

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 986**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/6897 (2008.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2014 E 17183975 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3270162**

54 Título: **Ensayo de toxina botulínica con sensibilidad mejorada**

30 Prioridad:

09.08.2013 US 201361864436 P

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

14.04.2021

73 Titular/es:

**BIOMADISON, INC. (100.0%)
1568 Luneta Drive,
Del Mar, CA 92014, US**

72 Inventor/es:

**TUCKER, WARD y
PIAZZA, TIM**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 818 986 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo de toxina botulínica con sensibilidad mejorada

5 Campo de la invención

El campo de la invención son los ensayos de proteasa relacionados con toxinas *botulínicas*.

Antecedentes

10 Las neurotoxinas *botulínicas* (BoNT) se producen por *Clostridium botulínica*, y se encuentran entre las toxinas más potentes conocidas. Estas toxinas son una fuente reconocida de intoxicación alimentaria, que a menudo resulta en daños graves o incluso la muerte de las víctimas. Hay siete neurotoxinas *botulínicas* o serotipos relacionados estructuralmente (BoNT/AG), cada uno de los cuales está compuesto por una cadena pesada (-100 KD) y una cadena ligera (-50 KD). La cadena pesada media la entrada de la toxina en una célula diana mediante endocitosis mediada por receptores. Una vez internalizada, la cadena ligera se transloca desde el lumen de la vesícula endosómica al citosol y actúa como una proteasa dependiente de zinc para escindir las proteínas que median la fusión de la membrana diana-vesícula ("proteínas sustrato").

20 Estas proteínas sustrato de BoNT incluyen la proteína sintaxina de la membrana plasmática, la proteína periférica de la membrana SNAP-25 y una sinaptobrevina de la proteína de la membrana de la vesícula (Syb). Estas proteínas se denominan colectivamente como las proteínas SNARE (receptor de proteína de fijación soluble al factor sensible a N-etilmaleimida). La escisión de las proteínas SNARE bloquea la fusión de las vesículas con la membrana plasmática y anula la liberación de neurotransmisores en la unión neuromuscular. Entre las proteínas SNARE, la sintaxina y SNAP-25 usualmente residen en la membrana diana y, por tanto, se denominan t-SNARE, mientras que la sinaptobrevina se encuentra exclusivamente en vesículas sinápticas dentro de la sinapsis y se denomina v-SNARE. Juntas, estas tres proteínas forman un complejo que se cree que es la maquinaria mínima para mediar la fusión entre la membrana de la vesícula y la membrana plasmática. BoNT/A, E y C escinden SNAP-25, BoNT/B, D, F, G escinden sinaptobrevina (Syb), en sitios únicos pero diferentes. BoNT/C también escinde la sintaxina además de SNAP-25.

30 Debido a su amenaza como una fuente de intoxicación alimentaria y como armas de bioterrorismo, existe la necesidad de detectar las BoNT con sensibilidad y rapidez. Actualmente, el método más sensible para detectar toxinas es realizar un ensayo de toxicidad en ratones. Sin embargo, estos métodos suponen un gasto considerable y están sujetos a reglamentaciones relacionadas con la experimentación con animales.

35 Como resultado, existe un interés creciente en el desarrollo de alternativas a los métodos basados en animales para la caracterización de BoNT. Una alternativa atractiva es el uso de ensayos basados en células, que mantienen la internalización basada en receptores y la subsecuente escisión de la molécula de BoNT que generalmente está ausente en los ensayos in vitro convencionales. Tales ensayos basados en células utilizan células que expresan constructos que responden a la BoNT, en algunos casos al utilizar transferencia de energía de resonancia de Forster (FRET) y en otros casos al utilizar métodos sin FRET para proporcionar fluorescencia útil para la detección y caracterización de las BoNT. Se pueden encontrar ejemplos en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos núm. 2004/0,191,887 (de Chapman), la Solicitud de Patente de los Estados Unidos núm. 2006/0,134,722 (de Chapman), la Patente de los Estados Unidos núm. 7,208,285 (de Steward), la Patente de los Estados Unidos núm. 7,183,066 (de Fernandez-Salas), y la Solicitud de Patente de Estados Unidos núm. 2011/0,033,866 (de Atapattu). Para algunas aplicaciones, sin embargo, la sensibilidad de tales métodos basados en células puede faltar. Por ejemplo, la Solicitud de Patente de los Estados Unidos núm. 2006/0,134,722 (de Chapman) describe que el valor de EC50 del ensayo FRET basado en células para detectar BoNT está en el intervalo ≥ 10 pM.

