



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 984 635**

⑮ Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/0793 (2010.01)
C12Q 1/37 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2017 PCT/KR2017/005420**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **30.11.2017 WO17204561**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2017 E 17803080 (5)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024 EP 3438267**

⑤ Título: **Polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido que comprende un resto informador, un resto sustrato y un resto de desestabilización, una célula hospedera que lo comprende y su uso**

⑩ Prioridad:

24.05.2016 KR 20160063722

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.10.2024

⑦ Titular/es:

**MEDYTOX INC. (100.0%)
78, Gangni 1-gil Ochang-eup Cheongwon-
gu Cheongju-si
Chungcheongbuk-do 28126, KR**

⑦ Inventor/es:

**JUNG, HYUN HO;
YANG, GI HYEOK;
LEE, JUN HO;
LEE, DONG KYU y
LEE, YOUNG RAE**

⑦ Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 984 635 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

5 Polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido que comprende un resto informador, un resto sustrato y un resto de desestabilización, una célula hospedera que lo comprende y su uso

10 La presente descripción se refiere a un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido que incluye un resto informador, un resto sustrato y un resto de desestabilización, una célula hospedera que incluye al mismo y un método para medir el nivel de actividades de proteasa usadas por el polinucleótido recombinante mediante el uso del mismo.

15 10 Antecedentes de la invención y la técnica

Las proteasas son enzimas que realizan la proteólisis. Las proteasas degradan los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos entre sí en cadenas polipeptídicas mediante hidrólisis. Las proteasas pueden incluir neurotoxinas. Clostridium botulinum y Clostridium tetani producen neurotoxinas muy potentes, por ejemplo, la toxina botulínica (BONT) y la toxina tetánica (TeNT). Estas neurotoxinas clostridiales se unen específicamente a las células neuronales e inhiben la liberación de neurotransmisores. Algunas proteasas, como las neurotoxinas, no solo tienen una toxicidad muy fuerte, sino que también están presentes en cantidades muy pequeñas. En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar un método para medir su actividad de forma segura y precisa.

20 20 La solicitud internacional WO 03/065012 publicada el 7 de agosto de 2003 propone un ensayo de selección para identificar compuestos para la prevención y mejora de la enfermedad de Alzheimer con el fin de desarrollar inhibidores de BACE, que es una proteasa asociada con la enfermedad de Alzheimer. Para alcanzar este objetivo, esta solicitud internacional propone un polipéptido que comprende tres dominios, el primer dominio incluye un péptido señal de retención de Golgi o una señal de retención del retículo endoplasmático, el segundo dominio presenta dos o más sitios de escisión de proteasa y el tercer dominio incluye una molécula informadora.

25 30 Un aspecto de la invención proporciona un polinucleótido recombinante que incluye un primer polinucleótido que codifica un polipéptido que incluye: un resto informador; un resto de desestabilización; y un resto sustrato que une operativamente el resto informador al resto de desestabilización, en donde el resto sustrato incluye un sitio de escisión de actividad proteasa, siendo este polinucleótido recombinante como se define en el conjunto de reivindicaciones.

35 35 Otro aspecto de la invención proporciona una célula hospedera que contiene el polinucleótido recombinante.

40 40 Otro aspecto que no forma parte de la invención proporciona un kit para determinar actividades proteolíticas de un polipéptido de proteasa, el kit incluye un polipéptido codificado por el polinucleótido recombinante descrito anteriormente, y un agente de detección que mide señales emitidas por un resto informador, un informador estándar interno, o un producto del mismo.

45 45 Otro aspecto que no forma parte de la invención proporciona un kit para determinar actividades proteolíticas de un polipéptido de proteasa, el kit incluye una célula hospedera que incluye el polinucleótido recombinante descrito anteriormente, y un agente de detección que mide señales emitidas por un resto informador, un informador estándar interno, o un producto del mismo.

50 50 Otro aspecto que no forma parte de la invención proporciona un método para determinar las actividades de proteasa de un polipéptido de proteasa en una muestra, el método incluye: poner en contacto un polipéptido codificado por el polinucleótido recombinante con una muestra que se sospecha que contiene un polipéptido de proteasa; y medir señales emitidas por el resto informador o un producto del mismo en un producto obtenido por el contacto.

55 55 Otro aspecto de la invención proporciona un método para determinar las actividades de proteasa de un polipéptido de neurotoxina en una muestra, el método incluye: poner en contacto la célula hospedera con una muestra que se sospecha que contiene un polipéptido de neurotoxina; y medir señales emitidas por el resto informador en un producto obtenido por el contacto.

60 60 Otro aspecto que no forma parte de la invención proporciona un método para determinar las características del polipéptido de proteasa en una muestra, el método incluye poner en contacto un polipéptido codificado por el polinucleótido recombinante con el polipéptido de proteasa; medir señales emitidas por el resto informador o producto del mismo en un producto obtenido por el contacto; y determinar, en base a señales medidas, una o más seleccionadas entre un tiempo de inicio de emisión de las señales y una duración de las mismas.

65 65 Otro aspecto que no forma parte de la invención proporciona un método para determinar las características del polipéptido de proteasa en una muestra, el método incluye poner en contacto la célula hospedera con el polipéptido de proteasa; medir señales emitidas por un resto informador, un informador estándar interno, o un producto del mismo en un producto obtenido por el contacto; y determinar, en base a señales medidas, una o más seleccionadas entre un tiempo de inicio de emisión de las señales y una duración de las mismas.

Solución técnica

Un primer aspecto de la invención proporciona un polinucleótido recombinante que incluye un primer polinucleótido que codifica un polipéptido que incluye: un resto informador; un resto de desestabilización; y un resto sustrato que une operativamente el resto informador al resto de desestabilización, en donde el resto sustrato incluye un sitio de escisión de actividad proteasa, siendo este polinucleótido recombinante como se define en el conjunto de reivindicaciones.

Respecto al polinucleótido recombinante, el resto informador es un material que emite una señal detectable o libera un material que emite una señal detectable en una reacción catalizada de esta manera (en lo sucesivo también denominado "producto"). El resto informador se selecciona entre una proteína fluorescente, β -lactamasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, cloranfenicol acetiltransferasa, β -glucuronidasa, peroxidasa y luciferasa. La proteína de fluorescencia puede seleccionarse entre proteína GFP, YFP, Citrina, CFP, RFP, Kaede, PA-GFP, Emerald, Venus, DsRed, mHoneydew, mBanana, mOrange, tdTomato, mTangerine, mStrawberry, mCherry, mRasberry, mPlum, ZsGreen y ZsYellow.

Con respecto al polinucleótido recombinante, el resto de desestabilización se caracteriza por reducir la expresión intracelular del primer polinucleótido en las células en comparación con cuando el resto de desestabilización está ausente. La expresión es una expresión a nivel de ARNm o a nivel de proteína. El resto de desestabilización promueve la degradación del ARNm o la proteína expresada intracelularmente por el primer polinucleótido en las células. El resto de desestabilización puede ser PEST, CL1 o una proteína de fusión de PEST y CL1.

La proteasa puede tener su origen en bacterias. Las bacterias pueden ser del género Clostridium. La proteasa es un polipéptido de neurotoxina. La proteasa es una endoproteasa. El polipéptido de la neurotoxina es una toxina botulínica de serotipo A (BoNT/A), BoNT/B, BoNT/C, BoNT/D, BoNT/CD, BoNT/DC, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/FA, BoNT/G, neurotoxina tetánica (TeNT). La proteasa escinde un sitio de escisión en el resto sustrato. El sitio de escisión es un sitio reconocido y escindido por la proteasa. Se conocen una secuencia de aminoácidos de cada uno de estos serotipos de toxina botulínica y un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de cada uno de estos serotipos de toxina botulínica y el polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, aquellos que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 1-14 descritas en el documento WO2004-031355.

El sitio de escisión es un sustrato peptídico que puede escindirse en un sitio de escisión específico mediante una proteasa. El sitio de escisión es un sitio de escisión que es reconocido y escindido por proteasas endógenas de neurotoxina. El sitio de escisión de la neurotoxina puede ocurrir naturalmente o crearse artificialmente. El sitio de escisión de la neurotoxina puede derivarse de una proteína que es reconocida y escindida, por ejemplo, por la proteasa BoNT/A o la proteasa BoNT/E. La proteína puede ser SNAP-25, una isoforma de la misma, un parálogo o un ortólogo. SNAP-25 puede derivarse de un ser humano, una rata, un ratón, bovino, danio, carassius, xenopus, torpedo, strongylocentrotus, loligo, lymnaea o aplysia. SNAP-25 puede ser SNAP-25A o SNAP-25B.

En una modalidad, el sitio de escisión de la neurotoxina puede derivarse de una proteína que es reconocida y escindida, por ejemplo, por la proteasa BoNT/B, la proteasa BoNT/D, la proteasa BoNT/F o la proteasa BoNT/G. La proteína puede ser VAMP, una isoforma de la misma, un parálogo o un ortólogo. La proteína VAMP, una isoforma de la misma, un parálogo o un ortólogo puede ser, por ejemplo, VAMP-1 humana o de ratón, VAMP-2, VAMP-3/celubravina, VAMP-2 bovino, VAMP-2 de rata o VAMP-3, VAMP-1 de pollo, VAMP-2 o VAMP-3, Torpedo VAMP-1, Strongylocentrotus VAMP, Drosophila sybA, synB, sync, synD o syn, Hirudo VAMP, Xenopus VAMP-2 o VAMP-3, Canio VAMP-1 o VAMP-2, Loligo VAMP, Lymnaea VAMP, Aplysia VAMP o Caenorhabditis similar a SNB1.

El sitio de escisión de la neurotoxina puede derivarse de una proteína que es reconocida y escindida, por ejemplo, por la proteasa BoNT/C. La proteína puede ser sintaxina o un ortólogo, parálogo u homólogo de la misma. La proteína puede ser, por ejemplo, sintaxina 1A humana o de ratón, sintaxina 1B1, sintaxina 2-1, sintaxina 2-2, sintaxina 2-3, sintaxina 3A o sintaxina 1B2, sintaxina 1A bovina o de rata, sintaxina 1B1 o sintaxina 1B2, sintaxina 2 de rata o sintaxina 3 de rata, sintaxina 1A de ratón, sintaxina 1B1, sintaxina 1B2, sintaxina 2, sintaxina 3A, sintaxina 3B o sintaxina 3C, sintaxina 1A o sintaxina 2 de pollo; sintaxina 1A o sintaxina 1B de Xenopus, sintaxina 1A de Danio, sintaxina 1B o sintaxina 3, sintaxina 1A o sintaxina 1B de Torpedo, sintaxina 1A o sintaxina 1B de Strongylocentrotus, sintaxina 1A o sintaxina 1B de Drosophila, sintaxina 1A o sintaxina 1B de Hirudo, sintaxina 1A o sintaxina 1B de Loligo, sintaxina 1A o sintaxina 1B de Lymnaea, o un ortólogo, parálogo u homólogo de los mismos.

El polinucleótido recombinante puede contener una secuencia reguladora que permita que el primer polinucleótido se exprese en una célula. El polinucleótido recombinante puede ser un polinucleótido recombinante expresable. La secuencia reguladora puede ser un promotor, un potenciador, una secuencia terminadora o una combinación de los mismos. La célula puede unirse e internalizarse en la proteasa.

Con respecto al polinucleótido recombinante, la proteasa es un polipéptido de neurotoxina, y la célula puede sufrir unión al polipéptido de neurotoxina, internalización de la neurotoxina, liberación de la neurotoxina dentro de la célula o una combinación de la unión, la internalización y la liberación. Las células pueden ser células capaces de ser

intoxicadas por la neurotoxina del género Clostridium. El polipéptido de la neurotoxina es una toxina botulínica de serotipo A (BoNT/A), BoNT/B, BoNT/C, BoNT/D, BoNT/CD, BoNT/DC, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/FA, BoNT/G o la neurotoxina tetánica (TeNT). La célula puede ser una célula endocrina o similar. La célula puede ser una neurona primaria, una célula de neuroblastoma o una neurona diferenciada de una célula madre pluripotente.

