

BIOHÍBRIDO DE NEUROTOXINA BOTULÍNICA

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a polipéptidos de neurotoxina botulínica y en particular a una cadena pesada de neurotoxina botulínica quimérica.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Las neurotoxinas botulínicas (BoNT) son las toxinas proteicas más potentes conocidas por el hombre, y el agente causante de la rara enfermedad paralítica, botulismo. Esta familia de toxinas bacterianas consta de ocho serotipos, BoNT/A-G, y la recientemente descrito BoNT/X (Montal, 2010; Zhang y otros, 2017). Todos comparten una arquitectura común y se expresan como una proteína de 150 kDa que es escindida post-traduccionalmente en una molécula de doble cadena compuesta por una cadena ligera (LC, 50 kDa, por sus siglas en inglés), unida por un único puente disulfuro a la cadena pesada (HC, 100 kDa, por sus siglas en inglés). La HC posee dos de los dominios funcionales, con el dominio de translocación N-terminal (H_N) y el dominio de unión C-terminal (H_C), mientras que la LC es responsable de la actividad catalítica intracelular. Las BoNT primero reconocen los terminales nerviosos colinérgicos a través de receptores específicos de la superficie celular, y luego se endocitan dentro de una vesícula. El ambiente endosómico ácido provoca un cambio conformacional que permite la translocación de la LC dentro del citosol, también llamada translocación de toxina. El dominio catalítico liberado, una proteasa de zinc, puede entonces dirigirse específicamente a uno de los tres SNARE neuronales (receptores solubles de proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida): Las BoNT/A, /C y /E escinden a SNAP-25; BoNT/B, /D, /F, /G y /X marcan a VAMP (sinaptobrevina); la syntaxina es escindida por BoNT/C (Schiavo y otros, 2000; Zhang y otros, 2017). Estas tres proteínas forman un complejo que media la fusión de la vesícula sináptica con la membrana plasmática (Sudhof y Rothman, 2009). La proteólisis de cualquiera de los SNARE inhibe la exocitosis y, por lo tanto, la liberación de neurotransmisores, lo que provoca eficazmente la parálisis flácida sintomática del botulismo (Rossetto y otros, 2014). La secuencia de los tres dominios funcionales se ha descrito previamente (Lacy DB, y otros 1999.). El dominio catalítico está compuesto de los aminoácidos 1-437, el dominio de translocación de los aminoácidos 448-872 y el dominio de unión de los aminoácidos 873-1295, en referencia a la secuencia de BoNT/A en Lacy DB, y otros Como todos los serotipos de BoNT y sus subtipos son

homólogos en gran medida, la posición de los dominios correspondientes en cualquier otro serotipo o subtipo será muy similar.

La alta potencia de estas toxinas las hace un agente terapéutico extremadamente útil en el tratamiento de una amplia gama de trastornos neuromusculares tales como estrabismo, distonía cervical y blefaroespasma, así como también otras afecciones que implican la liberación de acetilcolina, tal como la hiperhidrosis (Chen, 2012). Las BoNT/A y /B son los únicos serotipos aprobados y disponibles comercialmente como terapéuticos. La BoNT/A se considera generalmente que tiene una mayor eficacia en humanos y, por lo tanto, es el serotipo de elección en la mayoría de los casos (Bentivoglio y otros, 2015). Sin embargo, el tratamiento con BoNT generalmente requiere inyecciones repetidas, ya que los efectos terapéuticos de las toxinas son solo transitorios. Esto según se informa condujo a la aparición de resistencia en un pequeño subconjunto de pacientes que desarrollan una respuesta inmune a BoNT/A (Lange y otros, 2009; Naumann y otros, 2013). Mientras BoNT/B representa una alternativa, su menor eficacia significa que se requieren dosis más altas y, por lo tanto, representa un mayor riesgo de inmunogenicidad (Dressler y Bigalke, 2005). Además, BoNT/B también se asocia con varios resultados adversos, tales como inyecciones dolorosas, una duración de acción más corta y efectos secundarios más frecuentes (Bentivoglio y otros, 2015). Los principales efectos adversos también se asocian a menudo con el tratamiento de espasmos musculares, pero no con aplicaciones cosméticas. Esto se debe a que los efectos adversos se deben en gran medida a la difusión de toxinas a otras regiones del cuerpo y la posibilidad de difusión de toxinas está directamente relacionada con las dosis inyectadas. Los efectos adversos varían desde eventos transitorios no graves, tales como ptosis y diplopía, hasta eventos potencialmente mortales, incluso la muerte.

La unión de BoNT/A y /B a las neuronas se ha caracterizado en detalles y se basa en un mecanismo de doble receptor, que involucra una proteína vesicular sináptica y un gangliósido anclado en la membrana neuronal. El receptor de proteína para BoNT/A se identificó como SV2 (Dong y otros, 2006, Mahrhold y otros, 2006). Más precisamente, BoNT/A puede unirse a varias isoformas de SV2 humanas A, B y C, aunque la toxina solo reconoce las formas N-glicosiladas de SV2A y SV2B (Yao y otros, 2016). El receptor de proteína para BoNT/B es sinaptotagmina (Syt) (Nishiki y otros, 1994, 1996; Dong y otros, 2003), con preferencia por Syt1 sobre Syt2 en humanos (Strotmeier y otros, 2012). El reconocimiento de gangliósidos es la primera etapa del proceso de intoxicación para todos las BoNT (Binz y Rummel, 2009), y está mediado por un mecanismo de enlace compartido centrado en el motivo conservado H...SxWY...G en su secuencia. La BoNT/A prefiere la unión al resto N-

acetilgalactosamina - galactosa terminal de GT1b y GD1a (Takamizawa y otros 1986; Schengrund y otros 1991), mientras que los datos sobre BoNT/B sugieren una preferencia por el motivo disialilo de GD1b y GT1b. Los diferentes serotipos varían en su especificidad y afinidad por carbohidratos (Rummel, 2013).

5 El arreglo modular y las propiedades distintivas de los diversos serotipos de BoNT han hecho a las toxinas un objetivo de elección para la ingeniería de proteínas. En particular, varios estudios han demostrado que era posible intercambiar dominios enteros entre serotipos (Masuyer y otros, 2014) y por lo tanto, obtener nuevas toxinas con un potencial farmacéutico único. Por ejemplo, se han producido varias moléculas que consisten del dominio de unión de BoNT/B asociado con la
10 translocación y los dominios catalíticos de BoNT/A (Rummel y otros, 2011; Wang y otros, 2012; Kutschenko y otros, 2017). Estas llamadas toxinas quiméricas presentaron propiedades farmacológicas atractivas en términos de eficacia y duración de la actividad, que se asociaron con la alta afinidad de BoNT/B por la sinaptotagmina y la mayor expresión de este receptor en las neuronas en comparación con SV2 (Takamori y otros, 2006; Wilhelm y otros, 2014).

15

SUMARIO DE LA INVENCION

Debido a que tanto la generación de anticuerpos neutralizantes como la difusión de toxinas están directamente relacionadas con las dosis inyectadas, es muy deseable reducir las dosis de toxinas, mientras se mantienen los mismos niveles de actividad de toxina, lo que significa que se debe mejorar
20 la eficacia de las moléculas de toxinas individuales. Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar polipéptidos de BoNT con una duración y potencia mejoradas, y con menos riesgo de extensión a partir del sitio de inyección. Los inventores han identificado un problema clave con los intentos mencionados anteriormente en la ingeniería de polipéptidos de BoNT quiméricos. Ninguno de los intentos anteriores tuvo en cuenta el aspecto estructural del polipéptido.

25 Mediante el uso de un enfoque basado en la estructura y el conocimiento actual sobre los mecanismos de unión al receptor de BoNT/A y /B, los inventores han diseñado una nueva molécula, TriRecABTox (BoNT/TAB) que comprende un dominio H_C específicamente diseñado (H_C/TAB) que es capaz de reconocer un receptor de SV2C, un receptor de sinaptotagmina y un receptor de gangliósido. Los inventores muestran que BoNT/TAB puede expresarse y purificarse de forma
30 recombinante. Mediante el uso de la cristalografía de rayos X, los inventores demuestran además que BoNT/TAB puede unirse a sus tres receptores simultáneamente. Por lo tanto, BoNT/TAB

debería reconocer las células neuronales con afinidad mejorada y tiene el potencial de ser una alternativa de alta eficacia al tratamiento con BoNT/A.

El objeto anterior se alcanza, por lo tanto, en un primer aspecto al proporcionar un dominio de unión a la cadena pesada de la neurotoxina botulínica (BoNT) (H_C/TAB), en donde el H_C/TAB comprende

- 5 a) un sitio de unión al receptor de sinaptotagmina (Syt), y b) un sitio de unión al receptor de vesícula sináptica 2 asociada (SV2), y c) un sitio de unión al receptor de gangliósido (Gang), y en donde dicho H_C/TAB está adaptado para unirse sinérgicamente a un receptor de sinaptotagmina (Syt), un receptor de vesícula sináptica 2 asociada (SV2) y un receptor de gangliósido (Gang).

- 10 El H_C/TAB tiene un extremo N-terminal (H_{CN}) y un extremo C-terminal (H_{CC}). De acuerdo con una modalidad, el dominio H_{CC} está compuesto indistintamente de secuencias del serotipo de BoNT A (BoNT/A) y del serotipo de BoNT B (BoNT/B).

De acuerdo con una modalidad adicional, dicho extremo H_{CC} está compuesto de acuerdo con una secuencia $A_1B_1A_2B_2A_3$, donde A indica una secuencia a partir de BoNT/A, y B indica una secuencia a partir de BoNT/B.

- 15 De acuerdo con una modalidad adicional más, las secuencias de B_1 , A_2 y B_2 comprenden mutaciones y/o deleciones para crear interfaces intramoleculares estables para el H_C/TAB completo.

De acuerdo con una modalidad adicional más, las secuencias que forman el sitio de unión al receptor de Gang se originan a partir de cualquier serotipo de BoNT de unión al receptor de Gang y sus subtipos.

- 20 De acuerdo con una modalidad adicional más, las secuencias que forman el sitio de unión al receptor de Gang se originan a partir de BoNT/B.

De acuerdo con una modalidad adicional más, las secuencias que forman el sitio de unión al receptor de Gang se encuentran en B_2 .

- 25 De acuerdo con una modalidad adicional más, las secuencias que forman el sitio de unión al receptor de Syt se originan a partir de cualquier serotipo de BoNT de unión al receptor de Syt y sus subtipos.

De acuerdo con una modalidad adicional más, las secuencias que forman el sitio de unión al receptor de Syt se originan a partir de BoNT B, DC o G.

De acuerdo con una modalidad adicional más, las secuencias que forman el sitio de unión al receptor de Syt se encuentran en B_1 y B_2 .

- 30 De acuerdo con una modalidad adicional más, la secuencia H_{CN} se origina a partir de cualquier serotipo de BoNT de unión al receptor de SV2 y sus subtipos

De acuerdo con una modalidad adicional más, la secuencia H_{CN} se origina a partir de BoNT/A.

De acuerdo con una modalidad adicional más, las secuencias que forman el sitio de unión al receptor de SV2 se ubican en H_{CN} y en A₁ y A₃ en el H_{CC}.

De acuerdo con una modalidad adicional más, el H_C/TAB tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a la secuencia de cualquiera de las SEQ. ID. Nos. 1, 3, 5, 6, 8, 10 o 12.

De acuerdo con un segundo aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende el H_C/TAB de acuerdo con el primer aspecto y cualquier modalidad del primer aspecto, acoplado a cualquier otra proteína, polipéptido, secuencia de aminoácidos o sonda fluorescente, directamente o a través de un enlazador.

De acuerdo con una modalidad del segundo aspecto, dicho polipéptido es un polipéptido de BoNT (BoNT/TAB), caracterizado porque dicho BoNT/TAB además del H_C/TAB comprende un dominio de translocación de cadena pesada (H_N), una cadena ligera (LC) y un sitio de proteasa colocado entre LC y H_N en la secuencia polipeptídica, en donde el H_N y la LC, respectivamente e independientemente entre sí, se originan a partir de cualquiera de los serotipos de BoNT A, B, C, D, DC, E, En, F, G o X y sus subtipos, así como también los polipéptidos similares a BoNT.

De acuerdo con una modalidad adicional, el polipéptido puede comprender cualquier otra proteína, polipéptido, secuencia de aminoácidos o sonda fluorescente, enlazada a la misma directamente o a través de un enlazador.

De acuerdo con una modalidad adicional más, el sitio de proteasa es un sitio de exoproteasa. De acuerdo con una modalidad adicional más, el sitio de exoproteasa es un sitio de Factor Xa.

De acuerdo con una modalidad adicional más, el polipéptido según el segundo aspecto tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a la secuencia de cualquiera de las SEQ. ID. Nos. 1, 3, 5, 6, 8, 10 o 12.

De acuerdo con un tercer aspecto, se proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un H_C/TAB de acuerdo con el primer aspecto y cualquier modalidad del primer aspecto, o el polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto y cualquier modalidad del segundo aspecto.

De acuerdo con un cuarto aspecto se proporciona para el uso del H_C/TAB de acuerdo con el primer aspecto y cualquier modalidad del primer aspecto, o el polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto y cualquier modalidad del segundo aspecto, en un método terapéutico o en un método cosmético.

De acuerdo con una modalidad del cuarto aspecto, el método terapéutico o el método cosmético es un tratamiento para enfriar y/o inactivar los músculos.

De acuerdo con una modalidad adicional del cuarto aspecto, el método terapéutico es el tratamiento y/o prevención de un trastorno elegido del grupo que comprende trastornos neuromusculares, afecciones que implican la liberación de acetilcolina y trastornos musculares espásticos.

