttgtttggg gttagggtgg gggaggagga gctgaggga				2261
	gtcagcgttt ctgaaatatt gcctgcctgt ttaaacagaa aattatagct ctccattgtc acatttatat aaaacgtgca acctgggaat tctgatccgg atttcacccc aatattgatt				2321
	ccaaaaggta ttgcggtgag actttgtaac aaaatatatt attatacaaa accagattag aaggaaatgca gaatatTTTTT aacgcagcaa tctgtgtcta ttccaaaag tgactttgtg				2381
					2441
					2501
					2561
					2621
					2681
					2741
					2801
					2861
					2921

# ES 2 333 319 T3

gtaaacagac agtattgtaa cccacgaaa agacggaata taacagttag ccatagttct 2981  
 5 gaatgcactt cgacgaagcc aaaacagaca gctagtgate tttttatatg ctcttttttac 3041  
 gtgagtttta atttgtcctt taaacaaagg tgaacaaaaa ccaagaacaa gttctcgcaa 3101  
 actgaagcaa cctcttatgt acactagatg cttgacttag gaggagtttt taaatgttct 3161  
 10 caatgttatt ctgtagtaaa tggcactatt atgaagccac tagtcattcc atatgagtct 3221  
 taaggacggc tctgtgtaac actgtgactg ccccggtgtg ttagacacgt agtttctca 3281  
 15 gtggatagca ctcaacttac tcogtagtga tattgtaaca atactgccat tccctottac 3341  
 tgcactgccc aacatgtgtg tagcacaaaac agttctcatt cctaaggacc aattcagaac 3401  
 20 tgaacagcta tgcataaggac agaaagatac atagaccggg tgtgggagaa cacacagcat 3461  
 tttgtcaaca ctgtgcacta gtcacatttg tcctgctgcc ggtagacagc cacttcagga 3521  
 25 agtgagcctg ctacctaaca ccgcttctag actcttctcc cacttgctat tgtggcccggt 3581  
 tttcacctcc aggtcacaga gaatggcaac atcctgaagg gagagaccat cttcacatct 3641  
 accaaaataa aatggaggaa tgctaagcat ggcctcgtgc ttgatcttta ggaattagct 3701  
 30 ccgtgttttg gacaaaactc aagagaatcc ccaatagggc tgggtgtaga ctttaagcac 3761  
 ggggtcggct gctcctcctg cacacacaac aaaaagcta acccctggtt gtgattcttc 3821  
 35 cctcatgaga gaagaggcaa accctttgcc cttcactccc atcacagcaa actttcagac 3881  
 ctagaacaga cacacaggac aaggagcaaa tccttcctta tggatgaaca gcacgtttcc 3941  
 40 aacattaaaa ccacagatga taggaaacac atactcatag gtgagttaaa cagcagttta 4001  
 aacaggagac tcaaatgagg ggctttccta tctaagggat caagtcctac caaagagaag 4061  
 45 gaacacctta aataccagac actgacattt aatttcatca tctcccgact tgagttgtac 4121  
 acaatggaac atttccgagg aocagctcc gagctgccga actgacatta cttcctgcat 4181  
 tacaatgata ctagcacatt ctcttgcaac actgccaaca tgggattgtc accatagagt 4241  
 50 tagttggtac tatatcatto tcttgtgagc cgggtgactg acctgcttc tgaccaagat 4301  
 ccatcctctg ataagccaca tgtacctttc tgacaatgca gtgtgaagtc ttagaagctg 4361  
 55 atgccctaga aagatcctag ttgcctttgt gtatacttac tgccctgctg agtgtttcta 4421  
 tgtgtggatt ttctctgtgt ctggtagaaa tgttggggtg tttcttctg ccataaggct 4481  
 60 tgtgaccgc gagccaattc ccttagctgt actttccctt cttttttga taagtgggtt 4541  
 aaattctgtt tcactttgtg tagtgaaccc catggtagtt ttctgattgt tgttaaaaaa 4601  
 65 aatgacttaa catattacat ggacactcaa taaaatgtt ttatttctg 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		
	Val	Ala	Thr	Leu	Val	Pro	His	Asn	Ala	Thr	Glu	Pro	Ala	Ser	Pro	Gly	
15				20					25					30			
	Glu	Gly	Lys	Glu	Asp	Ala	Phe	Ser	Lys	Leu	Lys	Gln	Lys	Phe	Met	Asn	
			35					40					45				
20	Glu	Leu	His	Lys	Ile	Pro	Leu	Pro	Pro	Trp	Ala	Leu	Ile	Ala	Ile	Ala	
	50						55					60					
25	Ile	Val	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Cys	Cys	Phe	Cys	Val	Cys	Lys	
	65					70					75					80	
	Lys	Cys	Leu	Phe	Lys	Lys	Lys	Asn	Lys	Lys	Lys	Gly	Lys	Glu	Lys	Gly	
30					85					90					95		
	Gly	Lys	Asn	Ala	Ile	Asn	Met	Lys	Asp	Val	Lys	Asp	Leu	Gly	Lys	Thr	
35				100					105					110			
	Met	Lys	Asp	Gln	Ala	Leu	Lys	Asp	Asp	Asp	Ala	Glu	Thr	Gly	Leu	Thr	
40			115					120					125				
	Asp	Gly	Glu	Glu	Lys	Glu	Glu	Pro	Lys	Glu	Glu	Glu	Lys	Leu	Gly	Lys	
		130					135					140					
45	Leu	Gln	Tyr	Ser	Leu	Asp	Tyr	Asp	Phe	Gln	Asn	Asn	Gln	Leu	Leu	Val	
	145					150					155					160	
50	Gly	Ile	Ile	Gln	Ala	Ala	Glu	Leu	Pro	Ala	Leu	Asp	Met	Gly	Gly	Thr	
					165					170					175		
55	Ser	Asp	Pro	Tyr	Val	Lys	Val	Phe	Leu	Leu	Pro	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	
				180					185					190			
60	Phe	Glu	Thr	Lys	Val	His	Arg	Lys	Thr	Leu	Asn	Pro	Val	Phe	Asn	Glu	
			195					200					205				
	Gln	Phe	Thr	Phe	Lys	Val	Pro	Tyr	Ser	Glu	Leu	Gly	Gly	Lys	Thr	Leu	
65		210					215					220					