- 5 El polinucleótido recombinante puede ser un vector. El vector puede ser un vector de expresión. El vector puede ser un vector viral, un vector plasmídico o una construcción de ácido nucleico lineal.
- 10 10 El polinucleótido recombinante puede incluir además una secuencia bicistrónica unida aguas arriba o aguas abajo del primer polinucleótido. La secuencia bicistrónica puede ser una secuencia de nucleótidos que permite la traducción independiente de la capucha 5'. La secuencia bicistrónica puede ser una secuencia de nucleótidos que permite a un ribosoma sintetizar dos o más polipéptidos a partir de un ARNm con una capucha 5' durante la traducción para sintetizar un polipéptido a partir de ARNm. La secuencia bicistrónica puede ser una secuencia del sitio de entrada ribosómica interna (IRES) o una secuencia de nucleótidos que permite que el ribosoma omita la formación de un enlace peptídico. La secuencia bicistrónica que permite que el ribosoma se salte la formación de enlaces peptídicos puede ser una secuencia polinucleotídica (por ejemplo, las SEQ ID NO: 5, 19, 21 o 23) que codifica P2A, T2A, E2A o F2A (por ejemplo, las SEQ ID NO: 13, 20, 22 o 24).
- 15 15 El polinucleótido recombinante puede incluir además un polinucleótido que codifica un informador estándar interno unido operativamente aguas arriba o aguas abajo de la secuencia bicistrónica. El informador estándar interno es diferente del resto informador. El informador estándar interno es un material que emite una señal detectable o un material que se convierte en un material que emite una señal detectable en una reacción catalizada de esta manera. El informador estándar interno se selecciona entre una proteína fluorescente, β -lactamasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, cloranfenicol acetiltransferasa, β -glucuronidasa, peroxidasa y luciferasa. La proteína de fluorescencia puede seleccionarse entre proteína GFP, YFP, Citrina, CFP, RFP, Kaede, PA-GFP, Emerald, Venus, DsRed, mHoneydew, mBanana, mOrange, tdTomato, mTangerine, mStrawberry, mCherry, mRasberry, mPlum, ZsGreen y ZsYellow.
- 20 20 La Figura 1 muestra una vista que ilustra la estructura de un polinucleótido recombinante de acuerdo con un aspecto. Con referencia a y B de la Figura 1, R representa una secuencia de nucleótidos que codifica un resto informador, S representa una secuencia de nucleótidos que codifica un resto sustrato y D representa una secuencia de nucleótidos que codifica un resto de desestabilización. Con referencia a B de la Figura 1, I representa una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia bicistrónica. En la Figura 1, el polinucleótido recombinante se describe de izquierda a derecha en el orden 5'→ 3'. Como se muestra en A de la Figura 1, el polinucleótido recombinante tiene la estructura de R-S-D. En una o más modalidades, el polinucleótido recombinante puede incluir además una S adicional entre R y D para codificar al menos dos, por ejemplo, al menos tres o cuatro restos sustrato. En una o más modalidades, el polinucleótido recombinante puede incluir además dos o más estructuras D, por ejemplo, al menos tres o cuatro restos de desestabilización. Como se muestra en A de la Figura 1, el polinucleótido recombinante tiene la estructura de I-B-R-S-D. Sin embargo, esta estructura es solo un ejemplo. En una o más modalidades, el polinucleótido recombinante puede incluir además una estructura I-B adicional unida a la posición 5' para codificar al menos dos, por ejemplo, al menos tres o cuatro informadores estándar internos. El polinucleótido recombinante puede tener la estructura de R-S-D-B-I. Sin embargo, esta estructura es solo un ejemplo. En una o más modalidades, el polinucleótido recombinante puede incluir además una estructura -B-I- adicional unida a la posición 3' para contener la secuencia de nucleótidos que codifica al menos dos, por ejemplo, al menos tres o cuatro informadores estándar internos.
- 25 25 La Figura 2 muestra la estructura de un polinucleótido recombinante de acuerdo con un aspecto y una reacción entre un polipéptido expresado de esta manera y una proteasa. Con referencia a la Figura 2, el polipéptido expresado por el polinucleótido recombinante de acuerdo con un aspecto se escinde en el sitio de escisión de un resto sustrato en presencia de una proteasa y se fragmenta en un fragmento de resto informador y el resto.
- 30 30 La Figura 3 muestra un caso en el que un polinucleótido recombinante de acuerdo con un aspecto contacta con una proteasa en una célula. Con referencia a la Figura 3, el polipéptido expresado por el polinucleótido recombinante de acuerdo con un aspecto se escinde en el sitio de escisión de un resto sustrato en presencia de una proteasa y se fragmenta en un fragmento de resto informador y el resto.
- 35 35 Como se ilustra en la Figura 3, cuando se transfecta una proteasa en una célula (arriba), un polipéptido que tiene la estructura R-S-D se escinde en el sitio S y, por lo tanto, el resto informador se separa del resto de desestabilización (D) y se estabiliza en comparación con cuando se transfecta el resto de desestabilización (D). En consecuencia, las señales emitidas por el resto informador o un material derivado del mismo son más fuertes que cuando se transfecta el resto de desestabilización (D). La parte inferior de la Figura 3 muestra que cuando una proteasa no está presente en la célula, el polipéptido que tiene la estructura R-S-D retiene el resto de desestabilización (D) y, por tanto, el nivel del polipéptido que tiene la estructura RSD se reduce mediante el resto de desestabilización (D) y, en consecuencia, también se reduce una señal medida a partir del mismo.

La Figura 4 muestra una vista que muestra un caso en el que un polinucleótido recombinante que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un informador estándar interno de acuerdo con un aspecto está en contacto con una proteasa en una célula. Con referencia a la Figura 4, el polipéptido expresado por el polinucleótido recombinante de acuerdo con un aspecto se escinde en el sitio de escisión de un resto sustrato en presencia de una proteasa y se fragmenta en un fragmento de resto informador y el resto.

Como se ilustra en la Figura 4, cuando se transfecta una proteasa en una célula (A), un polipéptido que tiene la estructura R-S-D se escinde en el sitio S y, por lo tanto, el resto informador se separa del resto de desestabilización (D) y se estabiliza en comparación con cuando se transfecta el resto de desestabilización (D). En consecuencia, las señales emitidas por el resto informador o un material derivado del mismo son más fuertes que cuando se transfecta el resto de desestabilización (D). La parte inferior (B) de la Figura 4 muestra que cuando una proteasa no está presente en la célula, el polipéptido que tiene la estructura R-S-D retiene el resto de desestabilización (D) y, por tanto, el nivel del polipéptido que tiene la estructura RSD se reduce mediante el resto de desestabilización (D) y, en consecuencia, también se reduce una señal medida a partir del mismo. En la Figura 4, la proteína informadora estándar interna expresada a partir del polinucleótido recombinante se expresa en células independientemente de la presencia o ausencia de proteasa. Por otro lado, el polipéptido R-S-D se sintetiza mediante traducción independiente de la capucha 5' mediante la secuencia bicistrónica. Por tanto, las señales emitidas desde el informador estándar interno pueden usarse para estandarizar las condiciones para la expresión del polinucleótido recombinante en una célula hospedera.

Un segundo aspecto proporciona una célula hospedera que contiene el polinucleótido recombinante. La célula hospedera puede ser capaz de translocar la proteasa al interior de la célula, por ejemplo, al citoplasma. La célula hospedera puede ser una célula que puede translocar una proteasa que es un polipéptido de neurotoxina a una célula, por ejemplo, al citoplasma. La célula hospedera puede unirse, por ejemplo, a una proteasa a través de un receptor y translocar un complejo formado de esta manera a una célula, por ejemplo, al citoplasma. Sin embargo, las modalidades de la presente descripción no deben considerarse limitadas a ningún mecanismo de translocación particular. La célula hospedera puede ser una célula capaz de expresar un polinucleótido que codifica una proteasa que es un polipéptido de neurotoxina con actividad proteolítica en el citoplasma. La célula hospedera puede incluir un polinucleótido que codifica una proteasa que es un polipéptido de neurotoxina con actividad proteolítica en el citoplasma. El polinucleótido que codifica una proteasa que es un polipéptido de neurotoxina con actividad proteolítica puede insertarse en un cromosoma o transfectarse extracromosómicamente. El polinucleótido que codifica una proteasa que es un polipéptido de neurotoxina con actividad proteolítica puede expresarse de forma transitoria o permanente. El polinucleótido que codifica una proteasa que es un polipéptido de neurotoxina con actividad proteolítica puede estar en su propia forma o en una forma incrustada en un vehículo tal como un vector. El polinucleótido puede introducirse desde fuera de la célula hospedera. La célula hospedera puede ser una célula recombinante. La célula hospedera puede ser una célula endocrina. La célula puede seleccionarse de una neurona primaria, una célula de neuroblastoma y una neurona diferenciada de una célula madre pluripotente.

La célula hospedera puede ser capaz de expresar el polinucleótido recombinante. La célula hospedera puede expresar, a partir del polinucleótido recombinante, un polipéptido que incluye un resto informador, un resto de desestabilización y un resto sustrato que une operativamente el resto de desestabilización al resto informador, en donde el resto sustrato tiene un sitio de escisión de una proteasa, o el polipéptido y la proteína informadora estándar interna.

Un tercer aspecto que no forma parte de la invención proporciona un kit para determinar actividades proteolíticas de una proteasa, por ejemplo, un polipéptido de neurotoxina, el kit incluye un polipéptido codificado por el polinucleótido recombinante descrito anteriormente, y un agente de detección que mide señales emitidas por un resto informador, un informador estándar interno, o un producto del mismo. Con respecto al kit, el informador puede ser luciferasa, el kit puede incluir además un sustrato de luciferasa y el agente de detección puede usarse para medir la conversión enzimática del sustrato de luciferasa. Por ejemplo, el agente de detección puede ser un fotodetector. El informador puede ser una proteína de fluorescencia y el agente de detección puede usarse para medir la fluorescencia emitida por la proteína de fluorescencia. Por ejemplo, el agente de detección puede ser un dispositivo que excite la proteína de fluorescencia con luz de excitación y mida la fluorescencia emitida. El informador estándar interno puede ser diferente del resto informador. El informador interno estándar puede ser una luciferasa o una proteína fluorescente, donde cada uno de ellos es diferente del resto informador.

Un cuarto aspecto que no forma parte de la invención proporciona un kit para determinar actividades proteolíticas de una proteasa, por ejemplo, un polipéptido de neurotoxina, el kit incluye una célula hospedera que incluye el polinucleótido recombinante descrito anteriormente, y un agente de detección que mide señales emitidas por un resto informador, un informador estándar interno, o un producto del mismo. Con respecto al kit, el informador puede ser luciferasa, el kit puede incluir además un sustrato de luciferasa y el agente de detección puede usarse para medir la conversión enzimática del sustrato de luciferasa. El informador puede ser una proteína de fluorescencia y el agente de detección puede usarse para medir la fluorescencia emitida por la proteína de fluorescencia. Por ejemplo, el agente de detección puede ser un dispositivo que excite la proteína de fluorescencia con luz de excitación y mida la fluorescencia emitida. El informador estándar interno puede ser diferente del resto informador. El informador

interno estándar puede ser una luciferasa o una proteína fluorescente, donde cada uno de ellos es diferente del resto informador.