De acuerdo con una modalidad adicional más, el trastorno se elige del grupo que comprende disfonía
5 espasmódica, tortícolis espasmódica, distonía laríngea, disfonía oromandibular, distonía lingual, distonía cervical, distonía focal de la mano, blefaroespasma, estrabismo, espasmo hemifacial, trastorno de los párpados, parálisis cerebral, espasticidad focal y otros trastornos de la voz, colitis espasmódica, vejiga neurogénica, anismo, espasticidad de extremidades, tics, temblores, bruxismo, fisura anal, acalasia, disfagia y otros trastornos del tono muscular y otros trastornos caracterizados
10 por movimientos involuntarios de grupos musculares, lagrimeo, hiperhidrosis, salivación excesiva, secreciones gastrointestinales excesivas, trastornos secretores, dolor por espasmos musculares, dolor de cabeza, lesiones deportivas y depresión.

De acuerdo con una modalidad adicional más, el H_C/TAB de acuerdo con el primer aspecto y cualquier modalidad del primer aspecto, o el polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto y
15 cualquier modalidad del segundo aspecto, puede usarse en una prueba farmacológica, para investigar el papel de dicha proteína, polipéptido, secuencia de aminoácidos o sonda fluorescente en un proceso sináptico.

De acuerdo con una modalidad adicional más, el H_C/TAB de acuerdo con el primer aspecto y cualquier modalidad del primer aspecto, o el polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto y
20 cualquier modalidad del segundo aspecto, puede usarse como vehículo para transportar eficazmente cualquier proteína, secuencia de aminoácidos del polipéptido o sonda fluorescente acoplado a una superficie neuronal.

De acuerdo con una modalidad adicional más, el H_C/TAB de acuerdo con el primer aspecto y cualquier modalidad del primer aspecto, o el polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto y
25 cualquier modalidad del segundo aspecto, puede usarse como vehículo para transportar eficazmente cualquier proteína, secuencia de aminoácidos del polipéptido o sonda fluorescente en un citosol neuronal mediante el uso de un sistema de translocación de toxinas.

De acuerdo con un quinto aspecto, se proporciona una composición farmacéutica o cosmética que comprende el H_C/TAB de acuerdo con el primer aspecto y cualquier modalidad del primer aspecto,
30 o el polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto y cualquier modalidad del segundo aspecto.

De acuerdo con una modalidad del quinto aspecto, la composición puede comprender además excipientes, transportadores u otros aditivos farmacéutica y/o cosméticamente aceptables.

De acuerdo con un sexto aspecto, se proporciona un estuche de partes que comprende la composición del quinto aspecto y las instrucciones para la administración terapéutica de la composición.

De acuerdo con un séptimo aspecto, se proporciona un método para tratar una afección asociada con actividad neuronal no deseada, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente

- 5 eficaz del H_C/TAB de acuerdo con el primer aspecto y cualquier modalidad del primer aspecto, o el polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto y cualquier modalidad del segundo aspecto, o composición del quinto aspecto, a un sujeto para tratar de esta manera la afección, en donde la afección se elige del grupo que comprende disfonía espasmódica, tortícolis espasmódica, distonía laríngea, disfonía oromandibular, distonía lingual, distonía cervical, distonía focal de la mano, blefaroespasma, estrabismo, espasmo hemifacial, trastorno de los párpados, parálisis cerebral, espasticidad focal y otros trastornos de la voz, colitis espasmódica, vejiga neurogénica, anismo, espasticidad de extremidades, tics, temblores, bruxismo, fisura anal, acalasia, disfagia y otros trastornos del tono muscular y otros trastornos caracterizados por movimientos involuntarios de grupos musculares, lagrimeo, hiperhidrosis, salivación excesiva, secreciones gastrointestinales
- 10 excesivas, trastornos secretores, dolor por espasmos musculares, dolor de cabeza, lesiones deportivas y depresión, y afecciones dermatológicas o estéticas/cosméticas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Información estructural sobre la unión al receptor por BoNT/A y /B. (a)

- 20 Superposición de las estructuras cristalinas del dominio de unión de BoNT/A en complejo con GT1b (PDB 2VU) y con SV2C humano glicosilado (PDB 5JLV). **(b)** Estructura cristalina del dominio de unión de BoNT/B en complejo con GD1a y sinaptotagmina 2 de rata (PDB 4KBB). Proteínas representadas en modo cinta y carbohidratos como barras. **(c)** Alineamiento de secuencias de H_C/A (Uniprot P10845) y /B (Uniprot P10844) donde también se proporcionan elementos estructurales secundarios (figura preparada con ESPript3.0; Robert y Gouet, 2014). Las regiones directamente involucradas en la unión al receptor se resaltan para cada dominio con una línea por encima de la secuencia H_C/A para el receptor SV2, y por debajo de la secuencia H_C/B para el receptor Syt; el sitio de unión al receptor de gangliósido está subrayado con una línea gris rayada.
- 25

Figura 2: Alineamiento de secuencias de H_C/TAB con unión al receptor por H_C/A y /B.

- 30 Las secuencias de proteínas se alinearon con ClustalO (Sievers y otros, 2011). Los segmentos de H_C/A y H_C/B usados en el diseño de H_C/TAB se resaltan en negro (escritura en blanco) y gris claro

(escritura en negro), respectivamente. Las posiciones donde se incluyeron las deleciones se muestran en gris oscuro (guion).

Figura 3: Caracterización de H_C/TAB. (a) Análisis SDS-PAGE de H_C/TAB purificado, y comparado con controles de H_C/A y H_C/B. (b) Análisis de transferencia Western mediante el uso de una sonda de poli-histidina, las mismas muestras que en (a). ‘M’ denota los marcadores de peso molecular.

Figura 4: Estructura cristalina de rayos X del dominio de unión de TriRecABTox en complejo con SV2C, sinaptotagmina 1 humana y GD1a. (a) Representación de cinta de H_C/TAB, con SV2C, hSyt1 y GD1a. (b-d) Ejemplo de mapa de densidad electrónica (malla) $2F_o - F_c$ a 2σ alrededor del sitio de unión al receptor de SV2C (b), GD1a (c) y hSyt1 (d).

Figura 5: Unión al receptor de SV2. (a) Superposición de la estructura cristalina de H_C/TAB y H_C/A (PDB 4JRA) en complejo con hSV2C. (b) Superposición de la estructura cristalina de H_C/TAB y H_C/A (PDB 5JLV) en complejo con hSV2 glicosilado. Los residuos involucrados en la unión (Benoit y otros, 2014) se muestran como barras y se marcan de acuerdo con la posición de H_C/A correspondiente.

Figura 6: Unión a sinaptotagmina. Superposición de la estructura cristalina de H_C/TAB y H_C/B (PDB 4KBB) en complejo con Syt1 humano y Syt2 de rata, respectivamente. Los residuos involucrados en la unión (Jin y otros, 2006; Chai y otros, 2006) se muestran como barras y se marcan de acuerdo con la posición de H_C/B correspondiente.

Figura 7: Unión a GD1a. Superposición de la estructura cristalina de H_C/TAB y H_C/B (PDB 4KBB) en complejo con GD1a (gris oscuro y gris claro, respectivamente). Los residuos involucrados en la unión (Berntsson y otros, 2013) se muestran como barras y se marcan de acuerdo con la posición de H_C/B correspondiente.

Figura 8: Caracterización de BoNT/TAB. (a) Análisis de SDS-PAGE de BoNT/TAB purificado, con controles de H_C/A y H_C/B. (b-d) Análisis de transferencia Western mediante el uso de una sonda de poli-histidina (b); anti-sueros H_C/A (c) y H_C/B (d). Las mismas muestras que en (a), ‘M’ denota los marcadores de peso molecular.

Figura 9: Activación de BoNT/TAB. (a) Representación esquemática del constructo BoNT/TAB que describe la organización del dominio funcional. El sitio de activación de proteasa modificado genéticamente se muestra como una línea negra discontinua. El puente disulfuro natural entre las cadenas ligeras y pesadas se representa como una línea negra simple (b) Análisis SDS-PAGE del ensayo de activación de BoNT/TAB. BoNT/TAB no activado (izquierda) no reducido (NR) y

reducido (R), y BoNT/TAB activado por Factor Xa (derecha), respectivamente. Los fragmentos de interés están anotados; ‘M’ denota los marcadores de peso molecular.

Figura 10: Uso extendido de H_C/TAB. (a) Representación esquemática de potenciales derivados de BoNT funcionales asociados con H_C/TAB. Los constructos consistirían en los dominios funcionales BoNT de cualquier serotipo o subtipo (‘n’). También se debe incluir un sitio de activación de proteasa (línea negra discontinua). (b) Representación esquemática de un constructo potencial que usa H_C/TAB para el transporte de proteína de carga a la superficie de las células neuronales.

Figura 11: Purificación de H_C/TAB. (a) Cromatógrafo (traza A₂₈₀) de la purificación por cromatografía de afinidad mediante el uso de una columna HisTrap FF de 5 mL. (b) Cromatógrafo (traza A₂₈₀) de la purificación por exclusión de tamaño mediante el uso de una columna Superdex200. Las etapas del proceso de purificación y las fracciones con H_C/TAB se resaltan.

Figura 12: Cristales de H_C/TAB en complejo con SV2C, hSyt1 y GD1a. (a) Cristal cultivado en 20 % v/v de polietilenglicol 6000, 0.1 M de citrato pH 5.0. (b) Crystal montado en un circuito criogénico para la recolección de datos en la estación Diamond I04-1. (c) Patrón de difracción de rayos X del cristal.

Figura 13: Purificación de BoNT/TAB. (a) Cromatógrafo (traza A₂₈₀) de la purificación por cromatografía de afinidad mediante el uso de una columna HisTrap FF de 5 mL. (b) Cromatógrafo (traza A₂₈₀) de la purificación por exclusión de tamaño mediante el uso de una columna Superdex200. Las etapas del proceso de purificación y las fracciones con BoNT/TAB se resaltan.

Figura 14: Estructura cristalina de rayos X del dominio de unión de H_C/TAB en complejo con SV2C, sinaptotagmina 1 humana y GD1a. (a) y (b) Análisis de temperatura de fusión de las estructuras cristalinas de H_C/TAB (a) y H_C/TAB2.1 (b) – Representación del radio de masilla, donde el radio es proporcional a los factores B. Se indica el lazo ‘360’, con las posiciones 360 y 362 resaltadas en negro. (c) Estructura cristalina de rayos X del complejo H_C/TAB2.1, con SV2C, hSyt1 y GD1a (representación en barra). (d) Igual que (c) con el lazo de unión a lípidos marcado y los residuos hidrofóbicos mostrados como barras.

Figura 15: Purificación de H_C/TAB2.1. (a) Cromatógrafo (traza A₂₈₀) de la purificación por cromatografía de afinidad mediante el uso de una columna HisTrap FF de 5 mL. (b) Cromatógrafo (traza A₂₈₀) de la filtración en gel mediante el uso de una columna Superdex200. Se indican las fracciones con H_C/TAB2.1. (c) y (d) Caracterización de H_C/TAB2.1. Análisis de SDS-PAGE de fracciones de H_C/TAB2.1 purificadas, a partir de la cromatografía de afinidad en (c) y de la filtración

en gel (d); los primeros carriles a la izquierda muestran los marcadores de peso molecular. Se indica la banda correspondiente a H_C/TAB2.1.

Figura 16: Purificación de H_C/TAB2.1.1 y H_C/TAB2.1.3. (a) y (b) Cromatógrafos (traza A280) de la purificación por cromatografía de afinidad y filtración en gel de H_C/TAB2.1.1, respectivamente.

Se indican las fracciones con H_C/TAB2.1.1. (c) y (d) Cromatógrafos (traza A280) de la purificación por cromatografía de afinidad y filtración en gel de H_C/TAB2.1.3, respectivamente. Se indican las fracciones con H_C/TAB2.1.3. (d) Caracterización de H_C/TAB2.1.1 y H_C/TAB2.1.3. Análisis de SDS-PAGE de las muestras purificadas; el primer carril de la izquierda muestra los marcadores de peso molecular. Se indican las bandas correspondientes a H_C/TAB2.1.1 y H_C/TAB2.1.3

Figura 17: Figura X4: Purificación de BoNT/TAB2.1.3. (a) y (b) Análisis de SDS-PAGE de fracciones de la purificación BoNT/TAB2.1.3. Fracciones de la cromatografía de afinidad (a) y filtración en gel (b); los primeros carriles a la izquierda muestran los marcadores de peso molecular. Se indica la banda correspondiente a BoNT/TAB2.1.3. (c) Análisis de SDS-PAGE de la muestra de BoNT/TAB2.1.3 purificada. En el carril 1: muestra antes de la activación de la trombina, en el carril 2: muestra activada final (tratamiento posterior a la trombina). Se indican las bandas correspondientes a la longitud completa (simple cadena), HC y LC. El carril de la derecha muestra los marcadores de peso molecular. (d) Cromatógrafo (traza A280) de la filtración en gel final (escisión posterior a la trombina) mediante el uso de una columna Superdex200. Se indican las fracciones con BoNT/TAB2.1.3.

DEFINICIONES

Como se usa en el presente documento, el término neurotoxina botulínica "BoNT" abarca cualquier polipéptido o fragmento de una neurotoxina botulínica. El término BoNT puede referirse a una BoNT de longitud completa. El término BoNT puede referirse a un fragmento de BoNT que puede ejecutar el mecanismo celular general de manera que una BoNT ingresa a una neurona e inhibe la liberación de neurotransmisores. El término BoNT puede referirse simplemente a un fragmento de BoNT, sin requerir que el fragmento tenga una función o actividad específica.

Como se usa en el presente documento, el término "dominio de translocación" o "H_N" significa un dominio de BoNT que puede ejecutar la etapa de translocación del proceso de intoxicación que media la translocación de la cadena ligera de BoNT. Por lo tanto, un H_N facilita el movimiento de una cadena ligera de BoNT a través de una membrana hacia el citoplasma de una célula.

Como se usa en el presente documento, el término “dominio de unión” es sinónimo de “dominio H_C” y se refiere a cualquier dominio de unión al receptor de BoNT de origen natural que pueda ejecutar la etapa de unión celular del proceso de intoxicación, incluida, por ejemplo, la unión de la BoNT a un sistema receptor específico de BoNT ubicado en la superficie de la membrana plasmática de una célula objetivo.