50 La Solicitud de Patente Internacional núm. WO 2014/060373 (de Eisele) informó una potenciación de la sensibilidad de las células a la intoxicación con toxina *botulínica* permitiendo que ciertas células tumorales que habían sido preparadas para la diferenciación en células neuronales se diferenciaron en un medio de diferenciación de baja osmolaridad durante varios días a varias semanas antes de la exposición a la toxina. La sensibilidad se determinó mediante lisis de las células tratadas seguido de un método de transferencia Western dirigido hacia SNAP-25. Sin embargo, la utilidad de la transferencia Western como método cuantitativo se considera discutible y no se proporcionaron datos que demuestren la importancia estadística de las diferencias informadas.

60 Aunque se ha demostrado cierto éxito en la aplicación de ensayos FRET para la detección de BoNT, la sensibilidad del ensayo FRET para las BoNT ha sido todavía inconveniente para muchos propósitos. Tan solo 40 nanogramos de BoNT es una dosis letal para la mayoría de las personas, y las muestras que se sospecha que contienen BoNT suelen ser antes de la aplicación al proceso de prueba. Por lo tanto, es altamente conveniente tener métodos que detecten concentraciones bajas de BoNT.

Resumen de la Invención

65 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de acuerdo con la reivindicación 1.

Breve descripción de Los Dibujos

- 5 Las **Figuras 1A, 1B y 1C** muestran la respuesta de las células transfectadas a la toxina *botulínica* y fragmentos de la misma a diferentes temperaturas. La Figura 1A muestra la respuesta de las células transfectadas a la holotoxina *botulínica* a diferentes temperaturas. La Figura 1B muestra la respuesta de las células transfectadas a holotoxina *botulínica* o a la cadena ligera de la toxina *botulínica* a diferentes temperaturas. La Figura 1C muestra la respuesta de las células transfectadas a la holotoxina *botulínica* en presencia de la cadena pesada de la toxina *botulínica* a diferentes temperaturas.
- 10 La **Figura 2** muestra la respuesta de las células transfectadas a la toxina *botulínica* a diferentes temperaturas de exposición antes de la toxina (es decir, cultivo) y temperaturas de exposición a la toxina (es decir, ensayo).
- 15 La **Figura 3A y 3B** muestran el efecto de la fuerza iónica de los medios sobre la respuesta de las células transfectadas a las toxinas *botulínicas* a diferentes temperaturas. La Figura 3A muestra la respuesta de las células transfectadas en un medio que tiene una fuerza iónica de 270 mM. La Figura 3B muestra la respuesta de las células transfectadas a la toxina *Botulínica* en un medio que tiene una fuerza iónica de 250 mM.
- 20 Las **Figuras 4A y 4B** mostrar los efectos de las temperaturas elevadas en la respuesta de las células transfectadas a la toxina *botulínica* y en ausencia de toxina *botulínica*. La Figura 4A muestra la respuesta de las células transfectadas a la toxina *botulínica* a temperaturas de hasta 41 °C. La Figura 4B muestra microfotografías de campo claro y fluorescencia de la respuesta de las células transfectadas a temperaturas de hasta 41 °C en ausencia de toxina *botulínica*.
- 25 La **Figura 5** muestra el efecto del aumento de temperatura en un ensayo basado en células para la toxina BoNT/E.
- 30 Las **Figuras 6A a 6C** muestran el efecto de los medios con concentración reducida de sodio en los ensayos basados en células para toxina *botulínica* no de acuerdo con la presente invención. La Figura 6A muestra el efecto del uso de medios patentados con diferentes concentraciones de NaCl añadido. La Figura 6B muestra microfotografías de las células transfectadas expuestas a medios de cultivo personalizados que contienen diferentes concentraciones de Na-Cl.
- 35 La **Figura 7** muestra la respuesta de las células transfectadas a la toxina *botulínica* en medios con diferentes concentraciones de sodio y en diferentes puntos de tiempo después de la exposición a la toxina no de acuerdo con la presente invención.
- 40 Las **Figuras 8A, 8B y 8C** muestran el resultado de la exposición de las células transfectadas a la toxina *botulínica* en medios con contenido reducido de sodio durante diferentes períodos de tiempo antes de la restauración de las concentraciones normales de sodio no de acuerdo con la presente invención. La Figura 8A muestra los efectos cuando las células transfectadas se cultivan en medios convencionales antes de la exposición a la toxina *botulínica*. La Figura 8B muestra los efectos cuando las células transfectadas se cultivan en medios con bajo contenido de sodio antes de la exposición a la toxina *botulínica*.
- 45 Las **Figuras 9A y 9B** muestran el resultado de la reducción de la concentración de bicarbonato de sodio en los medios usados en ensayos basados en células para toxina *botulínica* no de acuerdo con la presente invención. La Figura 8A muestra las curvas de dosis/respuesta en medios con diferente concentración de bicarbonato de sodio. La Figura 8B muestra el efecto sobre las EC50 calculadas a partir de tales curvas de dosis/respuesta en función de la concentración de bicarbonato de sodio en el medio. La Figura 8C muestra el efecto de la preincubación con medios convencionales o medios con contenido reducido de sodio antes de la realización de un ensayo basado en células para toxina *botulínica* en medios con bajo contenido de sodio.
- 50 La **Figura 10** muestra el efecto de reemplazar sodio con potasio en medios personalizados usados en ensayos basados en células para toxina *botulínica*, y en la reducción de las concentraciones de sodio y potasio en aquellos medios no de acuerdo con la presente invención.
- 55 La **Figura 11** muestra el efecto de aumentar la osmolaridad de los medios con bajo contenido de sodio usados en ensayos basados en células para toxina *botulínica* no de acuerdo con la presente invención.
- 60 Las **Figuras 12A y 12B** muestran los efectos de los fragmentos de toxina *botulínica* e holotoxina *botulínica* intacta en células transfectadas en medios con contenido de sodio reducido no de acuerdo con la presente invención. La Figura 12A muestra el efecto de añadir la cadena pesada recombinante de la toxina *botulínica* a las células transfectadas antes de la exposición a la holotoxina. La Figura 12B muestra el efecto de añadir cadenas ligeras recombinantes de la toxina *botulínica* a las células transfectadas y el efecto de añadir holotoxina *botulínica* intacta a las células transfectadas.
- 65 Descripción detallada