# ES 2 333 319 T3

Val Met Ala Val Tyr Asp Phe Asp Arg Phe Ser Lys His Asp Ile Ile  
 225 230 235 240  
 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> *Homo sapiens*

<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)

<223> Dominio de unión a gangliósidos o dominio transmembrana

10

<400> 5

15	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	20 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 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
	Thr Ser Asp Pro Tyr Val Lys Val Phe Leu Leu Pro Asp Lys Lys Lys	180 185 190
	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 Lys Thr Thr Ile Lys Lys Asn Thr Leu  
 325 330 335  
 40  
 Asn Pro Tyr Tyr Asn Glu Ser Phe Ser Phe Glu Val Pro Phe Glu Gln  
 340 345 350  
 45  
 Ile Gln Lys Val Gln Val Val Val Thr Val Leu Asp Tyr Asp Lys Ile  
 355 360 365  
 50  
 Gly Lys Asn Asp Ala Ile Gly Lys Val Phe Val Gly Tyr Asn Ser Thr  
 370 375 380  
 55  
 Gly Ala Glu Leu Arg His Trp Ser Asp Met Leu Ala Asn Pro Arg Arg  
 385 390 395 400  
 60  
 Pro Ile Ala Gln Trp His Thr Leu Gln Val Glu Glu Glu Val Asp Ala  
 405 410 415  
 Met Leu Ala Val Lys Lys  
 420