En la presente divulgación, los términos “ácido nucleico” y “gen” se usan indistintamente para describir una secuencia de nucleótidos, o un polinucleótido, que codifica un polipéptido.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Como se especificó anteriormente en la sección de antecedentes, una BoNT comprende una cadena ligera (LC), unida por un único puente disulfuro a la cadena pesada (HC). La cadena pesada (HC) contiene dos de los dominios funcionales, con el dominio de translocación N-terminal (H_N) y el dominio de unión C-terminal (H_C), mientras que LC es responsable de la actividad catalítica intracelular. El H_C por lo tanto, comprende los dominios de unión al receptor que son capaces de unirse específica e irreversiblemente a los receptores específicos expresados en las neuronas susceptibles, mientras que el H_N forma un canal que permite que la LC unida se transloque de vesículas de membrana endosomales al citosol. Los diferentes serotipos de BoNT tienen diferentes conjuntos de sitios de unión al receptor en el H_C, típicamente dos sitios de unión al receptor. Los inventores han hecho uso de este conocimiento en ingeniería de un nuevo dominio de unión H_C de BoNT (H_C/TAB) que comprende sitios de unión para tres receptores diferentes.

Los inventores han logrado esto mediante la ingeniería de un dominio H_C/TAB que comprende:

- a) un sitio de unión al receptor de sinaptotagmina (Syt) y
- b) un sitio de unión al receptor de vesícula sináptica 2 asociada (SV2) y
- c) un sitio de unión al receptor de gangliósido (Gang).

La estructura del dominio H_C/TAB diseñado permite al H_C/TAB unirse sinérgicamente a un receptor de sinaptotagmina (Syt), un receptor de vesícula sináptica 2 asociada (SV2) y un receptor de gangliósido (Gang). Por lo tanto, se logra una unión sinérgica a tres receptores en la célula neuronal, lo que provoca al nuevo dominio H_C/TAB tener una afinidad mejorada en comparación con otros dominios H_C de BoNT. Por lo tanto, se mejora la unión general a las neuronas y, en consecuencia, se mejora la eficacia de la toxina.

El H_C comprende además un extremo N-terminal (H_{CN}) y un extremo C-terminal (H_{CC}). Una característica clave de la presente invención es la estructura del extremo H_{CC} del H_C/TAB, que es donde se encuentran los dominios de unión al receptor en BoNT.

En una modalidad del H_C/TAB, el extremo H_{CC} está compuesto indistintamente de secuencias del serotipo de BoNT A (BoNT/A) y del serotipo de BoNT B (BoNT/B). Al diseñar esta estructura intercambiable, los inventores han podido optimizar una unión sinérgica a los tres receptores.

En una modalidad adicional de la invención, el extremo H_{CC} está compuesto de acuerdo con una secuencia A₁B₁A₂B₂A₃, donde A indica una secuencia de BoNT/A, y B indica una secuencia de BoNT/B, véase la figura 2. Esto optimiza aún más la estructura del H_C/TAB, al permitir que los tres dominios de unión al receptor se unan al menos sinérgicamente a los tres receptores mencionados, posiblemente incluso de forma simultánea. Los inventores han demostrado que la unión simultánea a los tres receptores ocurre in vitro con esta secuencia A₁B₁A₂B₂A₃. La secuencia A₁B₁A₂B₂A₃ diseñada de acuerdo con esta modalidad particular se describe en la SEQ. ID. No. 1

Para optimizar aún más el H_C/TAB de acuerdo con lo anterior, se han introducido mutaciones y deleciones para crear interfaces intramoleculares estables, véase la figura 2. En la SEQ. ID. No. 1, se han realizado sustituciones en las posiciones 306, 360 y 362, y se han realizado deleciones, en comparación con la secuencia original, entre las posiciones 265/266 y 360/361. Sin embargo, la persona experta apreciará que las mutaciones y/o deleciones para un aminoácido en una posición +1, +2, +3, +4, +5 o -1, -2, -3, -4 o -5 de las posiciones especificadas anteriormente pueden tener el mismo efecto. Por lo tanto, cualquier modificación de este tipo en una posición de +/- 5 aminoácidos a partir de las posiciones de aminoácidos especificadas cae dentro del alcance de la presente divulgación.

De acuerdo con las modalidades específicas anteriores, y todos los ejemplos a continuación, el sitio de unión al receptor de gangliósido se origina a partir de BoNT/B, pero es concebible que pueda originarse a partir de cualquier serotipo de BoNT de unión al receptor Gang y sus subtipos, tales como los serotipos de BoNT A, B, C, D, DC, E, En, F, G o X, o subtipos de los mismos, ya que todos los serotipos tienen un sitio de unión al receptor de gangliósido.

De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, las secuencias que forman el sitio de unión al receptor de Gang están ubicadas en B₂.

El dominio de unión al receptor de SV2 normalmente puede originarse a partir de cualquier serotipo de BoNT de unión al receptor SV2 y sus subtipos, y en particular a partir de los serotipos de BoNT A, D, E y F. En las modalidades específicas anteriores y todos los ejemplos a continuación, el

dominio de unión al receptor de SV2 se origina en BoNT/A, pero como apreciará la persona experta, cualquier serotipo que comprenda un dominio de unión al receptor de SV2 puede usarse como el origen para dicho dominio, de acuerdo con el propósito y el uso previsto del H_C/TAB de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

- 5 Parte del dominio de unión al receptor de SV2 está presente en el extremo H_{CN}. Por lo tanto, como consecuencia, la secuencia de H_{CN} puede originarse a partir de cualquiera de los serotipos de BoNT de unión al receptor de SV2 y sus subtipos. En las modalidades específicas anteriores y todos los ejemplos a continuación, el extremo H_{CN} se origina a partir de BoNT/A. Sin embargo, como apreciará la persona experta, siempre que el dominio de unión al receptor de SV2 sea funcional, la
- 10 secuencia H_{CN} también puede originarse a partir de cualquiera de los serotipos de BoNT C, D, E, F o G.

Además, de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, las secuencias que forman el sitio de unión al receptor de SV2 se encuentran en H_{CN} y en A₁ y A₃ en el H_{CC}.

- El sitio de unión al receptor de Syt puede originarse a partir de cualquier serotipo de BoNT de unión
- 15 al receptor de Syt y sus subtipos. En particular, el sitio de unión al receptor de Syt puede originarse a partir de los serotipos de BoNT B, quimera DC o G. De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, las secuencias que forman el sitio de unión al receptor de Syt se encuentran en B₁ y B₂.

- La presente invención también proporciona un polipéptido que comprende el H_C/TAB de acuerdo
- 20 con lo anterior. El polipéptido puede comprender, por lo tanto, cualquier otra proteína, polipéptido, secuencia de aminoácidos o sonda de fluorescencia, al ser acoplado al H_C/TAB directamente o a través de un enlazador. De aquí en adelante, una secuencia de proteína, polipéptido o aminoácido para ser acoplada al H_C/TAB se conoce como “proteína”.

- De acuerdo con una modalidad preferida, el polipéptido es un polipéptido de BoNT recombinante
- 25 (BoNT/TAB) que comprende además un H_N y un LC, así como también un sitio de exoproteasa colocado entre la LC y el H_N en la secuencia polipeptídica.

- El sitio de exoproteasa permite que el polipéptido de simple cadena sea escindido en una molécula de doble cadena, lo que causa que la molécula se convierta en una toxina activa. De acuerdo con una modalidad de la invención, el sitio de exoproteasa es un sitio de Factor Xa, aunque esto no es una
- 30 característica limitante del polipéptido de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una modalidad, el BoNT/TAB en su forma activa está de acuerdo con la SEQ. ID. No. 5. De acuerdo con otra modalidad, el BoNT/TAB en su forma activa está de acuerdo con

cualquiera de las secuencias de las SEQ. ID. Nos. 6, 8, 10 o 12. Preferiblemente, el BoNT/TAB en su forma activa está de acuerdo con la SEQ. ID. No. 12.

Tanto el H_N y la LC pueden, respectiva e independientemente, originarse a partir de cualquiera de los serotipos de BoNT A, B, C, D, DC, E, En, F, G o X y sus subtipos, así como también polipéptidos similares a BoNT. Han aparecido nuevas proteínas que se asemejan a BoNT, es decir, con una arquitectura de dominio similar y un grado variable de identidad de secuencia, pero producidas por otros organismos que *C.-botulinum*. Por lo tanto, la persona experta será capaz de elegir un H_N y/o una LC de cualquiera de los serotipos de BoNT, sus subtipos o polipéptidos similares a BoNT.

Las mutaciones y deleciones que se introducen en el H_C/TAB como se especificó anteriormente, además de asegurar que un BoNT/TAB diseñado pueda ser producido como una proteína soluble con la estructura correcta y la actividad requerida.

Un polipéptido de acuerdo con lo anterior se produce preferiblemente de forma recombinante así como el H_C/TAB necesita ser producido de forma recombinante.

Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de H_C/TAB o polipéptidos de acuerdo con lo anterior. Los ácidos nucleicos que codifican el H_C/TAB o los polipéptidos de la presente divulgación pueden ser ADN o ARN, bicatenarios o monocatenarios. En ciertos aspectos, se entiende que los ácidos nucleicos objeto que codifican los fragmentos de polipéptidos aislados incluyen ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que son variantes de cualquiera de los H_C/TAB o polipéptidos descritos en el presente documento. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas.

La presente invención también proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el H_C/TAB de acuerdo con lo anterior. El vector puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquier otra proteína o sonda que se produzca de forma recombinante junto con el H_C/TAB, para obtener dicha proteína o sonda acoplada al H_C/TAB en un polipéptido. El vector es preferentemente un vector de expresión. El vector puede comprender un promotor enlazado operativamente al ácido nucleico. Pueden usarse una variedad de promotores para la expresión de los polipéptidos descritos en el presente documento, y son conocidos por la persona experta en el campo técnico.

Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico puede transferirse a una célula huésped mediante técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección liposómica y precipitación con fosfato de calcio) y las células transfectadas luego se cultivan mediante técnicas

convencionales para producir los polipéptidos descritos en el presente documento. En algunas modalidades, la expresión de los polipéptidos descritos en el presente documento se regula por un promotor constitutivo, uno inducible o uno específico de tejido.

5 Los polipéptidos pueden producirse en cualquier célula, eucariota o procariota, o en levadura. Los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden producirse además en un sistema libre de células. La persona experta podrá aplicar fácilmente el sistema de expresión de elección a esa persona. El sistema de expresión usado para producir los polipéptidos de la invención no limita el alcance de la invención.

10 La purificación y modificación de proteínas recombinantes es bien conocida en la técnica de tal manera que el diseño del precursor de la poliproteína podría incluir una serie de modalidades fácilmente apreciadas por un trabajador experto.

La proteína a incluir en el polipéptido puede ser cualquier proteína de interés para ser transportada a una célula neuronal y/o internalizada en una célula neuronal.

15 Puede ser ventajoso comprender un H_N de acuerdo con lo anterior en el polipéptido junto con el H_C/TAB, y reemplazar la LC con la proteína de interés, si se desea una internalización de la proteína, como el H_N luego proporcionará un canal que permita que la proteína se transloque a la célula neuronal. Puede ser ventajoso acoplar la proteína de interés directamente al H_C/TAB si la superficie de la célula neuronal es el objetivo de la proteína. Por lo tanto, se pueden obtener las siguientes combinaciones, en dependencia de la entrega prevista:

- 20 i) Proteína - H_C/TAB
ii) Proteína - H_N - H_C/TAB
iii) Proteína – LC - H_N - H_C/TAB

25 Al acoplar una proteína de carga al H_C/TAB, de acuerdo con la i) anterior, la proteína de carga puede estar dirigida a la superficie neuronal. Probablemente se produciría cierta internalización a través de procesos de reciclaje regulares de la superficie celular, pero la superficie neuronal sería el objetivo principal de este enfoque.

30 Al acoplar una proteína de carga a un H_N acoplado al H_C/TAB de acuerdo con la ii) anterior, o al BoNT/TAB de acuerdo con la iii) anterior, dichas proteínas de carga pueden transportarse más eficazmente dentro de las neuronas mediante el uso del sistema de translocación de toxinas. Una vez que la toxina de BoNT se ha internalizado en la célula neuronal en las vesículas, como se describe en los antecedentes, el ambiente endosómico ácido en la vesícula provoca un cambio conformacional que permite la translocación de LC desde la vesícula al citosol de la célula. Por lo tanto, dicho sistema

de translocación de toxinas, que es el mecanismo para translocar la LC de BoNT desde la vesícula internalizada al citosol, puede usarse para translocar la proteína de carga mencionada anteriormente en el citosol de la célula neuronal, mediante el uso de BoNT/TAB. Una proteína de carga puede estar acoplada al H_N en lugar de la LC, con un sitio de exoproteasa colocado entre la proteína de carga y H_N como se describe anteriormente, o una proteína de carga puede estar acoplada a la LC. Ambas variantes permitirán un transporte de la proteína de carga al citosol de la célula neuronal.

Por lo tanto, tanto el H_C/TAB y BoNT/TAB pueden usarse como vehículos para transportar cualquier proteína hacia y/o dentro de una neurona. Esto también proporciona la posibilidad de usar el H_C/TAB y/o BoNT/TAB en una prueba farmacológica para investigar el papel de una proteína en, por ejemplo, un proceso sináptico.

La proteína de carga puede ser, por ejemplo, cualquier marcador de proteína, tal como marcadores o sondas de afinidad o fluorescentes. Por lo tanto, cualquier ácido nucleico correspondiente a dicho marcador de proteína puede incluirse en el vector divulgado anteriormente. La persona experta podrá usar métodos de clonación estándar para comprender cualquier gen de interés en el vector, así como también protocolos estándar para la expresión de proteínas.