- 5 Un quinto aspecto que no forma parte de la presente invención proporciona un método para determinar las actividades de proteasa en una muestra, el método incluye: poner en contacto un polipéptido codificado por el polinucleótido recombinante con una muestra que se sospecha que contiene un polipéptido de proteasa; y medir señales emitidas por el resto informador o un producto del mismo en un producto obtenido por el contacto.
- 10 Un sexto aspecto que no forma parte de la presente invención proporciona un método para determinar las características de un polipéptido de proteasa en una muestra, el método incluye poner en contacto un polipéptido codificado por el polinucleótido recombinante con un polipéptido de proteasa; medir señales emitidas por el resto informador o producto del mismo en un producto obtenido por el contacto; y determinar, en base a señales medidas, una o más seleccionadas entre un tiempo de inicio o señal de emisión y un tiempo de duración de la emisión de la señal.
- 15 Los métodos de acuerdo con los aspectos 5to y 6to que no forman parte de la invención incluyen cada uno de ellos poner en contacto el polipéptido codificado por el polinucleótido recombinante con una muestra que se sospecha que contiene un polipéptido de proteasa o una proteasa. El contacto puede llevarse a cabo en condiciones que permitan que se degrada el sitio de escisión de las actividades de proteasa en el polipéptido a degradar. La proteasa puede ser un polipéptido de neurotoxina.
- 20 El contacto puede realizarse en un medio líquido. El medio líquido puede acondicionarse para permitir que funcione la actividad proteolítica de la proteasa. Las condiciones pueden incluir pH, temperatura, un cofactor, una concentración de sal y una combinación de estos. El medio líquido puede ser una solución tampón tal como una solución salina tamponada con fosfato (PBS).
- 25 Los métodos de acuerdo con los aspectos 5to y 6to que no forman parte de la invención incluyen medir señales emitidas por el resto informador o un producto del mismo en un producto obtenido por el contacto. Cuando el resto informador es un polipéptido que emite una señal detectable, las señales pueden medirse directamente. Por ejemplo, cuando el resto informador es una proteína fluorescente tal como la GFP, puede medirse la fluorescencia. La medición de la fluorescencia puede realizarse al irradiar el producto obtenido mediante el contacto con luz de excitación y al medir la luz emitida por el producto obtenido por el contacto. La longitud de onda de la luz de excitación y de la luz de emisión puede seleccionarse apropiadamente de acuerdo con la proteína de fluorescencia seleccionada. Cuando el resto informador es un polipéptido que se convierte en un material que emite una señal detectable en una reacción catalizada por el resto informador, el método puede incluir además añadir un sustrato requerido para la actividad catalítica del resto informador al producto obtenido por el contacto para convertir el material en un material que emita una señal detectable. A continuación, se mide una señal emitida por un material que emite una señal detectable. Por ejemplo, el resto informador es luciferasa, y el contacto y la medición de una señal pueden realizarse para añadir un sustrato de luciferasa en la solución de reacción, y la detección se realiza para medir la conversión enzimática del sustrato de luciferasa. El sustrato de luciferasa puede ser luciferina.
- 30 Los métodos de acuerdo con los aspectos 5to y 6to que no forman parte de la invención pueden incluir cada uno además comparar la señal medida con una señal emitida por un grupo control. El grupo control puede medirse con el mismo procedimiento, excepto que una muestra usada no incluye proteasa, por ejemplo, polipéptido de neurotoxina o incluye una concentración conocida de proteasa, por ejemplo, polipéptido de neurotoxina. Cada uno de los métodos puede incluir además determinar el nivel de proteasa en una muestra en base a la correlación entre una señal obtenida mediante la comparación y el nivel de proteasa en la muestra.
- 35 Los métodos de acuerdo con un 6to aspecto que no forma parte de la invención incluye determinar al menos uno de un tiempo de inicio de la emisión de la señal y un tiempo de duración de la emisión de la señal en base a la señal medida. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente al menos uno de un tiempo de inicio de la emisión de la señal y una duración de la emisión de la señal en base a las señales medidas. Por ejemplo, un experto en la técnica puede determinar un tiempo de inicio de la emisión y una duración del tiempo, en base a valores de señal que representan actividades de proteasa a lo largo del tiempo, por ejemplo, señales emitidas. Los valores de señal que representan actividades de proteasa a lo largo del tiempo pueden determinar un tiempo de inicio de la emisión y un tiempo de duración, en base a los valores medidos de las señales emitidas a lo largo del tiempo. Al menos uno de un tiempo de inicio de la emisión de la señal y una duración de la emisión de la señal puede depender de los tipos de proteasa. Cuando el resto informador es un polipéptido que emite una señal detectable, la degradación del sitio de escisión por actividades de proteasa puede conducir a un aumento de la señal emitida y una disminución de la señal emitida cuando desaparecen las actividades de proteasa. Por ejemplo, cuando se mide en las mismas condiciones, al menos uno del tiempo de inicio de la señal y el tiempo de duración de la señal puede cambiarse en dependencia de las características de la proteasa. En una modalidad, la proteasa puede distinguirse de otras proteasas en términos de, además de esta comparación relativa, el valor absoluto de al menos uno del tiempo de inicio de la emisión de la señal y el tiempo de duración de la señal, o un intervalo de los mismos. Por tanto, la determinación puede incluir comparar al menos uno del tiempo de inicio de la emisión de la señal y el tiempo de duración de la señal de una proteasa conocida, o determinar las características de una proteasa en base a un valor
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

absoluto de al menos uno de los tiempos de inicio de la emisión de la señal y el tiempo de duración de la señal o un intervalo de los mismos. De acuerdo con al menos uno del tiempo de inicio de la emisión de la señal y el tiempo de duración de la señal, la indicación a tratar con la proteasa puede variar. Por tanto, cada uno de los métodos puede incluir determinar una indicación a tratar en un sujeto con la proteasa, en base a las características determinadas de la proteasa.

5 Un séptimo aspecto que no forma parte de la invención proporciona un método para determinar las actividades proteolíticas de un polipéptido de neurotoxina en una muestra, el método incluye: poner en contacto la célula hospedera con una muestra que se sospecha que contiene un polipéptido de neurotoxina; y medir señales emitidas por el resto informador en un producto obtenido por el contacto.

10 Un octavo aspecto que no forma parte de la invención proporciona un método para determinar las características del polipéptido de proteasa en una muestra, el método incluye poner en contacto la célula hospedera con el polipéptido de proteasa; medir señales emitidas por el resto informador, el informador estándar interno, o producto del mismo en un producto obtenido por el contacto; y determinar, en base a señales medidas, una o más seleccionadas entre un 15 tiempo de inicio de emisión de las señales y una duración de las mismas.

20 El método de acuerdo con el 7mo aspecto incluye poner en contacto la célula hospedera con una muestra que se sospecha que contiene un polipéptido de neurotoxina. El contacto puede llevarse a cabo en condiciones que permitan que se degrada el sitio de escisión de una proteasa. La proteasa es un polipéptido de neurotoxina. El contacto puede realizarse en un medio líquido. El medio líquido puede acondicionarse para permitir que funcione la actividad proteolítica del polipéptido de neurotoxina. Las condiciones pueden incluir pH, temperatura, un cofactor, una concentración de sal y una combinación de estos. El medio líquido puede ser una solución tampón tal como una 25 solución salina tamponada con fosfato (PBS), o un medio en el que se cultiva la célula hospedera.

25 Con respecto al método de acuerdo con el 7mo aspecto, la célula hospedera puede ser capaz de translocar el polipéptido de neurotoxina al interior de la célula, por ejemplo, al citoplasma. La célula hospedera puede ser una célula que puede translocar una proteasa que es un polipéptido de neurotoxina a una célula, por ejemplo, al citoplasma. La célula hospedera puede unirse, por ejemplo, a un polipéptido de neurotoxina a través de un receptor 30 y translocar un complejo formado de esta manera a una célula, por ejemplo, al citoplasma. Sin embargo, las modalidades de la presente descripción no deben considerarse limitadas a ningún mecanismo de translocación particular. La célula hospedera puede ser una célula capaz de expresar un polinucleótido que codifica un polipéptido de neurotoxina con actividad proteolítica en el citoplasma. La célula hospedera puede incluir un polinucleótido que codifica un polipéptido de neurotoxina con actividad proteolítica en el citoplasma. El polinucleótido que codifica un 35 polipéptido de neurotoxina que tiene actividad proteolítica puede insertarse en un cromosoma o puede estar presente fuera de un cromosoma. El polinucleótido que codifica un polipéptido de neurotoxina que tiene actividad proteolítica puede expresarse de forma transitoria o estable. El polinucleótido que codifica un polipéptido de neurotoxina con actividad proteolítica puede estar en su propia forma o en una forma incrustada en un vehículo tal como un vector. El polinucleótido puede introducirse desde fuera de la célula hospedera. La célula hospedera puede 40 ser una célula recombinante. La célula hospedera puede ser una célula endocrina. La célula hospedera puede seleccionarse de una neurona primaria, una célula de neuroblastoma y una neurona diferenciada de una célula madre pluripotente. La célula hospedera puede ser capaz de expresar el polinucleótido recombinante. La célula hospedera puede expresar, a partir del polinucleótido recombinante, un polipéptido que incluye un resto informador, un resto de desestabilización y un resto sustrato que une operativamente el resto de desestabilización al resto 45 informador, en donde el resto sustrato tiene un sitio de escisión de una proteasa, o el polipéptido y la proteína informadora estándar interna.

50 El método de acuerdo con el 7mo aspecto incluye medir señales emitidas por el resto informador o el informador estándar interno o un producto del mismo en un producto obtenido por el contacto. Cuando el resto informador, o el informador estándar interno, es un polipéptido que emite una señal detectable, las señales pueden medirse directamente. Por ejemplo, cuando el resto informador es una proteína fluorescente tal como la GFP, puede medirse la fluorescencia. La medición de la fluorescencia puede realizarse al irradiar el producto obtenido mediante el contacto con luz de excitación y al medir la luz emitida por el producto obtenido por el contacto. La longitud de onda de la luz de excitación y de la luz de emisión puede seleccionarse apropiadamente de acuerdo con la proteína de fluorescencia seleccionada. Cuando el resto informador, o el informador estándar interno, es un polipéptido que se 55 convierte en un material que emite una señal detectable en una reacción catalizada por el resto informador, el método puede incluir además añadir un sustrato requerido para la actividad catalítica del resto informador al producto obtenido por el contacto para convertir el material en un material que emita una señal detectable. A continuación, se mide una señal emitida por un material que emite una señal detectable. Por ejemplo, el resto informador, o el informador estándar interno, es luciferasa, y el contacto y la medición de una señal pueden 60 realizarse para añadir un sustrato de luciferasa en la solución de reacción, y la detección se realiza para medir la conversión enzimática del sustrato de luciferasa. El sustrato de luciferasa puede ser luciferina. Por ejemplo, el resto informador es luciferasa, y el contacto y la medición de una señal pueden realizarse para añadir un sustrato de luciferasa en la solución de reacción, y la detección se realiza para medir la conversión enzimática del sustrato de 65 luciferasa. El sustrato de luciferasa puede ser luciferina.

En el método de acuerdo con el 7mo aspecto, el resto informador puede ser una proteína fluorescente, y la medición puede realizarse para medir la fluorescencia emitida por la proteína fluorescente.

5 El método de acuerdo con el 7mo aspecto puede incluir cada uno además comparar la señal medida con una señal medida a partir de un grupo control. El grupo control puede medirse con el mismo procedimiento, excepto que una muestra usada no incluye un polipéptido de neurotoxina o incluye una concentración conocida del polipéptido de neurotoxina. Cada uno de los métodos puede incluir además determinar el nivel de polipéptido de neurotoxina en una muestra en base a la correlación entre una señal obtenida mediante la comparación y el nivel de neurotoxina en la muestra.

10 De acuerdo con el método de acuerdo con el 7mo aspecto, el polinucleótido recombinante incluye además un polinucleótido que codifica una secuencia bicistrónica unida aguas arriba o aguas abajo de un primer polinucleótido y un informador interno estándar unido operativamente aguas arriba o aguas abajo de la secuencia bicistrónica. En este caso, cada uno de los métodos puede incluir además medir una señal emitida por el informador estándar interno. Cada uno de los métodos puede incluir además determinar el nivel de una señal emitida por el resto informador con relación a la señal emitida por el informador estándar interno.

20 El método de acuerdo con un 8vo aspecto que no forma parte de la invención incluye determinar al menos uno de un tiempo de inicio de la emisión de la señal y un tiempo de duración de la emisión de la señal en base a las señales medidas. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente al menos uno de un tiempo de inicio de la emisión de la señal y un tiempo de duración de la emisión de la señal en base a las señales medidas. Por ejemplo, un experto en la técnica puede determinar valores de señal que representan actividades de proteasa a lo largo del tiempo, por ejemplo, un tiempo de inicio de la emisión de la señal y un tiempo de duración de la emisión de la señal, medidos en base a las señales emitidas. Los valores de señal que representan actividades de proteasa a lo largo del tiempo, o sea, un tiempo de inicio de la emisión de la señal y un tiempo de duración de la emisión de la señal puede determinarse en base a las medidas de las señales emitidas a lo largo del tiempo. Al menos uno de un tiempo de inicio de la emisión de la señal y un tiempo de duración de la emisión de la señal puede depender de los tipos de proteasa. Cuando el resto informador es un polipéptido que emite una señal detectable, la degradación del sitio de escisión por actividades de proteasa puede conducir a un aumento de la señal emitida y una disminución de la señal emitida cuando desaparecen las actividades de proteasa. Por ejemplo, cuando se mide en las mismas condiciones, uno o más de un tiempo de inicio de la emisión de la señal y un tiempo de duración de la emisión de la señal puede cambiarse en dependencia de las características de la proteasa. En una modalidad, la proteasa puede distinguirse de otras proteasas en términos de, además de esta comparación relativa, el valor absoluto de al menos uno del tiempo de inicio de la emisión de la señal y el tiempo de duración de la señal, o un intervalo de los mismos. Por tanto, la determinación puede incluir comparar al menos uno del tiempo de inicio de la emisión de la señal y el tiempo de duración de la señal de una proteasa conocida, o determinar las características de una proteasa en base a un valor absoluto de al menos uno de los tiempos de inicio de la emisión de la señal y el tiempo de duración de la señal o un intervalo de los mismos. De acuerdo con al menos uno del tiempo de inicio de la emisión de la señal y el tiempo de duración de la señal, la indicación a tratar con la proteasa puede variar. Por tanto, cada uno de los métodos puede incluir determinar una indicación a tratar en un sujeto con la proteasa, en base a las características determinadas de la proteasa.