<210> 6

<211> 1876

<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

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

# ES 2 333 319 T3

	gac atg ggt ggc aca tca gac cct tat gtc aaa gtc ttc ctc ctc cca	579
	Asp Met Gly Gly Thr Ser Asp Pro Tyr Val Lys Val Phe Leu Leu Pro	
	175 180 185	
5		
	gac aag aag aag aaa tat gag act aag gtg cat cgg aag acg ctg aac	627
	Asp Lys Lys Lys Lys Tyr Glu Thr Lys Val His Arg Lys Thr Leu Asn	
	190 195 200	
10		
	cca gcc ttc aat gag aca ttc act ttc aag gtg cca tac cag gag tta	675
	Pro Ala Phe Asn Glu Thr Phe Thr Phe Lys Val Pro Tyr Gln Glu Leu	
	205 210 215 220	
15		
	gca ggc aag acc ctg gtg atg gca atc tat gac ttt gac cgc ttc tct	723
	Ala Gly Lys Thr Leu Val Met Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Arg Phe Ser	
	225 230 235	
20		
	aag cat gac atc atc ggg gag gtg aag gta ccc atg aac aca gtg gac	771
	Lys His Asp Ile Ile Gly Glu Val Lys Val Pro Met Asn Thr Val Asp	
	240 245 250	
25		
	ctt ggc cag ccc atc gag gaa tgg aga gac cta caa ggc gga gag aag	819
	Leu Gly Gln Pro Ile Glu Glu Trp Arg Asp Leu Gln Gly Gly Glu Lys	
	255 260 265	
30		
	gaa gag cca gag aag ttg ggt gac atc tgt acc tcc ttg cgc tac gtg	867
	Glu Glu Pro Glu Lys Leu Gly Asp Ile Cys Thr Ser Leu Arg Tyr Val	
	270 275 280	
35		
	ccc aca gct ggg aag ctc acc gtc tgt atc ctg gag gcc aag aac ctg	915
	Pro Thr Ala Gly Lys Leu Thr Val Cys Ile Leu Glu Ala Lys Asn Leu	
	285 290 295 300	
40		
	aag aag atg gac gta ggg ggc ctt tca gac ccc tat gtg aag atc cac	963
	Lys Lys Met Asp Val Gly Gly Leu Ser Asp Pro Tyr Val Lys Ile His	
	305 310 315	
45		
	ctg atg cag aac ggt aag aga ctc aag aag aag aag acg aca gtg aag	1011
	Leu Met Gln Asn Gly Lys Arg Leu Lys Lys Lys Lys Thr Thr Val Lys	
	320 325 330	
50		
	aag aag acc ctg aac ccc tac ttc aac gag tcc ttc agc ttc gag atc	1059
	Lys Lys Thr Leu Asn Pro Tyr Phe Asn Glu Ser Phe Ser Phe Glu Ile	
	335 340 345	
55		
	ccc ttt gag cag atc cag aaa gtc cag gtg gtc gtc acc gtg cta gac	1107
	Pro Phe Glu Gln Ile Gln Lys Val Gln Val Val Val Thr Val Leu Asp	
	350 355 360	
60		
	tac gac aaa ctg ggc aag aat gaa gcc atc gga aag atc ttt gta ggc	1155
	Tyr Asp Lys Leu Gly Lys Asn Glu Ala Ile Gly Lys Ile Phe Val Gly	
	365 370 375 380	
65		
	agc aac gcc aca ggc acc gag ttg cgg cac tgg tcc gac atg ctg gcc	1203
	Ser Asn Ala Thr Gly Thr Glu Leu Arg His Trp Ser Asp Met Leu Ala	
	385 390 395	
70		
	aac cct cgg agg ccc att gcc cag tgg cac tct ctt aag cct gag gaa	1251
	Asn Pro Arg Arg Pro Ile Ala Gln Trp His Ser Leu Lys Pro Glu Glu	
	400 405 410	
75		
	gaa gtg gat gct ctt ctg ggc aag aac aag tag gctccagcgg ccggtgccac	1304

# ES 2 333 319 T3

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

5 gcccctaagg agccaagccc ccgaggcgcc acgccccctg aggacactga cgagatccag 1364  
agctatcaat acctcagtta cgcgacctta gaggtttctt catttgtttg cgggtgtgtcc 1424  
10 tgttttttctt tccttttttct ctttttaaaag accaacttcc ttttggtggc tgtgtgaaga 1484  
gagtccocta agaggtgaaa gaaaagcctg gctctgttat tgtccccgga gcggtccttg 1544  
15 ttgcatgccc tttcacggtt tcccccttac cccaagtggg gccctctact gtcagacagt 1604  
tgaagcacta actgcttttc ctgggttttg gaccaacaac atggcaagca cattctgttt 1664  
cttgactgtg aaggcaacat agtggccagc attgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 1724  
20 tatgtgtgtg tgtacacctg tatgtgccc tccatcccca cctgcctgtt ttgaacatct 1784  
ctcttcattt tctggaatga gtcattggaca gtgaagccat gtgagaggag aatgtcttca 1844  
25 gagactocaa gggaaagcaa gcccaactgcc 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 5 10 15  
40 Thr Thr Thr Ala Thr Met Pro Leu Ala Pro Val Ala Pro Ala Asp Asn  
20 25 30  
45 Ser Thr Glu Ser Thr Gly Pro Gly Glu Ser Gln Glu Asp Met Phe Ala  
35 40 45  
Lys Leu Lys Glu Lys Phe Phe Asn Glu Ile Asn Lys Ile Pro Leu Pro  
50 55 60  
Pro Trp Ala Leu Ile Ala Met Ala Val Val Ala Gly Leu Leu Leu Leu  
65 70 75 80  
55 Thr Cys Cys Phe Cys Ile Cys Lys Lys Cys Cys Cys Lys Lys Lys Lys  
85 90 95  
60 Asn Lys Lys Glu Lys Gly Lys Gly Met Lys Asn Ala Met Asn Met Lys  
100 105 110  
65 Asp Met Lys Gly Gly Gln Asp Asp Asp Ala Glu Thr Gly Leu Thr  
115 120 125