El dominio de unión de BoNT y la proteína de carga podrían expresarse por separado con un sistema de sortasa que permita su recombinación post-traduccionalmente. La actividad transpeptidasa de sortasa puede, por lo tanto, usarse como una herramienta para producir proteínas de fusión in vitro y está bien dentro del conocimiento de una persona experta dentro de este campo técnico. En resumen, se añade un motivo de reconocimiento (LPXTG) al extremo C de una proteína de interés, mientras que se añade un motivo de oligo-glicina al extremo N de la segunda proteína a unir. Tras la adición de sortasa a la mezcla de proteínas, los dos péptidos se enlazan covalentemente a través de un enlace peptídico nativo. Este método puede usarse para producir un polipéptido de acuerdo con la presente invención. En el presente caso, esto significaría que el motivo de reconocimiento se añade al extremo C de la proteína de interés, y el motivo oligo-glicina se añade al extremo N del H_C/TAB o BoNT/TAB.

Además, el H_C/TAB y/o el BoNT/TAB pueden usarse en un método terapéutico o método cosmético. Típicamente, el uso de H_C/TAB y/o BoNT/TAB pueden ser muy similares a los usos que ya existen para los productos BoNT/A y/o BoNT/B. Estos incluyen métodos y tratamientos en donde el propósito del método y el tratamiento es enfriar y/o inactivar los músculos.

El H_C/TAB de acuerdo con la invención permite inyecciones de un BoNT/TAB que tiene una mayor afinidad por la célula y, en consecuencia, una mayor eficiencia. Por lo tanto, se requieren dosis más

bajas y es posible una acción de mayor duración. Por lo tanto, se puede inyectar una cantidad menor de BoNT/TAB en comparación con BoNT/A o BoNT/B para el mismo efecto, lo que disminuye los efectos adversos a medida que se propague menos BoNT/TAB desde el sitio de inyección. Con una mayor eficiencia, una unión más fuerte y más eficiente, y una dosis más baja requerida, hay menos

5 BoNT/TAB redundante disponible para extenderse más allá del sitio de inyección. Además, el BoNT podría administrarse con menos frecuencia con efecto sostenido, lo que también minimizaría el riesgo de una respuesta inmune y reacciones adversas como consecuencia de ello.

Condiciones médicas típicas que pueden tratarse y/o prevenirse con el H_C/TAB y/o BoNT/TAB de acuerdo con lo anterior son trastornos elegidos del grupo que comprende trastornos

10 neuromusculares, afecciones que implican la liberación de acetilcolina y trastornos musculares espásticos. Más específicamente, puede referirse a trastornos elegidos del grupo que comprende disfonía espasmódica, tortícolis espasmódica, distonía laríngea, disfonía oromandibular, distonía lingual, distonía cervical, distonía focal de la mano, blefaroespasma, estrabismo, espasmo hemifacial, trastorno de los párpados, parálisis cerebral, espasticidad focal y otros trastornos de la

15 voz, colitis espasmódica, vejiga neurogénica, anismo, espasticidad de extremidades, tics, temblores, bruxismo, fisura anal, acalasia, disfagia y otros trastornos del tono muscular y otros trastornos caracterizados por movimientos involuntarios de grupos musculares, lagrimeo, hiperhidrosis, salivación excesiva, secreciones gastrointestinales excesivas, trastornos secretores, dolor por espasmos musculares, dolor de cabeza, lesiones deportivas y depresión.

20 Con respecto a los métodos cosméticos, el H_C/TAB y/o BoNT/TAB pueden usarse preferentemente para prevenir y/o tratar arrugas, surcos de cejas o líneas no deseadas, para reducir dichas arrugas, surcos y líneas.

El H_C/TAB y/o BoNT/TAB de acuerdo con lo anterior pueden formularse en cualquier composición farmacéutica o cosmética adecuada. La composición farmacéutica que comprende el H_C/TAB y/o

25 BoNT/TAB puede comprender además excipientes, transportadores u otros aditivos farmacéuticamente aceptables. La composición cosmética que comprende el H_C/TAB y/o BoNT/TAB puede comprender además excipientes, transportadores u otros aditivos cosméticamente aceptables.

La administración de la composición farmacéutica o cosmética puede ser a través de inyección, en

30 donde la inyección se administra en el sitio del cuerpo donde está presente la actividad neuronal no deseada. Típicamente, las composiciones para la administración por inyección son soluciones en

tampón acuoso isotónico estéril. Donde sea necesario, la composición puede incluir además un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Además, la composición farmacéutica o cosmética puede estar comprendida en un estuche con instrucciones para la administración terapéutica de la composición. En cada estuche, los ingredientes

5 de la composición se pueden proporcionar separadamente, o mezclados conjuntamente, en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un contenedor herméticamente sellado tal como un ampolleta o bolsita, que indica la cantidad de agente activo. La composición puede administrarse por infusión, en ese caso puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la
10 composición se administra por inyección, una ampolleta de agua estéril para inyección o solución salina se puede proporcionar de manera que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración. Una composición para administración sistémica puede ser un líquido, por ejemplo, solución salina estéril, solución de Ringer o de Hank lactada. Además, la composición puede ser en formas sólidas y disolverse nuevamente o resuspenderse inmediatamente antes de usar. También se
15 contemplan formas liofilizadas. La composición puede estar contenida dentro de una partícula o vesícula lipídica, tal como un liposoma o microcristal, que también es adecuada para la administración parenteral.

Por lo tanto, los inventores han desarrollado un biohíbrido de BoNT diseñado para unirse simultáneamente a los tres, el receptor de SV2C, el receptor de sinaptotagmina y el receptor de
20 gangliósido. De esta manera, se proporciona un biohíbrido de BoNT que tiene una mayor potencia, eficacia y duración que los polipéptidos de BoNT de la técnica anterior. El uso del presente biohíbrido permite de esta manera la administración de dosis más bajas de la toxina que de acuerdo con la técnica anterior, mientras se mantiene el mismo efecto. Además, el uso del presente biohíbrido permite administraciones menos frecuentes que para las BoNT usadas previamente. Por lo tanto, un
25 tratamiento de un paciente con el biohíbrido de BoNT de la presente invención será más cómodo ya que la administración no tiene que ocurrir tan a menudo como en la técnica anterior.

Sección experimental

Materiales y Métodos

Constructos. El ADNc que codifica H_C y TriRecABTox de longitud completa (inactivo) (H_C/TAB y
30 BoNT/TAB, respectivamente) fueron optimizados con codones para la expresión en E. coli (véase información complementaria para la secuencia de ADN), sintetizados y clonados en un vector pET-28a(+) con un marcador de 6 X His N-terminal (GenScript, NJ, EE.UU.). El constructo

TriRecABTox usado en nuestro estudio tiene tres mutaciones en el sitio catalítico para evitar cualquier problema de seguridad (E224Q/R363A/Y366F) (Rossetto y otros, 2001; Binz y otros, 2002). El gen BoNT/TAB codifica para 1311 aminoácidos, y el gen de H_C/TAB corresponde a los residuos [875-1311].

- 5 Expresión y purificación de proteínas. Los plásmidos que portan el gen de interés se transformaron en células de *E. coli* BL21 (DE3) (New England BioLabs, EE.UU.). Se usó un protocolo similar para ambas proteínas. Las expresiones se llevaron a cabo al cultivar células en medio de caldo estúpido con 50 µg/mL de kanamicina a 37 °C durante aproximadamente 3 horas y luego se indujeron con una concentración final de 1 mM de IPTG, y se dejaron durante la noche a 18 °C, en un sistema LEX
- 10 (Epyphite3, Canadá). Las células se cosecharon y almacenaron a -80 °C. La lisis celular para la extracción de proteínas se realizó con un Emulsiflex-C3 (Avestin, Alemania) a 20 kPsi en HEPES 25 mM pH 7.2 con NaCl 200 mM, imidazol 25 mM y glicerol al 5 % (v/v). Los restos celulares se decantaron a través de ultracentrifugación a 4 °C, 267,000 g durante 45 minutos. La proteína se purificó primero por cromatografía de afinidad: el sobrenadante se cargó en una columna HisTrap
- 15 FF de 5 mL (GE Healthcare, Suecia), se lavó con HEPES 25 mM, pH 7.2, NaCl 200 mM, imidazol 25 mM y glicerol al 5 % (v/v), y la proteína eluyó con HEPES 25 mM pH 7.2, NaCl 200 mM, imidazol 250 mM y glicerol al 5 % (v/v). La muestra se dializó luego contra HEPES 25 mM pH 7.2, NaCl 200 mM y glicerol al 5 % (v/v) durante la noche, antes de una etapa de purificación por exclusión de tamaño final mediante el uso de una columna Superdex200 en un tampón similar (GE
- 20 Healthcare, Suecia). H_C/TAB se mantuvo a 4.5 mg/mL, y BoNT/TAB a 7.3 mg/mL, en HEPES 25 mM pH 7.2 con NaCl 200 mM, TCEP 0.025 mM y glicerol al 5 %.

- Caracterización de proteínas. Las muestras de proteínas se analizaron por electroforesis en gel mediante el uso de NuPAGE 4-12 % de geles Bis-Tris, y se realizaron las transferencias Western en membranas de PVDF (ThermoFisher, Suecia). Los anticuerpos primarios contra H_C/A y H_C/B se
- 25 prepararon internamente (obtenidos en conejo) y se sondearon con un anticuerpo anti-IgG-Peroxidasa anti-conejo (catálogo #SAB3700852, Sigma, Suecia). El marcador de polihistidina se sondeó mediante el uso de un anticuerpo monoclonal conjugado con HRP (AD1.1.10, catálogo #MA1-80218, ThermoFisher, Suecia). Se usó sustrato TMB (Promega, Suecia) para la detección. Los controles internos purificados de manera similar a H_C/TAB y que consisten en H_C/A y H_C/B
- 30 marcados con His se incluyeron para la comparación.

Activación de BoNT/TAB. El TriRecABTox de longitud completa (inactivo) se diseñó con un sitio de escisión del Factor Xa (IEGR) entre las cadenas ligeras y pesadas para la activación en forma de

doble cadena. La activación se realizó al incubar 100 µg de BoNT/TAB con 2 µg de Factor Xa (New England BioLabs, EE.UU.) durante la noche a 4 °C. Los resultados de la activación se analizaron por electroforesis en gel (como anteriormente).

- Clonación, expresión y purificación de SV2C-L4. La parte que interactúa del cuarto dominio luminal de la glicoproteína 2C de la vesícula sináptica (SV2C-L4, residuos 474-567 Uniprot ID Q496J9) se amplió a partir de ADNc y se clonó en un vector pNIC28-Bsa4 (marcador His6 N-terminal con sitio TEV) mediante el uso de clonación de LIC. El SV2CL4 se expresó en E. coli BL21 (DE3) (New England BioLabs, EE.UU.) mediante el uso de un protocolo similar al descrito anteriormente. El SV2C-L4 marcado con His se purificó por cromatografía de afinidad en una columna HisTrap HP de 2 mL (GE Healthcare, Suecia), se lavó con HEPES 20 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM, glicerol al 10 % (v/v), imidazol 50 mM y TCEP 0.5 mM. La proteína eluyó con HEPES 20 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM, glicerol al 10 % (v/v), imidazol 500 mM y TCEP 0.5 mM. El SV2CL4 se purificó luego por exclusión de tamaño mediante el uso de una columna Superdex 75 HiLoad 16/60 (GE Healthcare, Suecia) en HEPES 20 mM, pH 7.5, NaCl 300 mM, glicerol al 10 % (v/v) y TCEP 0.5 mM.
- 15 Cristalografía de rayos X. Las muestras para cristalización se prepararon por preincubación durante 15 minutos a temperatura ambiente de Hc/TAB a 3.6 mg/mL, con SV2C-L4 a 1 mg/mL (lazo 4 extracelular de SV2C humano recombinante [residuos 475-565], péptido hSyt1 1 mM (GEGKEDAFSKLKEKFMNELHK, sintetizado por GenScript, EE.UU.) y oligosacárido GD1a 4 mM (Elicityl, Francia).
- 20 Los cristales se cultivaron con 200 nL de muestra mezclada con 100 nL de solución de reserva que consiste en 20 % v/v de polietilenglicol 6000, citrato 0.1 M pH 5.0 (pantalla JCSG-plus B9, Molecular Dimensions, Reino Unido) mediante el uso de un conjunto de gotas de asentamiento e incubado a 21 °C. Los cristales aparecieron dentro de 2 semanas y se transfirieron a un circuito criogénico y se congelaron en nitrógeno líquido.
- 25 Los datos de difracción se recolectaron en la estación I04-1 de la Diamond Light Source (Didcot, Reino Unido), equipada con un detector PILATUS-6M (Dectris, Suiza). Se recopiló un conjunto de datos completo a 1.5 Å de un único cristal a 100 °K. Las imágenes de datos sin procesar se procesaron y escalaron con DIALS (Gildea y otros, 2014) y AIMLESS (Evans, 2006) mediante el uso del paquete CCP4 7.0 (CCP4, 1994).
- 30 El reemplazo molecular se realizó con un modelo preparado a partir de las coordenadas de Hc/A en complejo con SV2C-L4 (código PDB 4JRA) y de Hc/B en complejo con SytII de rata y GD1a (código en PDB 4KBB) para determinar las fases iniciales para la solución de estructura en PHASER

(McCoy y otros, 2007). Los modelos de trabajo se refinaron mediante el uso de REFMAC5 (Murshudov y otros, 2011) y se ajustaron manualmente con COOT (Emsley y otros, 2010). Se añadieron moléculas de agua en posiciones donde los picos de densidad de electrones $F_o - F_c$ excedieron 3σ , y se pudieron formar enlaces de hidrógeno potenciales. La validación se realizó con MOLPROBITY (Chen y otros, 2010). Las estadísticas de Ramachandran muestran que el 97.0 % de todos los residuos se encuentran en la región más favorecida, con un único valor atípico en la región no permitida. Las estadísticas de datos cristalográficos se resumen en la tabla 1. Las figuras se dibujaron con PyMOL (Schrödinger, LLC, EE.UU.).

10 Resultados

Diseño de TriRecABTox: una toxina botulínica diseñada con sitios de unión a tres receptores.