30 El método de acuerdo con un 8vo aspecto que no forma parte de la invención puede incluir determinar al menos uno de un tiempo de inicio de la emisión de la señal y un tiempo de duración de la emisión de la señal en base a las señales medidas, sin daño celular, por ejemplo, lisis celular.

35 Un 9no aspecto que no forma parte de la invención proporciona un método para medir la capacidad de una célula hospedera para expresar o inhibir una proteasa, el método incluye: introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido de proteasa en la célula hospedera; y cultivar la célula hospedera en la que se ha introducido el polinucleótido y medir las señales emitidas por el resto informador o el informador estándar interno o el producto del mismo en un cultivo.

40 El método del 9^{no} aspecto que no forma parte de la invención incluye introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido de proteasa en la célula hospedera. La célula hospedera y la proteasa son las mismas, como se describió anteriormente. La introducción puede realizarse mediante, por ejemplo, transformación, transfección o transducción. La célula hospedera puede ser una célula capaz de expresar un polinucleótido que codifica una proteasa, por ejemplo, un polipéptido de neurotoxina que tiene una actividad proteolítica en el citoplasma. La célula hospedera puede incluir un polinucleótido que codifica una proteasa, por ejemplo, un polipéptido de neurotoxina que tiene una actividad proteolítica. El polinucleótido que codifica una proteasa, por ejemplo, un polipéptido de neurotoxina que tiene actividad proteolítica puede insertarse en un cromosoma o puede estar presente fuera de un cromosoma. El polinucleótido que codifica una proteasa, por ejemplo, un polipéptido de neurotoxina que tiene actividad proteolítica puede expresarse de forma transitoria o estable. El polinucleótido que codifica una proteasa, por ejemplo, un polipéptido de neurotoxina con actividad proteolítica puede estar en su propia forma o en una forma incrustada en un vehículo tal como un vector. El polinucleótido puede introducirse desde fuera de la célula hospedera. La célula hospedera puede ser una célula recombinante. La célula hospedera puede ser una célula

endocrina. La célula hospedera puede seleccionarse de una neurona primaria, una célula de neuroblastoma y una neurona diferenciada de una célula madre pluripotente.

El método del 9^{no} aspecto que no forma parte de la invención incluye cultivar la célula hospedera en la que se ha introducido el polinucleótido y medir las señales emitidas por el resto informador o el informador estándar interno o el producto del mismo en un cultivo. El cultivo puede realizarse en presencia de un material de prueba. El material de prueba puede ser un polímero, tal como una proteína y un polisacárido, o un compuesto de molécula pequeña. El material de prueba puede ser un material que se considere que inhibe o promueve la proteasa. La célula hospedera puede ser aquella en la que se ha introducido un polinucleótido que codifica el material de prueba candidato. Por tanto, el método puede ser un método de selección de un material que module las actividades de proteasa. El método de selección puede incluir comparar una señal del grupo de prueba obtenida mediante el uso de un material de prueba y una señal de control obtenida mediante el uso de un grupo control. El grupo control puede ser un grupo control positivo que usa un material que se sabe que controla las actividades de proteasa o un grupo de control negativo obtenido de la misma manera que se usa para el grupo de prueba, excepto por el material de prueba candidato. El método puede incluir determinar si el material de prueba candidato es un material que modula las actividades de proteasa en base a los resultados de comparación obtenidos de la operación de comparación. En una modalidad, cuando la señal del grupo de prueba es mayor que la señal del grupo de control negativo, puede determinarse que el material tiene una actividad de promoción de actividades proteasas. En una modalidad, cuando la señal del grupo de prueba es menor que la señal del grupo de control negativo, puede determinarse que el material tiene una actividad de inhibición de actividades proteasas.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una vista que ilustra la estructura de un polinucleótido recombinante de acuerdo con un aspecto.

La Figura 2 muestra la estructura de un polinucleótido recombinante de acuerdo con un aspecto y una reacción entre un polipéptido expresado de esta manera y una proteasa.

La Figura 3 muestra un caso en el que un polinucleótido recombinante de acuerdo con un aspecto contacta con una proteasa en una célula.

La Figura 4 muestra una vista que muestra un caso en el que un polinucleótido recombinante que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un informador estándar interno de acuerdo con un aspecto está en contacto con una proteasa en una célula.

La Figura 5 muestra mediciones de las actividades de un resto informador después de que las células NG108-15 transfectadas con el vector pFB 1 se diferenciaran en neuronas y luego se intoxican con toxina botulínica A.

La Figura 6 muestra imágenes microscópicas fluorescentes de células NG108-15 transfectadas con el vector pFB 2 después de que las células se diferencian en neuronas y luego se intoxican con toxina botulínica A.

La Figura 7 muestra mediciones de las actividades de un resto informador de las células NG108-15 transfectadas con el vector pFB 3 después de que las células se diferencian en neuronas y luego se intoxican con toxina botulínica A.

La Figura 8 muestra mediciones de las actividades de un resto informador de las células SiMa transfectadas con el vector pFB 3 después de que las células se diferencian en neuronas y luego se intoxican con toxina botulínica A.

La Figura 9 muestra mediciones de las actividades de un resto informador de las células NT2 transfectadas con el vector pFB 3 después de que las células se diferencian en neuronas y luego se intoxican con toxina botulínica A.

La Figura 10 muestra mediciones de las actividades de un resto informador y una proteína informadora estándar interna, cada uno expresado por células NG108-15 transfectadas con el vector pFB 6 después de que las células se diferencian en neuronas y luego se transfecarán transitoriamente con el vector pCDNA4_BLC que expresa una cadena ligera de toxina botulínica B.

La Figura 11 muestra mediciones de señales emitidas por una proteína de resto informador expresada por células NT2 transfectadas con el vector pFB 2 después de que las células se establezcan como una línea celular derivada de monoclonal estabilizada, se diferencien en neuronas y luego se intoxiquen con diferentes concentraciones de BoNT/A.

Las Figuras 12 a la 14 muestran mediciones de señales emitidas por una proteína de resto informador o un informador estándar interno, cada uno expresado por células NT2 transfectadas con el vector pFB 2 después de que las células se establezcan como una línea celular derivada de monoclonal estabilizada, se diferencien en neuronas y luego se intoxiquen con diferentes concentraciones de BoNT/A.

Modo de la invención

En adelante, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son únicamente para fines ilustrativos y el alcance de la presente invención no está limitado por estos ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido de resto informador-resto sustrato-resto de desestabilización (en lo adelante también denominado 'R-S-D') y células que contienen el polinucleótido recombinante

5 (1) Preparación de un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido de resto informador-resto sustrato-resto de desestabilización (en lo adelante también denominado 'R-S-D')

10 Se prepararon dos polinucleótidos recombinantes que tienen estructuras diferentes. Uno es para codificar un polipéptido que tiene una estructura R-S-D y el otro es para codificar un polipéptido que tiene una estructura I-B-R-S-D. Aquí, I indica una secuencia de nucleótidos que codifica un informador estándar interno y B indica una secuencia bicistrónica. El polinucleótido recombinante tiene forma de un vector plásmido.

15 Se usó una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de luminiscencia o fluorescencia como informador interno estándar o resto informador. Ejemplos de la secuencia que codifica la proteína luminiscente son una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1) que codifica una proteína luciferasa de luciérnaga (FLuc) (por ejemplo, la SEQ ID NO: 9) y una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, la SEQ ID NO: 2) que codifica una proteína nanoluciferasa (NLuc) (SEQ ID NO: 10), y ejemplos de la secuencia que codifica la proteína de fluorescencia son una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 3) que codifica una proteína de fluorescencia verde mejorada (eGFP) (SEQ ID NO: 11) o una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 4) que codifica una proteína mCherry (SEQ ID NO: 12).

20 La secuencia bicistrónica usada en la presente descripción es una secuencia de nucleótidos (P2A) (SEQ ID NO: 5) que codifica un péptido autoescindible derivado del teschovirus-1 porcino.

25 El resto sustrato de una enzima proteolítica usada en la presente descripción es, en el caso de la toxina botulínica tipo A, una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 6) que codifica una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) de 145 a 207 del total de una secuencia de 207 aminoácidos como una región C-terminal de SNAP25 humano, o, en el caso de la toxina botulínica tipo B, una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 17) que codifica VAMP2 humano (SEQ ID NO: 18).

30 El resto de desestabilización usado en la presente descripción es una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 8) que codifica la secuencia PEST (SEQ ID NO: 16) y una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 7) que codifica la secuencia CL1 (SEQ ID NO: 15).

35 El polinucleótido recombinante se construyó como sigue: Primero, se obtuvo una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo denominada 'secuencia Fluc') que codifica la luciferasa de luciérnaga (FLuc) (SEQ ID NO: 9) a partir del vector pGL4.31 (Promega), una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 2) (en lo sucesivo denominada 'secuencia NLuc') que codifica la nanoluciferasa (NLuc) (SEQ ID NO: 10) se obtuvo del vector pNL1.1 (Promega), una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 3) (en lo sucesivo denominada 'secuencia eGFP') que codifica la proteína de fluorescencia verde mejorada (eGFP) (SEQ ID NO: 11) se obtuvo a partir del vector pEGFP-C1 (clontech) y una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 4) (en lo sucesivo denominada 'secuencia eGFP') que codifica mCherry (SEQ ID NO: 12) se obtuvo a partir del vector pmCherry-C1. Una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 6) que codifica una secuencia de aminoácidos de 145 a 207 del total de una secuencia de 207 aminoácidos como una región C-terminal de SNAP25 humano (en lo sucesivo denominada 'secuencia de SNAP25'), y una secuencia de nucleótidos que codifica VAMP2 humano (en lo sucesivo denominada 'secuencia de VAMP2') se sintetizaron mediante la RT-PCR a partir de ARNm de líneas celulares derivadas de humanos. Una secuencia que codifica el polipéptido CL1-PEST en el que CL1 está fusionado con PEST (en lo sucesivo denominada 'secuencia CL1-PEST') y una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido autoescindible P2A derivado del teschovirus-1 porcino (en lo sucesivo denominado 'P2A secuencia') se obtuvieron mediante síntesis de genes.

40 A continuación, se construyeron polinucleótidos recombinantes que tenían la estructura de R-S-D o I-B-R-S-D mediante la clonación de genes mediante el uso de una enzima de restricción mediante el uso de una combinación de las secuencias, y se ligaron al sitio de restricción BamHI/Xhol del vector pCDNA4 (Invitrogen) o del vector pFB (Agilent) para construir vectores recombinantes. Por ejemplo, se construyó un vector (en lo adelante denominado "vector pCDNA4 1") en el que se introduce un polinucleótido recombinante que consiste de una secuencia NLuc, una secuencia SNAP25 y una secuencia CL1-PEST en el sitio enzimático BamHI/Xhol del vector pCDNA4 o un vector (en lo adelante denominado "vector pFB 1") en el que se introduce un polinucleótido recombinante que consiste de una secuencia NLuc, una secuencia SNAP25 y una secuencia CL1-PEST en el sitio enzimático BamHI/Xhol del vector pFB. Por ejemplo, se construyó un vector (en lo adelante denominado "vector pCDNA4 2") en el que se introduce un polinucleótido recombinante que consiste de una secuencia mCherry, una secuencia SNAP25 y una secuencia CL1-PEST en el sitio enzimático BamHI/Xhol del vector pCDNA4 o un vector (en lo adelante denominado "vector pFB 2") en el que se introduce un polinucleótido recombinante que consiste de una secuencia mCherry, una secuencia SNAP25 y una secuencia CL1-PEST en el sitio enzimático BamHI/Xhol del vector pFB. Por ejemplo, se construyó un vector (en lo adelante denominado "vector pCDNA4 3") en el que se introduce un polinucleótido

recombinante que consiste de una secuencia FLuc, una secuencia P2a, una secuencia NLuc, una secuencia SNAP25 y una secuencia CL1-PEST en el sitio enzimático BamHI/Xhol del vector pCDNA4 o un vector (en lo adelante denominado "vector pFB 3") en el que se introduce un polinucleótido recombinante que consiste de una secuencia FLuc, una secuencia P2a, una secuencia NLuc, una secuencia SNAP25 y una secuencia CL1-PEST en el sitio enzimático BamHI/Xhol del vector pFB. Se construyó un vector pFB (en lo adelante denominado "vector pFB 4") en el que un polinucleótido recombinante que consiste de una secuencia FLuc, una secuencia P2a, una secuencia NLuc, una secuencia VAMP2 y una secuencia CL1-PEST se introduce en el sitio enzimático BamHI/Xhol del vector pFB.