# ES 2 333 319 T3

Glu Gly Glu Gly Glu Gly Glu 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 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

10 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  
 20 <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 cggtgtgggc tgggtggagaa ggcagcggga gtctgcccgc ccgaagtcca 60  
 45 ggtccctct tcccactccc gcgcgggcca gcgctgcggc tccoctctgc 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

55 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  
 20 25 30

60 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

65 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

70 tgg gct ctg att gcc atg gcc gtg gtt gct ggc ctc ctg ctg ctc acc 357

# ES 2 333 319 T3

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

# 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 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 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 gcccagagg Leu Gly Lys Asn Lys 420			1413
40	acactgacga gctccagagc tatcaatacc tcagttatgc gaccttagag gtttcttcat ttgtttgcgg tgtgtcctgt tttcctttcc tttttctttt ttgtctttt taaaaaccaa			1473 1533
45	cttcottttg gtggctatgt gaagaggccc ctaagacgtg aaagagaagc ctggctctgt tattgtccca ggagctgtcc ttgttgcatt ccttatcacg gtggccctc accccaagtg			1593 1653
50	gggccctcta ctgtcagagt ggaagcactt cctgcttttc ctgggttttg gaccaacaaa gtggcaagca cattctgtgt ctgcactgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg			1713 1773
55	tgtgtgtgtg tgtgtgtgta cacgtgtgcc catccatccc caccttgccct ctgtttggaa tatctcttcg tttctggaat gagtcacgga caatgatgcc gtgtgagaga ggaaagtctt			1833 1893
60	caggtactcc gaggtgagga gagcccactg cttaagtggg cagaggccag aagctctcat agtcctttgcg aaaggccatt tggaagacgc aagatgtgat actggatgta ttccgaacta			1953 2013
65	ggaccaaagg cttgatgcc tcccagactc cctcttgtca gtcattggctt ccccaggagt ggggcttttg gatcattcat gaaaataaac tatttactcg actggtcgga ttccagccagg			2073 2133
	gaccgccagc tccaggatgt cattcttgtt gacgacatca aactttgaag aaacagaagt cccattactc agctctggat ctttgccctcg tccagtggga ggcagatgct tectccctct			2193 2253
	gcagagtaca agcagtgcgt tcatttgcat tcacgcacca tctgcttttg cctctgtttc cctttttgtg taagtggaaa aataccatct gacgataagt gctttgcaca gagccagaga			2313 2373

# ES 2 333 319 T3

```

cctattagag ggatgcttgg gtgtttagtt cccttgaggt ccaggtaagg aggaggtgtc 2433
aagaagggga gcgttggtgg acagtgacaa gctagacatt gcagagctcc tcacaactcc 2493
5  tattcctgac cctctggacc ctttgaccct cagtgatggt agccggagta gcccaggcag 2553
accttaggag aggccccgtc ctcccttcc ttagacagtt ttctcagaat gccaggaaac 2613
10 acagcgcatt catttcagat gggtggtgga gaaaatgtgc taaggtttgc accctatggt 2673
cggaattc 2681

15 <210> 9
    <211> 422
    <212> PRT
20 <213> Rattus norvegicus
    <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 Leu
   65          70          75          80

50 Thr Cys Cys Phe Cys Ile Cys Lys Lys Cys Cys Cys Lys Lys Lys Lys
   85          90          95

55 Asn Lys Lys Glu Lys Gly 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 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 Glu Val Asp Ala

# ES 2 333 319 T3

405

410

415

5           Leu Leu Gly Lys Asn Lys  
                    420

<210> 10  
10 <211> 419  
    <212> PRT  
    <213> *Homo sapiens*

15 <220>  
    <221> MISC\_FEATURE  
    <222> (37)..(57)  
    <223> Dominio de unión a BoNT/B

20 <220>  
    <221> MISC\_FEATURE  
    <222> (58)..(84)  
25 <223> Dominio de unión a gangliósidos o dominio transmembrana

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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