Para materializar el concepto de una toxina a tres receptores, los inventores primero analizaron la información estructural disponible sobre las interacciones moleculares de BoNT/A y /B con sus receptores. El trabajo reciente de Yao y otros (2016) y Benoit y otros (2014) proporcionaron las estructuras cristalinas de rayos X del dominio de unión al receptor de BoNT/A en complejo con SV2C con (PDB 5JLV) y sin modificación post-traducciona (PDB 4JRA), respectivamente. El dominio luminal de SV2C (lazo 4) forma una hélice β cuadrilátera que se asocia con H_C/A principalmente a través de interacciones de cadena principal a cadena principal con una cadena β abierta en la interfaz de los dos subdominios, mientras que el N-glicano de SV2C se extiende hacia H_{CN} (figura 1). Juntas, estas estructuras demostraron un modo de unión común a las dos formas de SV2 que también deberían extenderse a SV2A y SV2B glicosiladas (Yao y otros, 2016). Estos estudios destacaron los residuos clave y los múltiples sitios involucrados en la interacción toxina-SV2 que, por lo tanto, deben mantenerse en el diseño de TriRecABTox (figura 1). Estos incluyeron los segmentos [949-953], [1062-1066], [1138-1157] y [1287-1296] de BoNT/A. Los números de residuos se basan en la secuencia de BoNT/A1 (Uniprot-P10845).

También se han descrito varias estructuras cristalinas de BoNT/B en complejo con sinaptotagmina y han ayudado a definir la interacción de la toxina con su receptor (Chai y otros, 2006; Jin y otros, 2006; Berntsson y otros, 2013) (figura 1). Tras la unión, el péptido Syt adquiere una estructura helicoidal corta que se une a lo largo de un surco en la punta distal del subdominio C-terminal, que involucra directamente los segmentos [1113-1118] y [1183-1205] de BoNT/B. Los números de residuos se basan en la secuencia de BoNT/B1 (Uniprot-P10844). Por lo tanto, estas regiones se consideraron esenciales para incluir en el constructo TriRecABTox.

Adicionalmente, las estructuras cristalinas BoNT/A y /B en complejo con su receptor de gangliósido (Stenmark y otros, 2008; Hamark y otros, 2017; Bertnsson y otros, 2013) proporcionaron una descripción detallada del sitio de unión a carbohidratos para cada serotipo. El sitio está altamente conservado en toda la familia de neurotoxina botulínica y consiste en una cavidad poco profunda en el subdominio H_{CC} (figura 1) compuesto por el motivo central SxWY (1264-1267 en/A; 1260-1263 en/B) y las regiones de lazo circundantes. Notablemente, esta cavidad es adyacente al sitio de unión al receptor de Syt en BoNT/B, separado por el lazo [1244-1253], sin embargo, no se informó ningún efecto alostérico tras la unión simultánea de los dos receptores (Bertnsson y otros, 2013). En el interés de minimizar cualquier alteración estructural en el sitio de unión al receptor de Syt, se consideró más adecuado incorporar el sitio de unión al receptor de gangliósido de BoNT/B, en lugar de BoNT/A, en el diseño de TriRecABTox.

Después de la identificación de los componentes de los dos serotipos que son esenciales para la unión a los tres receptores diferentes, se realizó un análisis estructural adicional para integrarlos en una única molécula. En este sentido, las secuencias primarias de BoNT/A (Uniprot P10845) y BoNT/B (Uniprot P10844) se alinearon con ClustalO (Sievers y otros, 2011), y las estructuras tridimensionales de su dominio de unión fueron superpuestas (figura 1). Los dos serotipos comparten una identidad de secuencia general del 40 %, sin embargo, la similitud cae a 34 % para el subdominio C-terminal de H_C, la principal región responsable del reconocimiento del receptor. El pliegue central del dominio de unión se conserva en todas las neurotoxinas clostridiales (Swaminathan, 2011; Rummel y otros, 2011), pero con una variación notable en la longitud de los lazos de conexión. Por lo tanto, era importante tener en cuenta también las estructuras secundarias (figura 1), para mantener intacta la arquitectura principal del dominio. En consecuencia, el molde para la molécula de nuevo diseño apareció consecuentemente como múltiples alternancias entre los elementos BoNT/A y /B, al crear nuevas interfaces intramoleculares no naturales que pueden no ser compatibles. La inspección de las estructuras cristalinas superpuestas de H_C/A y H_C/B permitió a los inventores optimizar el diseño mediante la corrección de posibles conflictos, ya sea por sustituciones o deleciones de un único amino en ubicaciones clave (figura 2). En particular, se revisó la cadena lateral de cada residuo dentro de las áreas en conflicto, lo que resultó en tres sustituciones de BoNT/B por el aminoácido equivalente de BoNT/A: N1180, G1234, N1236 (SEQ. ID. No. 3). Adicionalmente, se eliminaron varios aminoácidos (figura 2) para hacer coincidir los elementos de la estructura secundaria y compensar las variaciones de longitud entre BoNT/A y /B en las regiones del lazo de las interfaces de transición. Se han realizado deleciones entre L1139 y G1140, así como

también entre G1234 y T1235 (en referencia a la SEQ. ID. No. 3), en comparación con las secuencias BoNT/A y BoNT/B (figura 2)

La molécula resultante, llamada TriRecABTox, debería ser capaz de unirse a los tres receptores: SV2, sinaptotagmina y gangliósidos. Su secuencia de proteínas se proporciona en la SEQ. ID. No. 3 (forma inactiva) y la SEQ. ID. No. 5 (forma activa).

Producción y caracterización del dominio de unión TriRecABTox.

La primera etapa hacia la caracterización de TriRecABTox fue producir de forma recombinante el dominio de unión (H_C/TAB) para analizar sus propiedades bioquímicas. Para este propósito, la secuencia de la proteína fue optimizada con codón para la expresión en *E. coli*. El gen resultante se clonó en un vector pET-28a(+) para incluir un marcador de poli-histidina N-terminal y facilitar el proceso de purificación de proteínas, los detalles se proporcionan en la sección de métodos. Los inventores demostraron que H_C/TAB podría expresarse y purificarse parcialmente (figura 3) mediante el uso de cromatografía de afinidad y técnicas de exclusión por tamaño (figura 11). La muestra original presentó algunos contaminantes de bajo peso molecular que probablemente corresponden a las proteínas residuales de la célula huésped. Las etapas de purificación adicionales que mediante el uso de métodos tal como cromatografía de intercambio iónico o interacción hidrofóbica, deberían ayudar a obtener una muestra de mayor pureza. La presencia del H_C/TAB marcado con His se confirmó por transferencia Western donde se observó una única banda en el tamaño esperado (aproximadamente 53kDa) (figura 3).

Estructura cristalina del dominio de unión TriRecABTox en complejo con sus tres receptores.

En un esfuerzo por evaluar la capacidad de H_C/TAB para unirse a sus tres receptores, se establecieron ensayos de cocrystalización que incluían H_C/TAB con el dominio luminal SV2C humano [residuos 475-565], el péptido Syt1 humano [residuos 34-53] y el carbohidrato GD1a. Se obtuvieron cristales que difractaban a alta resolución (1.5 Å) (figura 12) y se pudo recopilar un conjunto de datos completo (tabla 1). La estructura se resolvió por reemplazo molecular mediante el uso de un modelo de entrada con todos los componentes potenciales. La solución confirmó que la estructura cristalina contenía los cuatro elementos: H_C/TAB unido a sus tres receptores simultáneamente (denominado H_C/TAB-3R) (figura 4). Este resultado proporciona la primera evidencia experimental de que TriRecABTox puede lograr su propósito *in vitro*, y también permitió un análisis completo del mecanismo de unión al receptor en detalles atómicos. Mediante el uso de la información estructural recientemente determinada, podríamos comparar directamente la interacción entre H_C/TAB, H_C/A, H_C/B, y sus respectivos receptores.

Tabla 1. Cristalografía de rayos X: recolección de datos y estadísticas de refinamiento

Complejo H_C/TAB – SV2C – hSyt1 – GD1a	
Recolección de datos	
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones celulares	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	43.7, 115.9, 141.4
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>g</i> (°)	90.0, 90.0, 90.0
Resolución (Å)	1.5-60.4 (1.51-1.53)*
No. total/reflexiones únicas	3,583,212 / 113,806
<i>R</i> _{mezcla}	0.119 (1.926)*
<i>R</i> _{pim}	0.021 (0.501)*
CC _{1/2}	1.00 (0.839)*
<i>I</i> / <i>sI</i>	13.0 (1.1)*
Completamiento (%)	99.9 (97.2)*
Redundancia	31.5 (15.1)*
Refinamiento	
<i>R</i> _{trabajo} / <i>R</i> _{libre} (%)	17.4 / 22.1
No. de átomos	
H _C /TAB	3,682
SV2C	761
hSyt1	143
GD1a	56
Agua	446
<i>Factores</i> B	
H _C /TAB	27.4
SV2C	44.4
hSyt1	35.8
GD1a	36.8
Agua	40.2
Desviaciones r.m.s.	
Longitudes de enlace (Å)	0.009

*Los valores entre paréntesis son para la cubierta de mayor resolución.

En primer lugar, el dominio de unión del BoNT/TAB de nuevo diseño presenta el pliegue esperado con sus dos subdominios: el H_{CN} de tipo lectina y el pliegue trébol □ de H_{CC} (figura 4). Las múltiples interfaces intramoleculares nuevas creadas no perturbaron la estructura general, como lo ilustran la baja raíz de la desviación cuadrática media (rmsd, por sus siglas en inglés) de 0.69 Å (más de 364 Cα) cuando se superpone con H_C/A y de 0.81 Å (más de 370 Cα) con H_C/B. El H_C/TAB completo se modeló [876-1311] a excepción del marcador de poli-histidina N-terminal y el lazo [1169-1173] que estaban desordenados. La falta de densidad de electrones para estas partes puede explicarse por el hecho de que estas regiones no están involucradas en ninguna interacción y están ubicadas dentro de áreas accesibles al solvente del cristal.

La estructura de H_C/TAB-3R se comparó con la de H_C/A en complejo con SV2C. La estructura del dominio luminal SV2C es idéntica en ambos complejos, con un valor rmsd de 0.483 Å (más de 88 Cα). Las dos estructuras se alinearon en tres dimensiones en base a los dominios de H_C y mostró que SV2C está en la misma ubicación, como se esperaba a partir del diseño del inventor (figura 5). En particular, las regiones de H_C/A que se habían designado como necesarias para la unión al receptor de SV2 y se incluyeron en H_C/TAB están completamente preservados. La interfaz entre H_C/A y SV2C se analizaron con PISA (Kissinel, 2015) y corresponden a un área superficial de 540 Å² que involucra principalmente interacciones electrostáticas donde las cadenas abiertas de ambas proteínas forman una estructura complementaria de hoja □ (Benoit y otros, 2014). El análisis correspondiente con H_C/TAB muestra un área superficial con SV2C de 630 Å² y confirmó el mecanismo de unión con un número comparable de enlaces de hidrógeno. Además, los inventores también consideraron la posible unión al SV2 glicosilado al comparar H_C/TAB-3R con el complejo H_C/A-gSV2C (figura 5). Recientemente se demostró que la N-glicosilación de N559 es esencial para el reconocimiento del receptor y se conserva en las isoformas de SV2 (Yao y otros, 2016). Notablemente, la interacción proteína-proteína entre H_C/A y SV2C es muy similar con o sin glicosilación. La cadena de carbohidrato se extiende hacia el subdominio H_{CN}. El análisis de los residuos H_C/A involucrados en la interacción proteína-glicano muestra que su posición está completamente conservada en H_C/TAB-3R, por lo tanto H_C/TAB debería ser capaz de reconocer las isoformas N-glicosiladas de SV2.

Los inventores luego compararon la estructura de H_C/TAB-3R con la de H_C/B en complejo con rSyt2. Se espera que BoNT/B se una a la sinaptotagmina humana de manera similar a sus homólogos de

roedores, aunque con afinidades variables (Tao y otros, 2017). En la estructura cristalina presentada aquí, hSyt1 también adopta un arreglo helicoidal α que se encuentra dentro del mismo surco de unión que rSyt2 en H_C/B (figura 6). La superposición de hSyt1 con rSyt2 unido a sus respectivos dominios H_C confirman la configuración del péptido conservado con un valor rmsd de 0.560 Å (más de 13 C α). Adicionalmente, la cavidad de unión al receptor se conserva completamente en H_C/TAB, con todos los residuos involucrados en la unión al presentar una configuración similar en ambas estructuras (figura 6). Esto se confirmó con un análisis PISA donde una interfaz de 861 Å² se calculó para la interacción H_C/TAB:hSyt1 que también incluye once enlaces electrostáticos, y que es comparable a los 712 Å² de la interface H_C/B:rSyt2 (PDB 4KBB) con siete enlaces electrostáticos.

El mecanismo de reconocimiento se basa principalmente en fuertes interacciones hidrofóbicas proteína-proteína. La pequeña diferencia en el área superficial de contacto y el número de interacciones electrostáticas puede explicarse por la variación de secuencia entre hSyt1 y rSyt2, en particular hacia la mitad C-terminal del péptido.

El tercer receptor contenido en la estructura H_C/TAB-3R corresponde al carbohidrato GD1a, para el cual se observó una clara densidad de electrones desde Gal2 hasta Sia5 (figura 4). No se observó densidad de electrones para Glc1 y Sia6, como se puede esperar de los restos de carbohidratos flexibles que no interactúan. El sitio de unión al receptor de gangliósido se ha estudiado en detalle y la estructura cristalina de H_C/B en complejo con GD1a había confirmado la preferencia de este serotipo por el resto terminal Sia(α 2-3)Gal (Bertnsson y otros, 2013; Rummel, 2016). TriRecABTox fue diseñado para integrar la cavidad de unión H_C/B, y la comparación de las dos estructuras (figura 7) muestra que los residuos clave de la cavidad de unión (S1260, W1262, Y1263) están completamente conservados e interactúan con GD1a según la toxina nativa. La mayor parte del sitio de unión permanece sin cambios en comparación con el H_C/B unido a GD1a, con pocas excepciones notables. En H_C/TAB-3R, la cadena lateral de N1122 que se orienta en dirección contraria al ligando mientras que su H_C/B equivalente, N1105, crea un enlace de hidrógeno directo con Sia5. Esto está algo compensado por la posición de I1257 que muestra una interacción hidrofóbica más fuerte (a una distancia de 4.3 Å) con Sia5 en H_C/TAB-3R en comparación con I1240 en la estructura H_C/B:GD1a (donde están separados 7 Å).