10 En este caso, el vector pCDNA4 es un vector derivado de plásmido y se usa para expresar transitoriamente los polinucleótidos recombinantes en las células. El vector pFB usado en la presente descripción fue un vector derivado del virus de la leucemia murina moloney (MMLV) y se usó para construir una línea celular modificada mediante transfección, es decir, una línea celular en la que los polinucleótidos recombinantes se introdujeron en un cromosoma.

15 Las estructuras de los vectores plasmídicos construidos y de los vectores virales se confirmaron mediante secuenciación, y el ADN del vector plasmídico se purificó y aisló al nivel para cultivo celular.

(2) Producción de células que expresan el polipéptido R-S-D o I-B-R-S-D

20 Para construir una línea celular que exprese de manera estable y constante los vectores construidos en (1), se realizó la transducción con un vector viral derivado de MMLV, es decir, un vector pFB. La transfección con un vector viral derivado de MMLV es un método ampliamente practicado en la técnica, y la referencia (Felts Ka y otros, Mol Biotechnol. septiembre de 2002; 22(1): 25-32.). Brevemente, se sembraron células HEK-293T (ATCC-CRL-3216), una célula para empaque, en 10 ml de medio DMEM que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 % en una población de 1×10^7 células en una placa de cultivo de 55 cm^2 y se cultivó durante 24 horas en una incubadora a 37°C y CO_2 al 5 %, y luego, el vector pFB polinucleotídico recombinante de acuerdo con la presente invención, es decir, el vector pFB 1, 2, 3 o 4, y pCMV-gagpol (Cell Biolabs, inc.) y pCMV-VSV-G (Cell Biolabs, inc.) se mezclaron en una relación de 3: 2: 1. En este momento, se usó el vector pFB en una cantidad de 7,5 μg . Las mezclas de este vector se usaron para la transfección con Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen) y el método de transducción se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron en las mismas condiciones durante 48 horas después de la transducción. Por tanto, se produjo un virus que contiene el vector pFB 1, 2, 3 o 4 empaquetado infeccioso a partir de las células HEK 293T.

35 Luego, el virus que contiene el vector pFB 1,2,3 o 4 empaquetado infeccioso se transfeció en una célula diana para producir una línea celular que permite una expresión estable y constante. La célula diana usada en la presente descripción fue la célula NG108-15 (ATCC-HB-12317), la célula SiMa (DSMZ: ACC-164) y la célula NT2 (ATCC-CRL-1973). Las células NG108-15 son células híbridas de neuroblastoma de rata y glioma de rata, y una línea celular que ha sido identificada como susceptible a la toxina botulínica tipo A mediante diferenciación en neuronas (Whitemarsh RC y otros, Biochem Biophys Res Commun. 19 de octubre de 2012; 427(2): 426-30). Las células SiMa son una línea celular derivada del neuroblastoma humano y han sido identificadas como susceptibles a la toxina botulínica tipo A mediante la diferenciación en neuronas (Fernández-Salas E y otros, PLoS One. 2012; 7(11): e49516). Las células NT2 son una línea celular de carcinoma embrionario derivada de testículos humanos, tienen potencial de diferenciación múltiple y pueden diferenciarse en neuronas en condiciones específicas, y cuando se diferencian en neuronas, se descubrió que las células NT2 son susceptibles a la toxina botulínica tipo A (Tegenge y otros, Cell Mol Neurobiol. agosto de 2012; 32(6): 1021-9).

El procedimiento específico de una línea celular que expresa un polipéptido diana de manera estable es el siguiente.

50 Primero, se sembró una célula diana en una placa de 24 pocillos que contenía 0,5 ml de medio DMEM que contenía FBS al 10 % en una población de aproximadamente 1×10^5 células por pocillo un día antes de la infección y luego, cultivadas en una incubadora con CO_2 al 5 % a una temperatura de 37°C durante un día. El sobrenadante del cultivo de células HEK-293T recogidas del mismo se filtró mediante el uso de un filtro de jeringa de 0,45 μm para obtener una solución viral en la que se eliminaron las células y los restos celulares. La solución viral se añadió a los pocillos en los que se había cultivado la célula diana y de los que se había retirado el medio de cultivo, con una concentración de 1 ml/pocillo (24 pocillos), y las células se cultivaron en las mismas condiciones durante 6 horas para inducir la infección. Se añadió polibreno a un nivel de 8 mg/ml para aumentar la eficiencia de la infección en una célula diana. Después de 6 horas, el medio se reemplazó con medio DMEM que contenía FBS al 10 % como medio para cultivo de células normales, y las células se cultivaron en las mismas condiciones durante 2 días.

60 A continuación, la célula diana infectada en los 24 pocillos se cultivó durante 2 días y luego se transfirió a una placa de cultivo de 55 cm^2 y se cultivó después de que se le añadieran de 500 a 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de genetina (Gibco), un antibiótico selectivo del vector pFB. La dosis adecuada de antibiótico se determinó en función de la titulación de la célula diana y de la genetina. Cuando las células NT2 eran la célula diana, se cultivaron en una placa de cultivo que contenía 10 ml de medio de cultivo celular en presencia de 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de genetina durante 5 días.

A continuación, para formar un clon de una sola célula, la célula diana se transfirió a un pocillo de 96 pocillos a una concentración de 2 células/pocillo. En cada pocillo de una placa de 96 pocillos que contiene 100 μ l del mismo medio usado en el cultivo en la placa de cultivo de 55 cm^2 , las colonias formadas con clones de células individuales mientras se cultivaban en las mismas condiciones durante 4 semanas se seleccionaron mediante un microscopio de cultivo celular, y las colonias seleccionadas se sometieron a cultivo de expansión.

En este proceso, puede realizarse un proceso de preselección de acuerdo con la estructura de un polinucleótido recombinante producido. Es decir, cuando una proteína informadora estándar interna es una proteína fluorescente, el proceso de preselección puede realizarse mediante el uso de una microscopía de fluorescencia, o cuando una proteína informadora estándar interna es una proteína luminiscente, el proceso de preselección puede realizarse mediante un análisis microscopía luminiscente.

Para preseleccionar un polinucleótido recombinante en el que la proteína informadora estándar interna no está presente o para preseleccionar una línea celular monoclonal que tenga una sensibilidad excelente entre líneas celulares monoclonales en las que está presente una proteína informadora estándar interna, el inhibidor del proteosoma MG132 (Sigma) se añadió a una concentración de medio 10 μ M, o cuando el polinucleótido recombinante incluye la secuencia SNAP25, se usó el ADN de cadena ligera de toxina botulínica tipo A con Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen), y cuando el polinucleótido recombinante incluye la secuencia VAMP2, se usó el ADN de cadena ligera de toxina botulínica tipo B con Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen), y la transducción se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En este momento, se introdujeron BoNT/A LC y BoNT B LC en el sitio BamHI/Xhol de pCDA4. En detalle, con respecto únicamente a las células en las que se identificó una colonia monoclonal mientras se cultivaban en un recipiente de 96 pocillos durante aproximadamente 3 a 4 semanas, se sembró el mismo número de células por separado en dos placas de 96 pocillos: una placa para un experimento de selección, y la otra placa para cultivo de mantenimiento.

Las líneas celulares derivadas de monoclonos obtenidas mediante estos procedimientos de selección se sometieron a cultivo de expansión y se almacenaron congeladas. La liofilización se llevó a cabo mediante la congelación de las células generales de mamífero. Brevemente, 5×10^7 a 1×10^7 células se diluyeron en 1 ml de un medio de cultivo que contenía DMSO al 5 % o al 10 % y las células diluidas se colocaron en un vial de congelación. La temperatura se redujo a -80 $^{\circ}$ C y después se almacenó en la fase gaseosa de un tanque de nitrógeno licuado.

Como resultado, se establecieron células de la línea celular NG108-15, células SiMa y células NT2, que expresan de manera estable y constante el virus que contiene el vector pFB 1, 2, 3, 4 o 6.

(3) Diferenciación de células NG108-15 establecidas, células SiMa y células NT2 en neuronas e intoxicación por toxinas

Las células NG108-15, las células SiMa y las células NT2 son líneas celulares de neuroblastoma o líneas celulares de carcinoma embrionario, que se sabe que son susceptibles a la toxina botulínica cuando se diferencian en neuronas. Por lo tanto, estas células se diferenciaron en neuronas de acuerdo con el siguiente procedimiento.

Las células NG108-15 se cultivaron de mantenimiento en medio DMEM suplementado con FBS al 10 (v/v) % en una incubadora con CO₂ al 5 % a una temperatura de 37 $^{\circ}$ C. Para la diferenciación neuronal, las células se sembraron a una concentración de 2×10^4 células/pocillo en cada pocillo de una placa recubierta de matriz (BD science) de 96 pocillos para cultivo celular, y se incubaron en un medio neurobasal (Gibco) suplementado con 50 μ M de ácido retinoico y 25 μ M de purmofamina durante aproximadamente 5 días. El medio neurobasal contenía B27 (Gibco), Glutamax (Gibco) y aminoácidos no esenciales (Gibco) como suplementos en una cantidad de 1X cada uno.

Las células SiMa se cultivaron de mantenimiento en medio DMEM suplementado con FBS al 10 (v/v) % en una incubadora con CO₂ al 5 % a una temperatura de 37 $^{\circ}$ C. Para la diferenciación neuronal, las células se sembraron a una concentración de 5×10^4 células/pocillo en cada pocillo de una placa recubierta de matriz (BD science) de 96 pocillos para cultivo celular, y se incubaron en un medio MEM libre de suero (Welgene) suplementado con 50 μ M de ácido retinoico durante aproximadamente 5 días. El medio MEM contenía B27 (Gibco), N2 (Gibco), Glutamax (Gibco), HEPES (Gibco) y aminoácidos no esenciales (Gibco) como suplementos en cantidades de 1X cada uno.

Se cultivaron células NT2 (también denominadas "NTteraA2") en medio α -MEM (Welgene) suplementado con FBS al 10 (v/v) % en una incubadora con CO₂ al 5 % a una temperatura de 37 $^{\circ}$ C. Para la diferenciación neuronal, las células se sembraron a una concentración de 1×10^5 células/ml en cada pocillo de una placa de Petri y se cultivaron en medio de diferenciación suplementado con ácido retinoico 50 μ M durante 1 semana en las mismas condiciones mientras el medio se cambiaba cada 2 a 3 días. Para el medio de diferenciación, se usó medio DMEM/F12 (Welgene) suplementado con FBS al 10 (v/v) %.

Las células cultivadas forman esferas y, después de 1 semana de cultivo, las esferas se recogieron y se transfirieron a una placa de cultivo celular normal que tenía la misma área. Las células se cultivaron, como células adherentes, en el medio de diferenciación suplementado con ácido retinoico 50 μ M durante 1 semana mientras el medio se cambiaba cada 2 a 3 días. Subsecuentemente, las células adheridas se desagregaron y separaron mediante el uso de tripsina y se contó el número de células.

1 \times 10⁷ células se transfirieron a un matraz 175T (Nunc) y se cultivaron en el medio de diferenciación suplementado con un inhibidor mitótico durante 10 días en las mismas condiciones mientras el medio se intercambiaba cada 2 a 3 días. La inhibición mitótica usada en la presente descripción fue AraC 1 μ M, uridina 10 μ M y floxuridina 10 μ M. Las células diferenciadas en neuronas se separaron mediante el uso de tripsina y las células obtenidas se almacenaron 5 congeladas. Se usó un medio para congelar como medio para almacenar el congelado y la congelación se realizó mediante el método de congelación celular. Las neuronas diferenciadas se sembraron en la población de 1 \times 10⁵ células por pocillo en una placa recubierta de matriz de 96 pocillos para cultivo celular y se cultivaron durante 10 días o más en el medio de diferenciación, y el medio se cambió cada 2 a 3 días.