En general, los resultados obtenidos a partir de la estructura cristalina de H_C/TAB-3R confirma que una única molécula TriRecABTox es capaz de unirse simultáneamente al receptor SV2, al receptor de sinaptotagmina y a sus receptores gangliósidos de una manera que replica los mecanismos de unión de los padres BoNT/A y /B.

Producción y caracterización del TriRecABTox de longitud completa inactivo.

Al tener establecida la capacidad de unión de H_C/TAB los inventores continuaron con la expresión y purificación de TriRecABTox de longitud completa, catalíticamente inactivo (BoNT/TAB; SEQ. ID. No. 3). Para este propósito, los inventores diseñaron un gen sintético que codifica para 1311 aminoácidos y que contiene los tres dominios funcionales BoNT, con LC y H_N correspondientes a los dominios BoNT/A, asociados con H_C/TAB. Se incluyeron tres mutaciones en el sitio catalítico por razones de seguridad (E224Q/R363A/Y366F) (Rossetto y otros, 2001; Binz y otros, 2002). Según el constructo H_C/TAB descrito anteriormente, la secuencia de la proteína se optimizó con codón para la expresión en *E. coli*, y se clonó en pET-28a(+) con un marcador de poli-histidina N-terminal. Los detalles se proporcionan en la sección de métodos. Los inventores mostraron que BoNT/TAB podría expresarse como una proteína soluble de aproximadamente 152 kDa. El método inicial usado para la purificación produjo una cantidad limitada de material no homogéneo (figura 8; figura 13), pero la purificación adicional mediante el uso de métodos tales como la cromatografía de intercambio iónico o interacción hidrofóbica debería ayudar a obtener material más puro y eliminar las proteínas residuales de la célula huésped visibles por electroforesis en gel. Tal método se usó recientemente para producir un constructo BoNT/B recombinante con más del 80 % de pureza (Elliot y otros, 2017).

Se realizó una caracterización adicional y se confirmó la presencia del marcador de histidina, y aunque la reacción con el anticuerpo de prueba fue muy débil en comparación con los controles (figura 8B), se pudo distinguir una banda débil en el tamaño correcto. El ensayo también mostró reacción cruzada con un contaminante de aproximadamente 70 kDa. Además, BoNT/TAB reaccionó de manera concluyente con los anti-sueros internos contra H_C/A (figura 8C) y H_C/B (figura 8C), como se esperaba, ya que debería contener epítomos de ambos dominios de unión.

Activación controlada de TriRecABTox.

BoNT/TAB se diseñó con un sitio de escisión del Factor Xa, IEGR [442-445], entre las cadenas ligeras y pesadas (figura 9A) ya que la activación en forma de doble cadena es necesaria para obtener una toxina completamente activa. La muestra de BoNT/TAB de longitud completa (SEQ. ID. No. 5) descrita anteriormente se usó para realizar un ensayo de activación. A pesar de la heterogeneidad de la muestra, se logró la activación completa después de la incubación de BoNT/TAB con Factor Xa, en una proporción de 1 µg de proteasa a 50 µg de toxina, durante la noche a 4 °C (figura 9B). La electroforesis en gel mostró la separación de BoNT/TAB en dos fragmentos de aproximadamente 100 y 50 kDa cuando se corrió en presencia de un agente reductor, que probablemente corresponde

a la HC y LC, respectivamente. Estas dos cadenas se mantienen unidas por un puente disulfuro entre el C430 y C458, lo que explica la banda única a aproximadamente 150 kDa en condición no reductora. Las bandas correspondientes a HC y LC también fueron visibles en la muestra no reductora y pueden haber sido causadas por algún nivel de reducción del puente disulfuro durante la preparación de la muestra, sin embargo, estas bandas claramente no eran visibles en el control no activado.

En total, el ensayo de activación primero proporcionó evidencia de que la proteína producida corresponde a la BoNT/TAB diseñada, y en segundo lugar, que la etapa de activación en una molécula de doble cadena podría manejarse con éxito. Por lo tanto, esta etapa puede incluirse en la producción de TriRecABTox de longitud completa activo.

Optimización de BoNT/TAB

Materiales y Métodos

Constructos. El ADNc que codifica H_C/TAB y las variantes se clonaron por GenScript (NJ, EE.UU.), en un vector pET28(a) como se describió anteriormente. BoNT/TAB2.1.3 se clonó en un vector pET29(a) por Toxogen GmbH (Hannover, Alemania).

Expresión y purificación de proteínas. Como se describió anteriormente para las variantes H_C/TAB. BoNT/TAB2.1.3 se produjo por Toxogen GmbH (Hannover, Alemania), con un protocolo similar al usado para H_C/TAB (cromatografía de afinidad y filtración en gel). Además, la activación y eliminación del marcador de BoNT/TAB2.1.3 se realizó con trombina a una concentración de 0.05 U/μg, y BoNT/TAB2.1.3 se purificó adicionalmente por filtración en gel. Las muestras se almacenaron en HEPES 25 mM, pH 7.2 con NaCl 200 mM y glicerol al 5 %.

Caracterización de proteínas. Como se describió anteriormente (electroforesis en gel mediante el uso de NuPAGE 4-12 % de geles Bis-Tris).

Cristalografía de rayos X. Las muestras para la cristalización se prepararon por preincubación durante 15 minutos a temperatura ambiente de H_C/TAB2.1 a 6.5 mg/mL, con SV2C-L4 a 1 mg/mL (lazo 4 extracelular de SV2C humano recombinante [residuos 475-565], péptido hSyt1 1 mM (GEGKEDAFSKLKEKFMNELHK, sintetizado por GenScript, EE.UU.) y oligosacárido GD1a 4 mM (Elicityl, Francia). Los cristales se cultivaron con 200 nL de muestra mezclada con 100 nL de solución de reserva que consiste en 20 % v/v de polietilenglicol 3350, citrato de potasio 0.2 M (pantalla JCSG-plus B12, Molecular Dimensions, Reino Unido) mediante el uso de un conjunto de gotas de asentamiento e incubado a 21 °C. Los cristales aparecieron dentro de 1 semana y se transfirieron a un circuito criogénico y se congelaron en nitrógeno líquido. Los datos de difracción

se recolectaron en la estación I04 de la Diamond Light Source (Didcot, Reino Unido), equipada con un detector PILATUS-6M (Dectris, Suiza). Se recopiló un conjunto de datos completo a 1.4 Å de un único cristal a 100 °K. Las imágenes de datos sin procesar se procesaron y escalaron con DIALS (Gildea y otros, 2014) y AIMLESS (Evans, 2006) mediante el uso del paquete CCP4 7.0 (CCP4, 1994).

El reemplazo molecular se realizó con la estructura de H_C/TAB determinada previamente en PHASER (McCoy y otros, 2007). Los modelos de trabajo se refinaron mediante el uso de REFMAC5 (Murshudov y otros, 2011) y se ajustaron manualmente con COOT (Emsley y otros, 2010). Se añadieron moléculas de agua en posiciones donde los picos de densidad de electrones Fo–Fc excedieron 3σ, y se pudieron formar enlaces de hidrógeno potenciales. La validación se realizó con MOLPROBITY (Chen y otros, 2010). Las estadísticas de Ramachandran muestran que el 97.0 % de todos los residuos se encuentran en la región más favorecida, con un único valor atípico en la región no permitida. Las estadísticas de datos cristalográficos se resumen en la tabla X1.

Producción de un H_C/TAB, H_C/TAB2.1 optimizado

La estructura cristalina de H_C/TAB unido a sus tres receptores se analizó para identificar sitios potenciales que podrían modificarse para mejorar la estabilidad y la función de la molécula.

En particular, el análisis de los factores de temperatura local (factor B) dentro de una estructura cristalina puede interpretarse como una indicación de la estabilidad local de una proteína, con un alto factor B que sugiere una región desordenada. De este análisis, un lazo en la interfaz entre los dos subdominios de H_C/TAB, ‘lazo 360’ marcado, que consiste en los residuos D357 a N362 (SEQ ID: No. 6), se consideró para la optimización (véase la figura 14). Los residuos G360 y N362 (SEQ ID. No. 1) se modificaron a sus residuos equivalentes en BoNT/B y mutados a P360 y Y362 respectivamente, para ser incorporados en la secuencia de un nuevo constructo marcado H_C/TAB2.1 (SEQ. ID. No. 6).

El plásmido para este nuevo constructo se preparó mediante mutagénesis dirigida al sitio (GenScript, EE.UU.) y se usó para la expresión recombinante de H_C/TAB2.1 en E. coli. El protocolo usado fue el mismo que para la producción de H_C/TAB (véase la sección del método original para expresión y purificación). Mostramos que H_C/TAB2.1 podría expresarse y purificarse parcialmente mediante el uso de cromatografía de afinidad y técnicas de exclusión por tamaño (figura 15). La muestra presentó algunos contaminantes de bajo peso molecular que probablemente corresponden a las proteínas residuales de la célula huésped. Las etapas de purificación adicionales que mediante el uso de

métodos tal como cromatografía de intercambio iónico o interacción hidrofóbica, deberían ayudar a obtener una muestra de mayor pureza.

El purificado H_C/TAB2.1 (SEQ. ID. No. 6) se usó en ensayos de cocrystalización con el dominio luminal de SV2C humano [residuos 475-565], el péptido Syt1 humano [residuos 34-53] y el carbohidrato GD1a. Se obtuvieron cristales que difractaban a alta resolución (1.4 Å) y se pudo recopilar un conjunto de datos completo (tabla 2). La estructura se resolvió por reemplazo molecular mediante el uso de la estructura cristalina de H_C/TAB unido a sus tres receptores (H_C/TAB-3R). La nueva estructura presentó todos los elementos ya visibles en H_C/TAB-3R y proporcionó evidencia experimental de que H_C/TAB2.1 puede unirse a los tres receptores simultáneamente, según H_C/TAB. El análisis del factor B mostró una estabilidad mejorada para el lazo ‘360’ (D357 a Y362; figura 14). En general, el comportamiento de H_C/TAB2.1 fue similar al de H_C/TAB, con ambos constructos lo que mostró perfiles comparables en términos de rendimiento y pureza.

Tabla X1. Cristalografía de rayos X: recolección de datos y estadísticas de refinamiento

Complejo H _C /TAB2.1 – SV2C – hSytI – GD1a	
Recolección de datos	
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones celulares	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	43.8, 117.5, 141.5
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>γ</i> (°)	90.0, 90.0, 90.0
Resolución (Å)	1.4-60.6 (1.40-1.56)*
No. total/reflexiones únicas	1,055,932 / 79,953
<i>R</i> _{mezcla}	0.084 (1.070)*
<i>R</i> _{pim}	0.024 (0.364)*
CC _{1/2}	0.99 (0.716)*
<i>I</i> / <i>σI</i>	16.0 (1.8)*
Completamiento (%)	95.1 (70.1)*
Redundancia	13.2 (9.3)*
Refinamiento	
<i>R</i> _{trabajo} / <i>R</i> _{libre} (%)	17.7 / 20.4
Desviaciones r.m.s.	

Longitudes de enlace (Å)	0.118
Ángulos de enlace (°)	1.60

*Los valores entre paréntesis son para la cubierta de mayor resolución.

5 Producción de una variante más soluble, H_C/TAB2.1.3

Con el fin de prepararse para el análisis funcional futuro de las variantes H_C/TAB, H_C/TAB2.1 se adaptó para ser compatible con un experimento de ligadura de sortasa descrito recientemente (Zhang y otros, 2017). Este experimento permite una reconstrucción segura y controlada de un BoNT de longitud completa activo que puede usarse para evaluar la actividad. Este constructo corresponde a un H_C/TAB2.1 truncado en el N-terminal con un N-terminal escindible marcado con His, y se marcó H_C/TAB2.1.1 (SEQ. ID. No. 8). El clon para H_C/TAB2.1.1 se preparó (GenScript), usó para la expresión y purificación como se describió anteriormente (figura 16). Mostramos que H_C/TAB2.1.1 podría expresarse y purificarse parcialmente mediante el uso de cromatografía de afinidad y técnicas de exclusión por tamaño. La muestra presentó algunos contaminantes de bajo peso molecular que probablemente corresponden a las proteínas residuales de la célula huésped. Las etapas de purificación adicionales que mediante el uso de métodos tal como cromatografía de intercambio iónico o interacción hidrofóbica, deberían ayudar a obtener una muestra de mayor pureza.

El análisis adicional de las características estructurales de H_C/TAB2.1 destacó la presencia de un lazo hidrofóbico expuesto a la superficie que sobresale del resto de la proteína (residuos 389-393, SEQ ID: No. 6; figura 14d). Además, este lazo se identificó recientemente como un elemento de unión a lípidos en BoNT/B y otros serotipos (Stern y otros, 2018). Presumimos que esta región hidrofóbica podría dificultar la solubilidad de H_C/TAB, por lo tanto, se diseñó un nuevo constructo en la que este lazo se truncó y se reemplazó con un motivo de doble asparagina para mejorar la solubilidad. Este constructo se marcó H_C/TAB2.1.3 (SEQ.ID. No. 10). El clon para H_C/TAB2.1.3 se preparó (GenScript), usado para la expresión y purificación como se describió anteriormente (figura 16). Mostramos que H_C/TAB2.1.3 podría expresarse y purificarse parcialmente mediante el uso de cromatografía de afinidad y técnicas de exclusión por tamaño. La muestra presentó algunos contaminantes de bajo peso molecular que probablemente corresponden a las proteínas residuales de la célula huésped. Las etapas de purificación adicionales que mediante el uso de métodos tal como cromatografía de intercambio iónico o interacción hidrofóbica, deberían ayudar a obtener una muestra de mayor pureza. Notablemente, H_C/TAB2.1.3 mostró mejor rendimiento de expresión y solubilidad en comparación con H_C/TAB2.1.1 (figura 16).