10 (4) Intoxicación de neuronas diferenciadas con toxina botulínica

10 La intoxicación de neuronas diferenciadas con toxina botulínica tipo A se llevó a cabo como de la siguiente manera. Para intoxicar con una proteína de toxina purificada, la proteína de toxina purificada se diluyó a una concentración apropiada en el medio de diferenciación y luego se intercambió con el medio de cultivo de la neurona cultivada en una incubadora con CO₂ al 5 % a una temperatura de 37 $^{\circ}$ C. Posteriormente, las células se cultivaron en las mismas 15 condiciones durante 24 horas para inducir la intoxicación por toxina. Luego, el medio se reemplazó con medio de diferenciación y las células se cultivaron durante 72 horas en las mismas condiciones.

20 El medio de diferenciación se añadió a un vial de fármaco de toxina botulínica disponible comercialmente (Meditoxina inyectable, Neuronox) para suspender la proteína de la toxina liofilizada y el excipiente, y luego, el medio de diferenciación se intercambió con el medio de cultivo de las células que se estaban cultivando en mantenimiento en una incubadora con CO₂ al 5 % a una temperatura de 37 $^{\circ}$ C. La prueba de potencia de la toxina en los viales del producto final se realizó mediante el uso de un vial de placebo de toxina para igualar la cantidad de excipiente tratado. El vial de placebo de toxina se preparó mediante la eliminación únicamente de la proteína de toxina del vial 25 de toxina del producto final.

25 Es decir, se suspendieron la misma cantidad del vial de toxina del producto final y del vial de placebo de toxina en la misma cantidad, y luego, la cantidad total del medio intoxicante se trató de la misma manera de acuerdo con cada concentración de tratamiento.

30 (5) Análisis cuantitativo de del resto informador o del informador estándar interno

30 El análisis cuantitativo del resto informador o proteína informador estándar interna expresada a partir del polinucleótido recombinante se realizó de la siguiente manera.

35 Con respecto al polinucleótido recombinante de acuerdo con la presente invención, cuando se usó una proteína luminiscente como resto informador o una proteína informadora estándar interna, la proteína luminiscente se analizó cuantitativamente mediante un ensayo de luminiscencia. Cuando el resto informador es NLuc, se usó el kit de ensayo de nanolucifera (Promega).

40 Cuando el resto informador era NLuc y la proteína informadora estándar interna era FLuc, se usó el kit de ensayo de nanolucifera dual One-glo (Promega) y la prueba se realizó de acuerdo con el manual del proveedor. La luminiscencia se midió mediante el uso de SpectraMax (Molecular Device Inc). La normalización se realizó mediante el uso de un valor resultante obtenido al dividir el valor NLuc medido por el valor FLuc de la proteína informadora estándar interna.

45 Con respecto al polinucleótido recombinante de acuerdo con la presente invención, cuando se usó una proteína fluorescente como resto informador o una proteína informadora estándar interna, los valores de fluorescencia se analizaron cuantitativamente mediante un medidor de fluorescencia. Cuando el resto informador es mCherry y la proteína informadora estándar interna es eGFP, se excitó mCherry a una longitud de onda de 610 nm y se midió la luz emitida a una longitud de onda de 507 nm mediante el uso de SpectraMax (Dispositivo molecular), un medidor de 50 fluorescencia. Para eGFP, eGFP se excitó a una longitud de onda de 488 nm y se midió la luz emitida a una longitud de onda de 507 nm. La normalización se realizó mediante el uso de un valor resultante obtenido al dividir el valor de la emisión de mCherry medido por el valor de la emisión de eGFP de la proteína informadora estándar interna. Además, los valores de fluorescencia de GFP y RFP pueden medirse mediante el uso de un dispositivo Incucyte 55 (Essen Bioscience Inc.) para realizar la normalización. eGFP pertenece a una familia GFP y mCherry pertenece a una familia RFP.

55 (6) Resultados

60 La Figura 5 muestra mediciones de las actividades de un resto informador después de que las células NG108-15 transfectadas con el vector pFB 1 se diferenciaron en neuronas y luego se intoxicaron con toxina botulínica A. Con referencia a la Figura 5, la producción de células NG108-15 transfectadas con el vector pFB 1, la diferenciación en las neuronas, la intoxicación con toxina botulínica A y la medición de la actividad del resto informador son las mismas que se describieron en (3), (4) y (5). Con referencia a la Figura 5, para medir la actividad de la nanolucifera, se midió la luminiscencia de las células que se habían cultivado para estar intoxicadas durante un total de 72 horas mediante el uso del kit de nanolucifera. Como se muestra en la Figura 5, la actividad medida de la nanolucifera, que se evaluó mediante una unidad de luminiscencia relativa, aumentó significativamente cuando las células se intoxicaron con toxina botulínica A 10 nM en comparación con cuando no se intoxicaron con la misma.

5 La Figura 6 muestra imágenes microscópicas fluorescentes de las células NG108-15 transfectadas con el vector pFB 2 después que las células se diferenciaran en neuronas y luego se intoxicaran con toxina botulínica A. Con referencia a la Figura 6, la producción de células NG108-15 transfectadas con el vector pFB 2, la diferenciación en las neuronas y la intoxicación con toxina botulínica A son las mismas que se describieron en (3) y (4). La Figura 6 muestra imágenes de fluorescencia de células, cultivadas durante un total de 72 horas para intoxicación, obtenidas mediante el uso de un dispositivo Olympus FSX-100, que es un microscopio de fluorescencia.

10 Con referencia a la Figura 6, el Control es de un grupo control con 0 nM de toxina botulínica A, y BoNT/A 1 nM es de un grupo de prueba con 1 nM de toxina botulínica A. Como se muestra en la Figura 6, el grupo de prueba mostró un aumento significativo en el número de células con fluorescencia roja.

15 Las Figuras 5 y 6 muestran que cuando el sitio de escisión de SNAP25 no es escindido por la toxina botulínica A, los polipéptidos de la estructura del resto sustrato NLuc-SNPA25-CL1-PEST se degradan fácilmente y la unidad luminiscente relativa es baja, y cuando el sitio de escisión de SNAP25 se escinde mediante la toxina botulínica A, los polipéptidos de la estructura del resto sustrato NLuc-SNPA25-CL1-PEST se estabilizan frente a la degradación y la unidad luminiscente relativa es alta.

20 25 La Figura 7 muestra imágenes microscópicas fluorescentes de las células NG108-15 transfectadas con el vector pFB 3 después que las células se diferenciaran en neuronas y luego se intoxicaran con toxina botulínica A. Con referencia a la Figura 7, la producción de células NG108-15 transfectadas con el vector pFB 3, la diferenciación en las neuronas, la intoxicación con la toxina botulínica A y la medición de la actividad del resto informador son las mismas que se describieron en (3), (4) y (5). Con referencia a la Figura 7, las actividades de Fluc y NLuc se midieron mediante la medición de la luminiscencia de las células cultivadas para intoxicación durante un total de 72 horas mediante el uso de un kit de luciferasa dual nano-glo.

30 35 Como se muestra en la Figura 7, la actividad relativa de NLuc con respecto a FLuc, que se evaluó mediante una unidad de luminiscencia relativa, aumentó significativamente cuando las células se intoxicaron con toxina botulínica A 10 nM en comparación con cuando no se intoxicaron con la misma. Con referencia a la Figura 6, BoNT/A es de un grupo de control con 0 nM de toxina botulínica A, y BoNT/A 1 nM es de un grupo de prueba con 1 nM de toxina botulínica A. Como se muestra en la Figura 7, la actividad medida de NLuc, que se evaluó mediante luminiscencia relativa, aumentó significativamente cuando las células se intoxicaron con toxina botulínica A 10 nM en comparación con cuando no se intoxicaron con la misma.

40 45 La Figura 8 muestra imágenes microscópicas fluorescentes de células SiMa transfectadas con el vector pFB 3 después de que las células se diferenciaran en neuronas y luego se intoxicaran con toxina botulínica A.

50 La Figura 9 muestra imágenes microscópicas fluorescentes de células NT2 transfectadas con el vector pFB 3 después de que las células se diferenciaran en neuronas y luego se intoxicaran con toxina botulínica A.

55 60 Las Figuras 8 y 9 muestran los resultados obtenidos de la misma manera que se usaron para obtener los resultados mostrados en la Figura 7, excepto que se usaron células SiMa y células NT2 en lugar de células NG108-15. Como se muestra en las Figuras 8 y 9, la actividad medida de NLuc, que se evaluó mediante luminiscencia relativa, aumentó significativamente cuando las células se intoxicaron con toxina botulínica A 10 nM en comparación con cuando no se intoxicaron con la misma.

65 70 La Figura 10 muestra mediciones de señales emitidas por una proteína de resto informador y una proteína informadora estándar interna expresada después de que la cadena ligera de BoNT/B (pCDNA4-BLC) se expresara arbitrariamente en células NG108-15 que se indujeron a ser transfectadas mediante el uso del vector pFB 4 para expresar de forma estable un polipéptido. Aquí, con respecto al vector pCDNA4-BLC, se usó Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen) y la transducción se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron en las mismas condiciones durante 48 horas después de la transducción. En consecuencia, el vector pCDNA4-BLC se expresa transitoriamente en células NG108-15. En la Figura 10, el eje vertical indica los valores obtenidos al normalizar los valores de NLuc con respecto a Flue.

75 80 Como se muestra en la Figura 10, la actividad de NLuc medida con respecto a FLuc, que se evaluó mediante luminiscencia relativa, aumentó significativamente cuando se introdujo ADN de pCDNA4-BLC que codifica la cadena ligera de 10 µg de toxina botulínica B en comparación con cuando no se introdujo.

85 90 La Figura 11 muestra mediciones de señales emitidas por una proteína de resto informador después de que células de la línea celular NT2 transducidas con el vector pFB 3 y estabilizadas se intoxicaran con una concentración diferente de BoNT/A. En la Figura 11, BoNT/A API representa un ingrediente farmacéutico activo usado para fabricar un producto que contiene BoNT/A. En la presente descripción, el ingrediente farmacéutico activo se usa como BoNT/A. BoNT/A API fue suministrado por Meditox Co., Ltd. El vector pFB 3 se transdujo mediante el uso de Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron en las mismas condiciones durante 48 horas después de la transducción. En consecuencia, el vector pFB 3 se expresa transitoriamente en células NT2. En la Figura 11, RLU representa una unidad de luciferasa relativa. Como se

muestra en la Figura 11, la actividad de NLuc medida con respecto a FLuc, que se evaluó mediante unidad de luminiscencia relativa, depende de la concentración de toxina botulínica A una concentración de 1 pM a 10 nM. Esto indica que midiendo la RLU, puede medirse el nivel de toxina botulínica en una muestra, por ejemplo, el nivel de tipo A.

5 Las Figuras 12 a la 14 muestran mediciones de señales emitidas por un resto informador y una proteína informadora estándar interna expresadas en células NT2 que se transfecaron con el vector pFB 3 y se estabilizaron después de que las células se intoxicaron con diferentes concentraciones de productos finales que contienen BoNT/A. Los resultados mostrados en las Figuras 12 a la 14 se obtuvieron de la misma manera que se describió en relación con la Figura 11, excepto que como BoNT/A, se usó un producto final que contiene BoNT/A en lugar de un ingrediente farmacéutico activo usado para producir un producto que contiene BoNT/A. En comparación con BoNT/A API, el producto contiene además ingredientes como excipientes. Las Figuras 12, 13 y 14 muestran valores Fluc, valores NLuc y valores NLuc/FLuc, respectivamente.

10 15 Como se muestra en la Figura 14, la actividad de NLuc con respecto a FLuc, que se evaluó mediante unidad de luminiscencia relativa, fue dependiente de la concentración de toxina botulínica A una concentración de 1 U a 10 U. Esto indica que, mediante la medición de las RLU, puede medirse el nivel de toxina botulínica en una muestra, por ejemplo, el nivel de tipo A.

20 Aplicabilidad industrial

El polinucleótido recombinante de acuerdo con el primer aspecto puede usarse para determinar las actividades de proteasa de un polipéptido de neurotoxina en una célula hospedera o muestra que contiene el polinucleótido recombinante.

25 La célula hospedera que contiene el polinucleótido recombinante de acuerdo con el segundo aspecto puede usarse eficientemente para determinar las actividades de proteasa de un polipéptido de neurotoxina en una muestra.

30 35 El kit para determinar las actividades proteolíticas de un polipéptido de neurotoxina de acuerdo con los aspectos tercero y cuarto puede usarse para determinar las actividades proteolíticas de un polipéptido de neurotoxina.

De acuerdo con el método para determinar las características de un polipéptido de neurotoxina en una muestra de acuerdo con los aspectos quinto y séptimo, las características de un polipéptido de neurotoxina pueden determinarse eficientemente.

35 40 De acuerdo con el método para determinar las características de un polipéptido de neurotoxina en una muestra de acuerdo con los aspectos sexto y octavo, las actividades de proteasa de un polipéptido de neurotoxina en una muestra pueden determinarse eficientemente.

De acuerdo con el método de medir la capacidad de una célula hospedera para expresar o inhibir una proteasa de acuerdo con el noveno aspecto, la capacidad de una célula hospedera para expresar o inhibir una proteasa puede medirse eficientemente o puede determinarse si un material de prueba controla actividades de proteasa.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido recombinante que comprende un primer polinucleótido que codifica un polipéptido que incluye: un resto informador; un resto de desestabilización; y un resto sustrato, en donde el resto sustrato (S) comprende un sitio de escisión de una proteasa, en donde el resto informador (R) emite una señal detectable o libera un material que emite una señal detectable en una reacción catalizada de esta manera, en donde el resto de desestabilización (D) reduce la expresión intracelular del primer polinucleótido en las células en comparación con cuando el resto de desestabilización está ausente,
- 10 en donde el polinucleótido tiene la estructura R-S-D,
en donde el extremo N-terminal del resto sustrato está unido al extremo C-terminal del resto informador y el extremo C-terminal del resto sustrato está unido al extremo N-terminal del resto de desestabilización,
en donde la proteasa es un polipéptido de neurotoxina, y el polipéptido de la neurotoxina es una toxina botulínica de serotipo A (BoNT/A), BoNT/B, BoNT/C, BoNT/CD, BoNT/D, BoNT/DC, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/FA, BoNT/G o la neurotoxina tetánica (TeNT),
en donde el resto informador es una proteína fluorescente, β -lactamasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, cloranfenicol acetiltransferasa, β -glucuronidasa, peroxidasa o luciferasa, y
en donde el resto de desestabilización promueve la degradación del ARNm o la proteína expresada intracelularmente por el primer polinucleótido en las células.
- 20 2. El polinucleótido recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un polinucleótido que codifica: una secuencia bicistrónica unida aguas arriba o aguas abajo del primer polinucleótido; y un informador estándar interno unido operativamente aguas arriba o aguas abajo de la secuencia bicistrónica, en donde el informador estándar interno (I), diferente del resto informador (R), emite una señal detectable o libera un material que emite una señal detectable en una reacción catalizada de esta manera,
en donde el informador estándar interno (I) es una proteína fluorescente, β -lactamasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, cloranfenicol acetiltransferasa, β -glucuronidasa, peroxidasa o luciferasa.
- 25 3. El polinucleótido recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la secuencia bicistrónica es una secuencia del sitio de entrada ribosómica interna (IRES) o una secuencia de nucleótidos que permite que el ribosoma omita la formación de un enlace peptídico.
- 30 4. Una célula hospedera que contiene el polinucleótido recombinante de acuerdo con la reivindicación 1.
- 35 5. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la célula hospedera es una célula que es capaz de translocar un polipéptido de neurotoxina a un citoplasma.
- 40 6. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la célula hospedera es una célula NT2, una célula SiMa o una célula NG108-15.
7. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la célula hospedera comprende un polinucleótido exógeno que codifica una proteasa, por ejemplo, un polipéptido de neurotoxina que tiene actividades proteolíticas.
- 45 8. Un método para determinar las actividades proteolíticas de un polipéptido de neurotoxina en una muestra, donde el método comprende poner en contacto la célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 4 con una muestra que se sospecha que contiene un polipéptido de neurotoxina; y
medir una señal emitida por el resto informador en un producto obtenido por el contacto.
- 50 9. El método de la reivindicación 8, en donde el polinucleótido recombinante comprende además un polinucleótido que codifica una secuencia bicistrónica unida aguas arriba o aguas abajo de un primer polinucleótido y un informador estándar interno unido operativamente aguas arriba o aguas abajo de la secuencia bicistrónica, en donde el informador estándar interno (I), diferente del resto informador (R), emite una señal detectable o libera un material que emite una señal detectable en una reacción catalizada de esta manera,
en donde el informador estándar interno (I) es una proteína fluorescente, β -lactamasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, cloranfenicol acetiltransferasa, β -glucuronidasa, peroxidasa o luciferasa.
- 55 10. El método de la reivindicación 8, que comprende, además, antes del contacto, cultivar la célula hospedera en un medio de cultivo para diferenciarla en células neuronales.
11. El método de la reivindicación 10, en donde la célula hospedera es una célula NT2, una célula SiMa o una célula NG108-15.
- 60 12. Un método para medir la capacidad de una célula hospedera para expresar o inhibir una proteasa, el método incluye: introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido de proteasa en la célula hospedera de

acuerdo con la reivindicación 4; y cultivar la célula hospedera en la que se ha introducido el polinucleótido y medir las señales emitidas por el resto informador o el informador estándar interno o un producto del resto informador o un informador estándar interno en un cultivo.

- 5 13. El método de la reivindicación 12, en donde el cultivo se realiza en presencia de un material de prueba, en donde el material de prueba es un material que se considera que inhibe o promueve la proteasa.