Producción de un BoNT/TAB2.1.3 de longitud completa activo

Para preparar para el análisis funcional futuro de BoNT/TAB, una variante activa de longitud completa basada en el constructo H_C/TAB2.1.3 se produjo y marcó BoNT/TAB2.1.3 (SEQ. ID. No. 12). Todas las etapas de la producción se realizaron en una instalación autorizada, bajo contrato, en Toxogen GmbH (Hannover, Alemania). BoNT/TAB2.1.3 se clonó en un vector pET29(a) e incluyó marcadores de Strep y poli-histidina C-terminal escindibles, así como también un sitio de escisión de trombina diseñado entre los dominios HC y LC (SEQ. ID. No. 13), para la activación del producto, como se describió anteriormente. BoNT/TAB2.1.3 podría expresarse como una proteína soluble, purificada y activada con trombina (figura 17). El método usado para la purificación incluía cromatografía de afinidad y filtración en gel, y condujo a un producto BoNT/TAB2.1.3 con >90 % de pureza.

Experimentos futuros

Ensayos de unión al receptor

Los ensayos se realizarán donde las propiedades de unión al receptor de BoNT/TAB se compararán con BoNT/A y/o BoNT/B.

Por ejemplo, se realizarán ensayos de unión al receptor de gangliósido que están adaptados de los métodos descritos previamente. Brevemente, en este ELISA, el receptor de gangliósido de interés (GT1b, GD1b, GD1a o GM1a) se inmoviliza en una microplaca de 96 pocillos (Chen y otros, 2008; Willjes y otros, 2013), las toxinas (o sus dominios de unión) luego se aplican, y el material unido se sondeó con un anticuerpo monoclonal anti poli-histidina conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Este enfoque cualitativo debería proporcionar suficiente información para confirmar que las características de unión al receptor de gangliósido de BoNT/TAB son similares a las de BoNT/B.

ELISA de unión al receptor de gangliósido. Los gangliósidos GT1b, GD1b, GD1a y GM1a se compran en Carbosynth (Compton, Reino Unido). Los gangliósidos se diluyen en metanol para alcanzar una concentración final de 2.5 µg/mL; se aplican 100 µL (0.25 µg) a cada pocillo de una placa de ensayo de PVC de 96 pocillos. Después de la evaporación del disolvente a 21 °C (durante la noche), los pocillos se lavan (3x) con 200 µL de PBS/BSA al 0.1 % (p/v). Los sitios de unión inespecíficos se bloquean por incubación durante 2 h a 21 °C en 200 µL de PBS/BSA al 2 % (p/v). Los ensayos de unión se realizan en 100 µL de PBS/BSA al 0.1 % (p/v) por pocillo durante 2 h a 4 °C que contienen las muestras (dilución en serie de 3 veces que varía de 6 µM a 0.003 µM). Después de la incubación, los pocillos se lavan 3x con PBS/BSA al 0.1 % (p/v) y luego se incuban con un anticuerpo anti-His HRP (ThermoFisher #MA1-80218) a una dilución 1:2000 (100 µL/pocillo)

durante 1 h a 4 °C. Finalmente, después de tres etapas de lavado con PBS/BSA al 0.1 % (p/v), las muestras unidas se detectan mediante el uso de Ultra TMB (100 µL/pocillo). La reacción finaliza después de la incubación durante 5 minutos a 21 °C mediante la adición de 100 µL de ácido sulfúrico 1M. La absorbancia a 450 nm se mide con Tecan Infinite 200 (Männedorf, Suiza). Los resultados se analizan con Prism (GraphPad, La Jolla, CA, EE.UU.), mediante el uso de un ajuste de unión no lineal.

Para evaluar las propiedades de unión al receptor de sinaptotagmina, se realizará una calorimetría de titulación isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés), de manera similar al ensayo descrito por Berntsson y otros (2013). La unión de los péptidos hSyt a las toxinas se medirá y debería proporcionar valores de afinidad (K_d) lo que confirma que BoNT/TAB puede unirse al receptor, de forma análoga a BoNT/B.

Calorimetría de titulación isotérmica. Las muestras se preparan mediante una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño adicional (Superdex200, GE Healthcare, Suecia) en fosfato de potasio 20 mM pH 7.0, NaCl 0.15 M. La asociación de péptidos Syt a BoNT o sus dominios de unión se mide en un ITC200 (GE Healthcare, Suecia) a 25 °C y 750 rpm. Se añade una solución de 200 µL de proteína (a 20 µM) a la célula. La unión se mide tras la adición del péptido (GenScript, EE.UU.) con 16 inyecciones escalonadas de 2.5 µL cada una, a una concentración de 200 µM. La primera titulación se establece en 0.5 µL y subsecuentemente se elimina en el análisis de datos. Los datos se analizan con el software Origin proporcionado por el fabricante

La unión a SV2C se evaluará mediante el uso de un ensayo desplegable tal como el descrito por Benoit y otros (2014). Brevemente, la toxina marcada y el receptor no marcado (o inversamente) se incubarán juntos y se cargarán en una Ni-sepharose, luego se lavarán y eluirán. Los resultados serán visualizados por SDS-PAGE.

Ensayo de puntuación de abducción de dígitos (DAS)

La potencia de la preparación de BoNT se puede evaluar mediante el uso de un ensayo de puntuación de abducción de dígitos (DAS) de ratón (Broide y otros, 2013). Este ensayo mide *in vivo* la eficacia local del debilitamiento muscular de la toxina después de la inyección intramuscular en el músculo esquelético de las extremidades posteriores del ratón o rata. La toxina provoca una disminución medible dependiente de la dosis en la capacidad del animal para producir una respuesta de sobresalto característica de la extremidad posterior. Este método no letal se ha usado regularmente para estimar las propiedades farmacológicas de diferentes serotipos o derivados de BoNT, tales como las moléculas de BoNT/B recombinantes recientemente descritas (Elliot y otros, 2017). Se usará una

metodología similar para evaluar la potencia y la duración del efecto de BoNT/TAB, en comparación con BoNT/A o/B.

Discusión

En este estudio, los inventores describieron cómo se usaron los detalles estructurales y moleculares del mecanismo de unión de BoNT/A y /B para diseñar una nueva molécula, TriRecABTox, que posee una capacidad de reconocimiento celular mejorada. Una rigurosa comparación multidimensional de las estructuras BoNT/A y /B permitió a los inventores identificar los elementos clave necesarios para mantener una armazón de toxina intacto en el que integrar los sitios de unión al receptor para SV2, sinaptotagmina y un gangliósido, en una única molécula. El diseño recién creado, que consiste de una alternancia de elementos BoNT/A y /B, se optimizó al incluir mutaciones o deleciones adaptativas para compensar las interfaces intramoleculares no naturales recién creadas. Dichas modificaciones se consideraron necesarias para garantizar que la toxina diseñada, BoNT/TAB, pudiera producirse como una proteína soluble con la estructura correcta y la actividad requerida.

Los inventores primero evaluaron la estabilidad del diseño al producir el dominio de unión por sí mismo, H_C/TAB, que posee la función de reconocimiento del receptor modificado, a través de la expresión recombinante en *E. coli*. El H_C/TAB se expresó con un marcador de polihistidina N-terminal como una proteína soluble que podría purificarse parcialmente, lo que demuestra, por lo tanto, la viabilidad del constructo diseñado. En una segunda etapa, los inventores procedieron a la producción del constructo BoNT/TAB de longitud completa, en una forma catalíticamente inactiva. Nuevamente, los inventores mostraron que podía expresarse como una proteína soluble de 153 kDa y parcialmente purificada con técnicas estándar de cromatografía líquida. La presencia del marcador de polihistidina en ambos H_C/TAB y BoNT/TAB permitieron su purificación por cromatografía de afinidad con una matriz de Ni-sepharose. Pueden usarse otros métodos de afinidad e incluyen un marcador de afinidad que debe colocarse preferentemente en el extremo N-terminal de la proteína para evitar la interferencia con la unión al receptor. Aunque la preparación inicial mostró una pureza de muestra heterogénea, la optimización del proceso de purificación debería conducir a un producto de estándares farmacéuticos. Debe añadirse que la forma activa de BoNT/TAB tendría una estructura general y propiedades de unión similares a la molécula inactiva usada en el presente estudio. Los inventores contrataron a Toxogen GmbH (Hannover, Alemania) para producir una versión activa de BoNT/TAB (BoNT/TAB2.1.3) que se purificó con éxito con un marcador C-terminal extraíble, para no interferir con la unión al receptor.

Además, la escisión postraducciona del BoNT de simple cadena en una molécula de doble cadena es una etapa esencial para la actividad de la toxina (DasGupta y Sathyamoorthy, 1985; Shone y otros, 1985). Mientras la toxina nativa generalmente es activada por una proteasa del huésped, cualquier producto BoNT recombinante debe procesarse con una exopeptidasa. Los primeros trabajos sobre la toxina mostraron que la tripsina podría escindir BoNT/A de forma inespecífica a una forma de doble cadena activa (Shone y otros, 1985), sin embargo, esto puede provocar una degradación adicional no deseada de la toxina. Más recientemente, las tecnologías recombinantes han permitido la ingeniería de motivos específicos de reconocimiento de proteasas dentro de una proteína de interés, por lo tanto, proporciona un mejor control sobre la estrategia de activación de BoNT (Sutton y otros, 2005). Aquí los inventores incluyeron un sitio de Factor Xa entre LC y HC y observaron la activación completa de la toxina, lo que demuestra, por lo tanto, la efectividad de esta enzima. La producción futura de BoNT/TAB debe incorporar una etapa de purificación que permite la activación de la toxina, seguida de la eliminación de la exoproteasa del producto final. Mientras el Factor Xa parece adecuado, se pueden analizar otras enzimas y demostrar que logran con éxito un rendimiento aceptable de activación. Los inventores contrataron a Toxogen GmbH (Hannover, Alemania) para producir una versión activa de BoNT/TAB (BoNT/TAB2.1.3) que se activó con éxito con la exoproteasa de trombina y se purificó hasta la homogeneidad.

Como un medio para verificar la integridad estructural de H_C/TAB y confirmar su funcionalidad mejorada, los inventores cocrystalizaron la muestra purificada en complejo con SV2C humano, Syt1 humano y el carbohidrato GD1a. La estructura cristalina de rayos X del complejo se resolvió a alta resolución (1.5 Å) y proporcionó evidencia experimental concluyente de que una única molécula de H_C/TAB podría unirse a los tres receptores simultáneamente. Además, la comparación con las estructuras conocidas de H_C/A y H_C/B con sus respectivos receptores mostró que H_C/TAB sigue un mecanismo de unión casi idéntico.

Mientras la estructura cristalina demostró que H_C/TAB podría cumplir su propósito, al menos *in vitro*, se necesitan realizar experimentos bioquímicos adicionales para caracterizar completamente sus propiedades de unión al receptor. Estos incluirán ensayos desplegable e ITC con los receptores de proteínas y ELISA de unión al receptor de gangliósido. Se espera que BoNT/TAB se desempeñe de manera similar a BoNT/A para la unión al receptor de SV2, y de manera similar a BoNT/B con respecto a la unión al receptor de gangliósido y al receptor de sinaptotagmina. Adicionalmente, los experimentos *in vivo* proporcionarán las principales indicaciones sobre el verdadero potencial de BoNT/TAB como un terapéutico. El ensayo DAS de ratón se ha usado clásicamente para evaluar las

preparaciones de BoNT (Broide y otros, 2013) y debería permitir a los inventores determinar la eficacia y la duración de la acción de nuestra molécula en comparación con los productos disponibles actualmente.

Adicionalmente, el diseño de BoNT/TAB puede optimizarse aún más al modificar algunos
5 elementos de secuencia para mejorar sus propiedades bioquímicas y su estabilidad. Dichas alteraciones pueden incluir deleciones o mutaciones que conducen a un BoNT soluble que aún puede unirse simultáneamente a tres receptores. Los inventores produjeron con éxito una variante más estable (H_C/TAB2.1) y una variante más soluble con mayor rendimiento de producción (H_C/TAB2.1.3).

10 Debe añadirse que desde una perspectiva de seguridad, BoNT/TAB no representa una nueva amenaza ya que se deriva de dos serotipos existentes. Se espera que sea reconocido por las antitoxinas disponibles actualmente, tal como la Antitoxina del Botulismo Heptavalente BAT u otros antídotos aprobados para BoNT/A y /B.

Los serotipos A y B son los únicos BoNT aprobados disponibles en el mercado. Mientras BoNT/A
15 es la toxina principal usada terapéuticamente, las moléculas con menor inmunogenicidad y alta eficacia proporcionarían alternativas más seguras (Naumann y otros, 2013). Se han realizado múltiples intentos para mejorar las propiedades de las BoNT para aumentar su potencial farmacológico (Masuyer y otros, 2014). Un ejemplo exitoso reciente incluye el estudio de Tao y otros (2017) donde las mutaciones diseñadas en posiciones clave de BoNT/B (E1191M/S1199Y) le
20 dieron a la toxina una mayor afinidad por el receptor humano de sinaptotagmina 2, y mostraron una eficacia aproximadamente 11 veces mayor en el bloqueo de la neurotransmisión en comparación con el tipo salvaje. Otro enfoque para mejorar la eficacia de BoNT fue adoptada por Elliott y otros (2017) donde analizaron el efecto de una única mutación (S201P) que se sabe que aumenta la actividad catalítica de BoNT/B en su sustrato. En este caso, el mutante BoNT/B no presentó ninguna ventaja
25 sobre el tipo salvaje en múltiples ensayos basados en células e in vivo. En total, estos dos estudios sobre BoNT/B sugieren que la etapa limitante en la eficacia de la toxina reside en el reconocimiento neuronal inicial en lugar de la actividad intracelular posterior.

Estudios anteriores que pretendían combinar las propiedades de unión de un serotipo con la actividad catalítica de otro condujeron al diseño de moléculas quiméricas donde se intercambiaron dominios
30 enteros (Wang y otros, 2008, 2012; Rummel y otros, 2011). Más particularmente, Rummel y otros (2011) y Wang y otros (2012) diseñaron y probaron moléculas análogas que consisten del dominio H_C/B asociado con los dominios H_N+ LC de BoNT/A. Se informó que estas toxinas recombinantes

muestran una potencia mejorada e indujeron un efecto más prolongado en ratones en comparación con el tipo salvaje BoNT/A (Kutschenko y otros, 2017). Se obtuvieron observaciones similares al evaluar un constructo que consiste del subdominio C-terminal (H_C) de BoNT/B junto con los dominios complementarios del serotipo A (es decir, $LC+H_N+H_{Cn}$), y que mostró una potencia cuatro veces mayor en comparación con el tipo salvaje (Rummel y otros, 2011). Todas las moléculas descritas anteriormente tenían en común el hecho de que solo reconocerían los dos receptores de BoNT/B, sinaptotagmina y gangliósido. Estos resultados sugieren que se puede obtener un efecto prolongado y una mayor eficacia gracias a una mayor ingesta de LC/A permitida por la mayor prevalencia de los receptores de BoNT/B en las neuronas. Además, estas moléculas quiméricas no tuvieron en cuenta los posibles choques intramoleculares entre dominios que pueden surgir a partir de la combinación de dominios de diferentes serotipos, y que pueden afectar el potencial de estos productos.

Al tener en cuenta los resultados de los últimos estudios sobre ingeniería de BoNT, parece claro que modificar el reconocimiento celular inicial es una de las vías más eficientes para mejorar las propiedades farmacológicas del producto terapéutico. Por lo tanto, BoNT/TAB, un único producto diseñado con éxito para reconocer el receptor de SV2 junto con los receptores de BoNT/B, sinaptotagmina y gangliósido, representa un gran potencial y aún podría ser más eficaz que el BoNT/A y /B de tipo salvaje.

La principal innovación en BoNT/TAB es el diseño del dominio de unión que permite múltiples interacciones del receptor. La evidencia actual sugiere que la asociación de H_C /TAB con los dominios de translocación y catalíticos de BoNT/A debería proporcionar la molécula con la mayor potencia (como se diseñó en BoNT/TAB). Sin embargo, H_C /TAB aún puede ser de interés cuando se combina con los dominios funcionales de otros serotipos (figura 10a). Además, H_C /TAB también puede combinarse con otras proteínas de interés (figura 10b) para usarse como una herramienta farmacológica para investigar procesos sinápticos. Los ensayos *in vivo* a realizar con BoNT/TAB deben aclarar su utilidad para tal fin.

REFERENCIAS

Benoit RM, Frey D, Hilbert M, Kevenaar JT, Wieser MM, Stirnimann CU, McMillan D, Ceska T, Lebon F, Jaussi R, Steinmetz MO, Schertler GF, Hoogenraad CC, Capitani G, Kammerer RA. 2014. Structural basis for recognition of synaptic vesicle protein 2C by botulinum neurotoxin A. *Nature*. 505:108-111.

- Bentivoglio AR, Del Grande A, Petracca M, Ialongo T, Ricciardi L. 2015. Clinical differences between botulinum neurotoxin type A and B. *Toxicon*. 107:77-84.
- Berntsson RP, Peng L, Dong M, Stenmark P. 2013. Structure of dual receptor binding to botulinum neurotoxin B. *Nat Commun*. 4:2058.
- 5 Binz T, Bade S, Rummel A, Kollewe A, Alves J. 2002. Arg(362) and Tyr(365) of the botulinum neurotoxin type a light chain are involved in transition state stabilization. *Biochemistry* 41:1717–1723.
- Binz T, Rummel A. 2009. Cell entry strategy of clostridial neurotoxins. *J Neurochem*. 109:1584–1595.
- 10 Broide RS, Rubino J, Nicholson GS, Ardila MC, Brown MS, Aoki KR, Francis J. 2013. The rat Digit Abduction Score (DAS) assay: a physiological model for assessing botulinum neurotoxin-induced skeletal muscle paralysis. *Toxicon*. 71:18-24.
- Chai Q, Arndt JW, Dong M, Tepp WH, Johnson EA, Chapman ER, Stevens RC. 2006. Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature*. 444:1096-1100.
- 15 Chen C, Baldwin MR, Barbieri JT. 2008. Molecular basis for tetanus toxin coreceptor interactions. *Biochemistry*. 47:7179-7186.
- Chen S. 2012. Clinical uses of botulinum neurotoxins: current indications, limitations and future developments. *Toxins (Basel)*. 4:913-39.
- Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. 2010. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D*66:12–21.
- 20 Proyecto Colaborativo Computacional, Número 4. 1994. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D*50:760–763.
- DasGupta BR, Sathyamoorthy VS. 1985. Separation, purification, partial characterization and comparison of the heavy and light chains of botulinum neurotoxin types A, B, and E. *J Biol Chem* 260:10461–10466.
- 25 Dong M, Richards DA, Goodnough MC, Tepp WH, Johnson EA, Chapman ER. 2003. Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell Biol*. 162:1293–303.
- 30 Dong M, Yeh F, Tepp WH, Dean C, Johnson EA, Janz R, Chapman ER. 2006. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science*. 312:592-596.

- Dressler D, Bigalke H. 2005. Botulinum toxin type B de novo therapy of cervical dystonia: frequency of antibody induced therapy failure. *J Neurol.* 252:904-907.
- Elliott M, Maignel J, Liu SM, Favre-Guilmarc C, Mir I, Farrow P, Hornby F, Marlin S, Palan S, Beard M, Krupp J. 2017. Augmentation of VAMP-catalytic activity of botulinum neurotoxin serotype B does not result in increased potency in physiological systems. *PLoS One.* 12:e0185628.
- 5 Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D*66:486–501.
- Evans P. 2006. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D*62:72-82.
- Gildea RJ, Waterman DG, Parkhurst JM, Axford D, Sutton G, Stuart DI, Sauter NK, Evans G, Winter
10 G. 2014. New methods for indexing multi-lattice diffraction data. *Acta Crystallogr.* D70:2652–2666.
- Hamark C, Berntsson RP, Masuyer G, Henriksson LM, Gustafsson R, Stenmark P, Widmalm G. 2017. Glycans Confer Specificity to the Recognition of Ganglioside Receptors by Botulinum Neurotoxin A. *J Am Chem Soc.* 139:218-230.
- Hatheway CL. 1990. Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:66–98.
- 15 Jin R, Rummel A, Binz T, Brunger AT. 2006. Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature.* 444:1092-1095.
- Krissinel E. 2015. Stock-based detection of protein oligomeric states in jsPISA, *Nucl. Acids Res.* 43:W314-9.
- Kutschenko A, Reinert MC, Krez N, Liebetanz D, Rummel A. 2017. BoNT/AB hybrid maintains
20 similar duration of paresis as BoNT/A wild-type in murine running wheel assay. *Neurotoxicology.* 59:1-8.
- Lacy DB, Stevens RC. 1999. Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol.* 291:1091-104.
- Lange O, Bigalke H, Dengler R, Wegner F, deGroot M, Wohlfarth K. 2009. Neutralizing antibodies
25 and secondary therapy failure after treatment with botulinum toxin type A: much ado about nothing? *Clin. Neuropharmacol.* 32:213–218.
- Masuyer G, Chaddock JA, Foster KA, Acharya KR. 2014. Engineered botulinum neurotoxins as new therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 54:27-51.
- Mahrhold S, Rummel A, Bigalke H, Davletov B, Binz T. 2006. The synaptic vesicle protein 2C
30 mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett.* 580:2011-2014.
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. 2007. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40:658–674.

- Montal M. 2010. Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Annu Rev Biochem.* 79:591-617.
- Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, Winn MD, Long F, Vagin AA. 2011. Refmac5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D* 67:355–367.
- Naumann M, Boo LM, Ackerman AH, Gallagher CJ. 2013. Immunogenicity of botulinum toxins. *J Neural. Transm (Vienna).* 120:275-290.
- Nishiki T, Kamata Y, Nemoto Y, Omori A, Ito T, Takahashi M, Kozaki S. 1994. Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 269:10498–10503.
- Nishiki T, Tokuyama Y, Kamata Y, Nemoto Y, Yoshida A, Sato K, Sekiguchi M, Takahashi M, Kozaki S. 1996. The high-affinity binding of Clostridium botulinum type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. *FEBS Lett.* 378:253–257.
- Robert X, Gouet, P. 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucl. Acids Res.* 42, W320-W324.
- Rossetto O, Caccin P, Rigoni M, Tonello F, Bortoletto N, Stevens RC, Montecucco C. 2001. Active-site mutagenesis of tetanus neurotoxin implicates TYR-375 and GLU-271 in metalloproteolytic activity. *Toxicon* 39: 1151–1159.
- Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. 2014. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol.* 2014; 12:535-549.
- Rummel A, Mahrhold S, Bigalke H, Binz T. 2011. Exchange of the H(CC) domain mediating double receptor recognition improves the pharmacodynamic properties of botulinum neurotoxin. *FEBS J.* 278:4506-4515.
- Rummel A. 2013. Double receptor anchorage of botulinum neurotoxins accounts for their exquisite neurospecificity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 364:61-90.
- Rummel A. 2016. Two Feet on the Membrane: Uptake of Clostridial Neurotoxins. *Curr Top Microbiol Immunol.* Springer, Berlin, Heidelberg.
- Schengrund C. L., DasGupta B. R. y Ringler N. J. 1991. Binding of botulinum and tetanus neurotoxins to ganglioside GT1b and derivatives thereof. *J. Neurochem.* 57, 1024–1032.
- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. 2000. Neurotoxins affecting exocytosis. *Physiol. Rev.* 80:717–766.

- Shone CC, Hambleton P, Melling J. 1985. Inactivation of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin by trypsin and purification of two tryptic fragments. Proteolytic action near the COOH-terminus of the heavy subunit destroys toxin-binding activity. *Eur J Biochem* 151, 75–82.
- Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M,
5 Söding J, Thompson JD, Higgins DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7:539.
- Stenmark P, Dupuy J, Imamura A, Kiso M, Stevens RC. 2008. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b-insight into the toxin-neuron interaction. *PLoS Pathog.* 4:e1000129.
- 10 Strotmeier, J., Willjes, G., Binz, T. & Rummel, A. 2012. Human synaptotagmin-II is not a high affinity receptor for botulinum neurotoxin B and G: increased therapeutic dosage and immunogenicity. *FEBS Lett.* 586, 310–313.
- Sudhof TC, Rothman JE. 2009. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323, 474–477.
- 15 Sutton JM, Wayne J, Scott-Tucker A, O’ Brien SM, Marks PM, Alexander FC, Shone CC & Chaddock JA. 2005. Preparation of specifically activatable endopeptidase derivatives of *Clostridium botulinum* toxins type A, B, and C and their applications. *Protein Expr Purif* 40, 31–41.
- Swaminathan S. 2011. Molecular structures and functional relationships in clostridial neurotoxins. *FEBS J.* 278:4467-4485.
- 20 Takamizawa K., Iwamori M., Kozaki S., Sakaguchi G., Tanaka R., Takayama H. y Nagai Y. 1986. TLC immunostaining characterization of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin binding to gangliosides and free fatty acids. *FEBS Lett.* 201:229–232.
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y,
25 Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R. 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127:831–846.
- Tao L, Peng L, Berntsson RP, Liu SM, Park S, Yu F, Boone C, Palan S, Beard M, Chabrier PE, Stenmark P, Krupp J, Dong M. 2017. Engineered botulinum neurotoxin B with improved efficacy for targeting human receptors. *Nat Commun.* 8:53.
- 30 Wang J, Meng J, Lawrence GW, Zurawski TH, Sasse A, Bodeker MO, Gilmore MA, Fernández-Salas E, Francis J, Steward LE, Aoki KR, Dolly JO. 2008. Novel chimeras of botulinum neurotoxins

- A and E unveil contributions from the binding, translocation, and protease domains to their functional characteristics. *J Biol Chem.* 283:16993-17002.
- Wang J, Zurawski TH, Bodeker MO, Meng J, Boddul S, Aoki KR, Dolly JO. 2012. Longer-acting and highly potent chimaeric inhibitors of excessive exocytosis created with domains from botulinum neurotoxin A and B. *Biochem J.* 444:59-67.
- Wilhelm BG, Mandad S, Truckenbrodt S, Kröhnert K, Schäfer C, Rammner B, Koo SJ, Claßen GA, Krauss M, Haucke V, Urlaub H, Rizzoli SO. 2014. Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science* 344:1023–1028.
- Willjes G, Mahrhold S, Strotmeier J, Eichner T, Rummel A, Binz T. 2013. Botulinum neurotoxin G binds synaptotagmin-II in a mode similar to that of serotype B: tyrosine 1186 and lysine 1191 cause its lower affinity. *Biochemistry.* 2013 52:3930-3938.
- Yao G, Zhang S, Mahrhold S, Lam KH, Stern D, Bagramyan K, Perry K, Kalkum M, Rummel A, Dong M, Jin R. 2016. N-linked glycosylation of SV2 is required for binding and uptake of botulinum neurotoxin A. *Nat Struct Mol Biol.* 23:656-662.
- Zhang S, Masuyer G, Zhang J, Shen Y, Lundin D, Henriksson L, Miyashita SI, Martínez-Carranza M, Dong M, Stenmark P. 2017. Identification and characterization of a novel botulinum neurotoxin. *Nat Commun.* 8:14130.
- Stern D, Weisemann J, Le Blanc A, von Berg L, Mahrhold S, Piesker J, Laue M, Lippa PB, Dorner MB, Dorner BG, Rummel A. 2018. A lipid-binding loop of botulinum neurotoxin serotypes B, DC and G is an essential feature to confer their exquisite potency. *PLoS Pathog.* 14(5):e1007048.