Figura 1

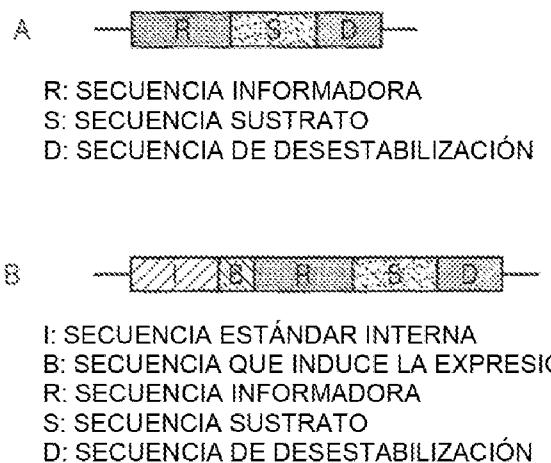


Figura 2

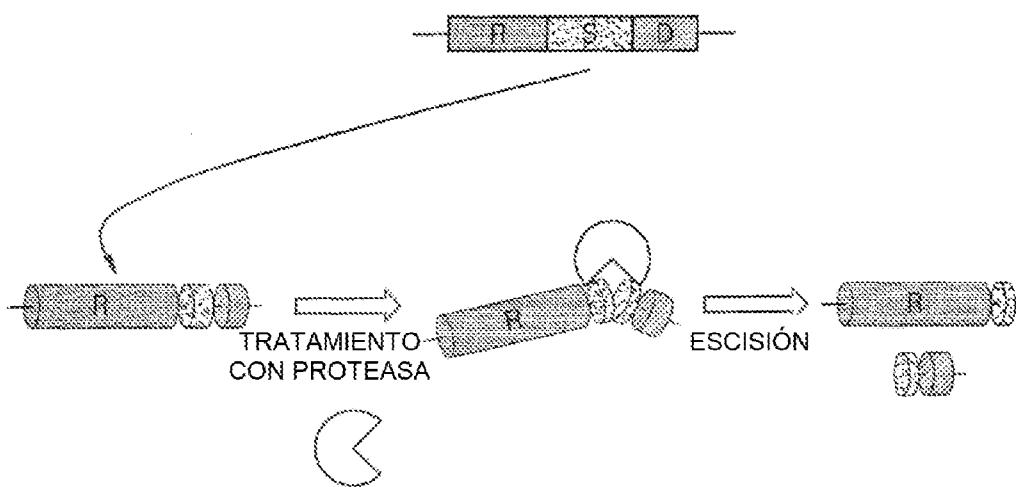


Figura 3

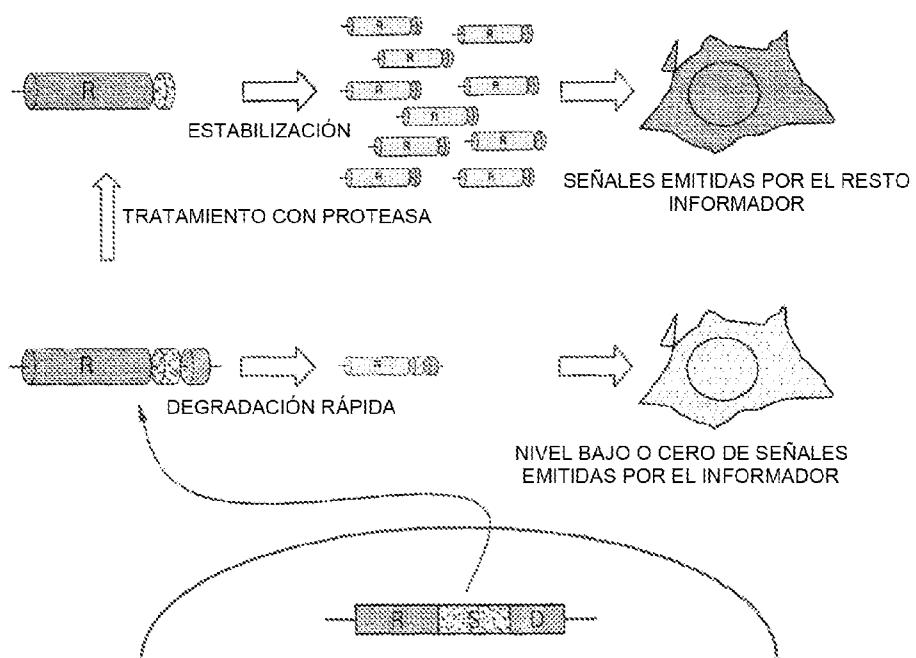


Figura 4

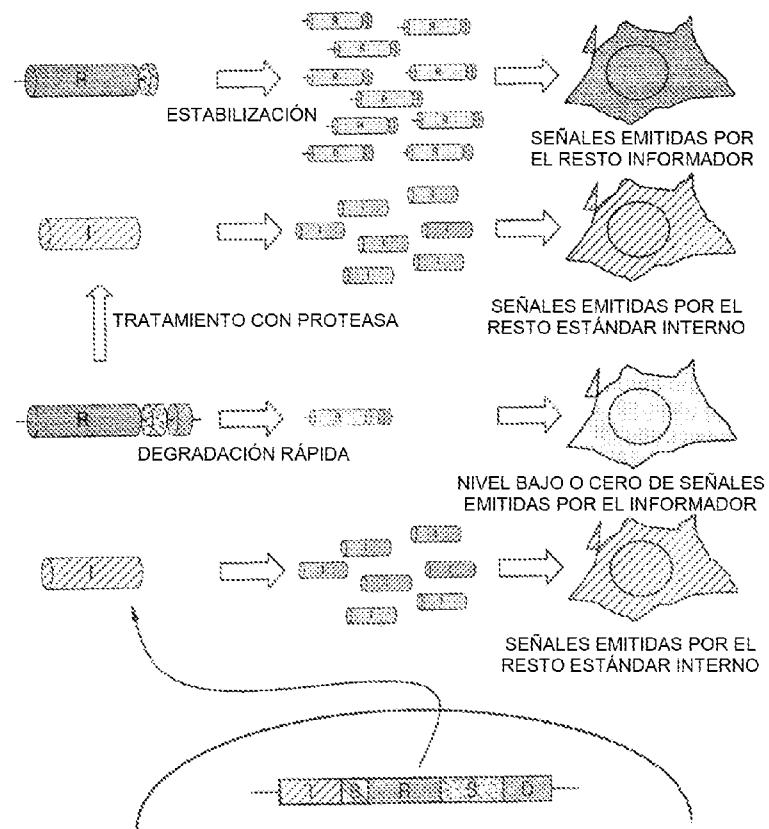


Figura 5

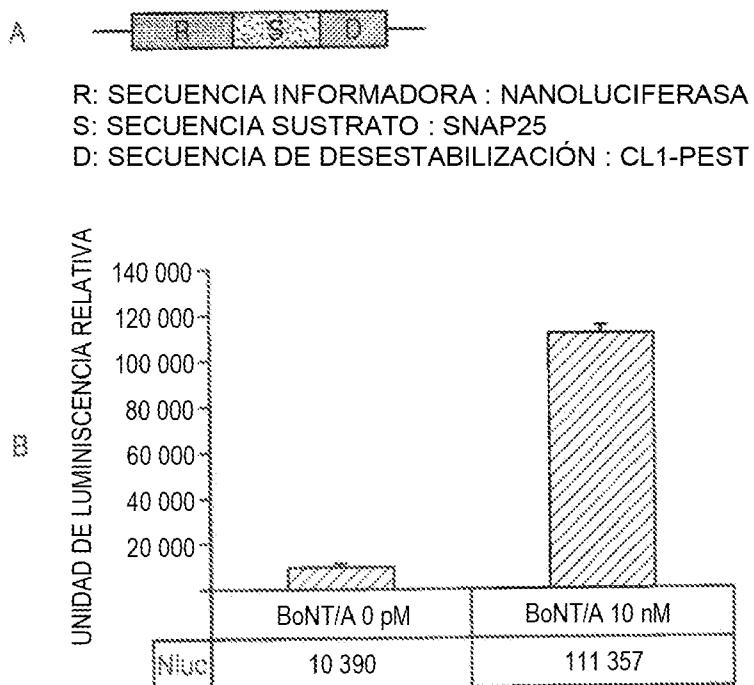


Figura 6

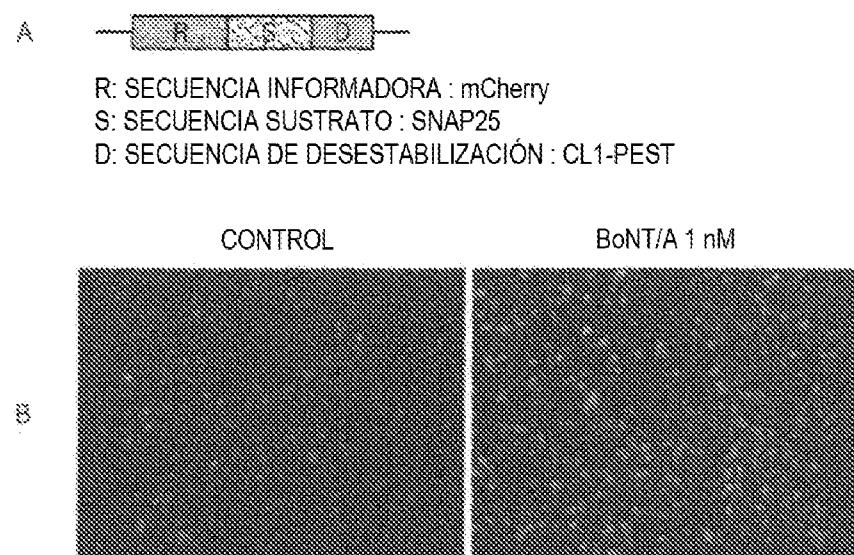


Figura 7

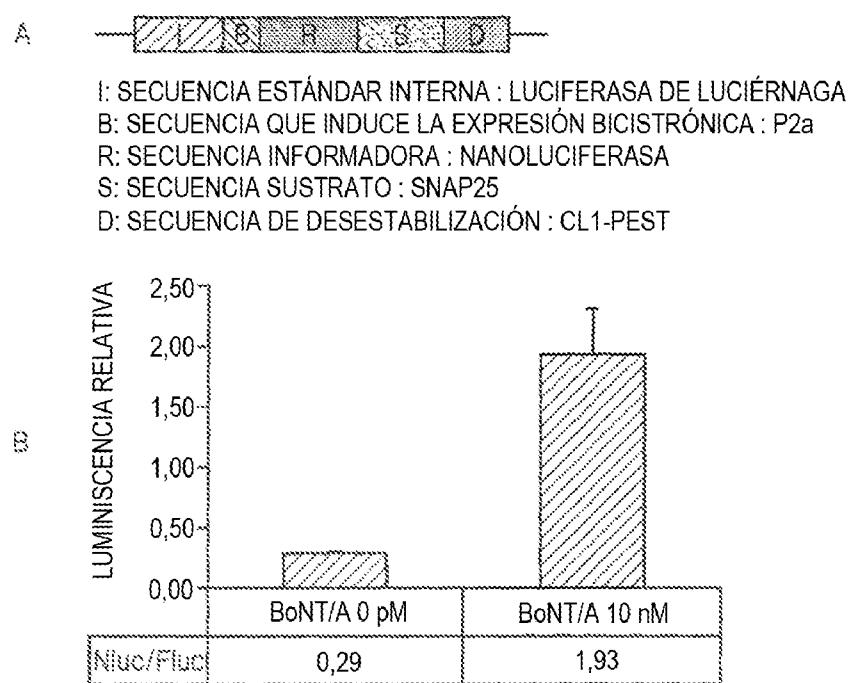


Figura 8

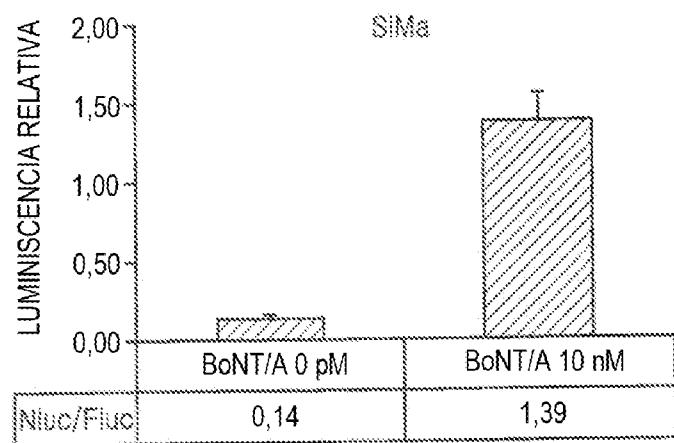


Figura 9

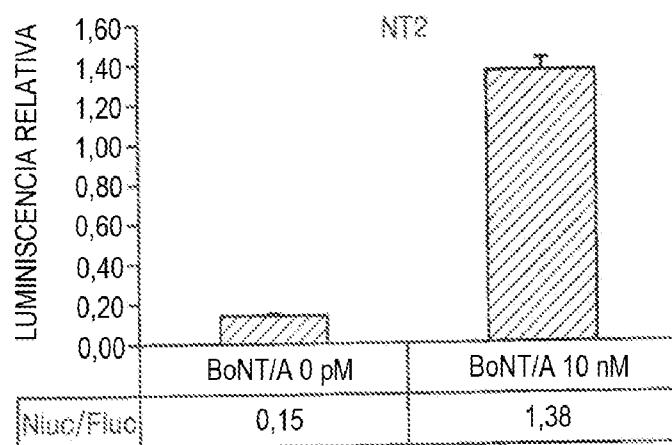


Figura 10

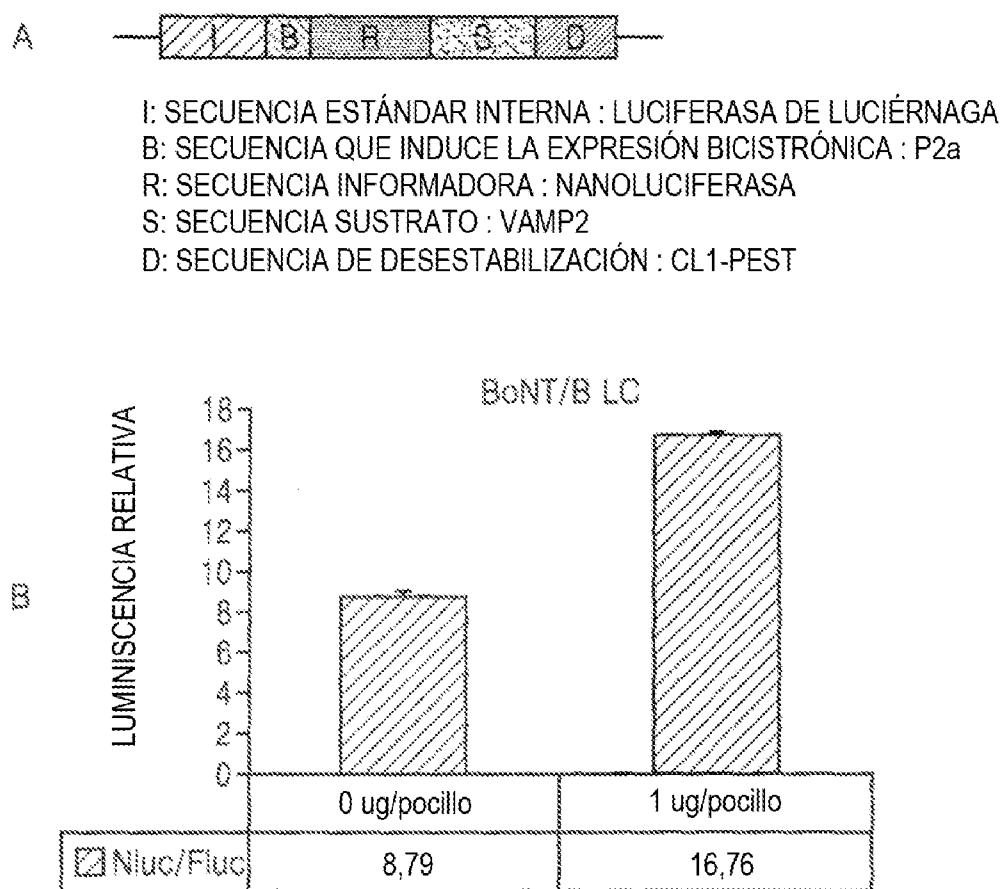


Figura 11

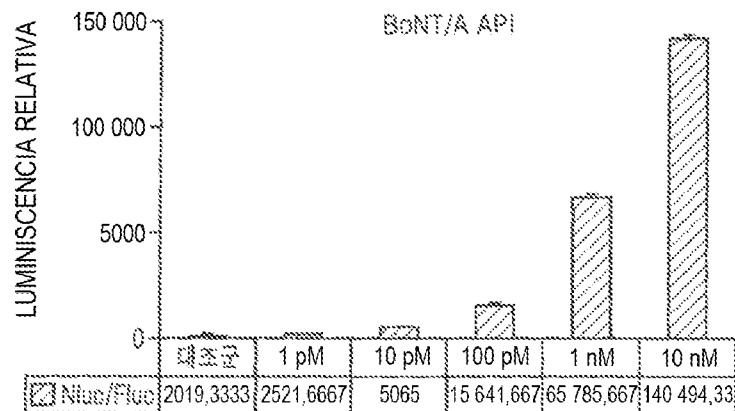


Figura 12

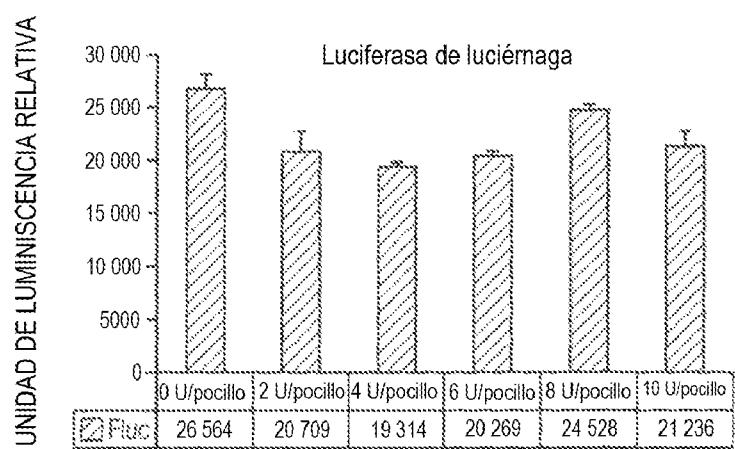


Figura 13

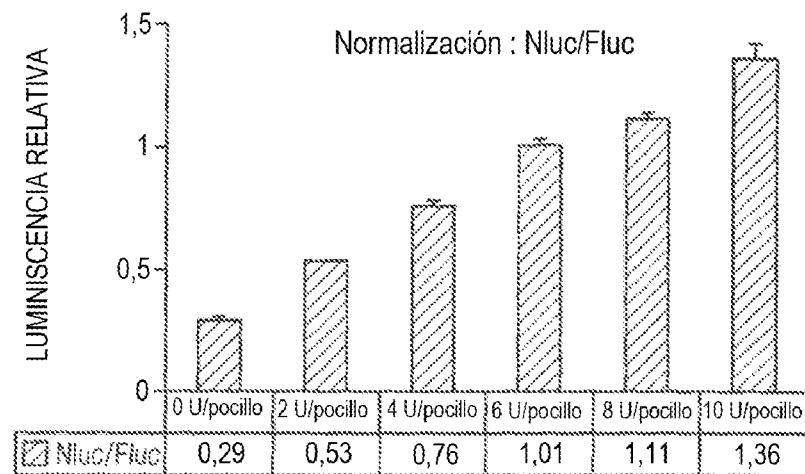


Figura 14