El objeto de la invención proporciona métodos para mejorar la sensibilidad de los métodos basados en células para detectar la presencia de una toxina *botulínica* (BoNT) de acuerdo con la reivindicación 1. Se han desarrollado una variedad de ensayos para toxinas *botulínicas* que utilizan células transfectadas que expresan constructos de detección escindibles por estas proteasas. En los ensayos basados en células, la unión específica de la cadena pesada de una toxina *botulínica* por los receptores de la superficie celular y seguida de una escisión específica de un constructo que incluye un sitio de escisión específico de la toxina *botulínica* por la cadena ligera de la toxina *botulínica* y la liberación subsecuente de un resto indicador (por ejemplo, una proteína fluorescente) del constructo proporcionan un alto nivel de especificidad. Sin embargo, los métodos de la técnica anterior carecen de la sensibilidad necesaria para aplicaciones importantes de tales ensayos, por ejemplo, pruebas ambientales. Esto es particularmente importante considerando el uso potencial de las toxinas *botulínicas* como armas biológicas.

A menos que el contexto indique lo contrario, todos los intervalos establecidos en la presente descripción deben interpretarse como que incluyen sus puntos finales, y los intervalos abiertos deben interpretarse que incluyen solo valores comercialmente prácticos. De manera similar, todas las listas de valores deben considerarse como inclusivas de los valores intermedios a menos que el contexto indique lo contrario.

Los ensayos basados en células requieren un entorno rígidamente controlado, utilizando concentraciones de iones fisiológicos, osmolaridad (es decir, 250-270 mOsm) y temperaturas mantenidas a nivel fisiológico.

Los métodos del concepto inventivo proporcionan una célula transfectada, que a su vez produce un constructo o proteína de fusión. Con respecto a las células transfectadas que expresan la proteína híbrida, generalmente se prefiere que la célula se transfecte de manera estable. No obstante, también se contempla la transfección transitoria. Se prefiere aún más típicamente que la célula transfectada sea una célula neuronal. Sin embargo, también se contemplan en la presente descripción muchas otras células no neuronales (que incluyen células de mamíferos, células de insectos, levaduras, bacterias y células artificiales). Más típicamente, las células expresarán constitutivamente la(s) proteína(s) híbrida(s), por lo tanto, están bajo elementos reguladores apropiados. En aspectos alternativos, también se puede inducir la expresión.

Muchas opciones de líneas celulares son adecuadas como la célula huésped para la presente invención. Preferentemente, la celda es de un tipo en el que el respectivo *botulínica* La toxina (BoNT) exhibe sus actividades tóxicas. En otras palabras, las células presentan preferentemente receptores de superficie celular adecuados, o permiten que la toxina se transloque al interior de la célula de manera suficientemente eficiente, y permiten que la toxina escinda el polipéptido sustrato adecuado. Los ejemplos específicos incluyen neuronas cultivadas primarias (por ejemplo, neuronas corticales, neuronas del hipocampo, neuronas motoras de la médula espinal, etc.); células PC12 o líneas celulares derivadas de células PC12; células cromafines de cultivo primario; líneas celulares de neuroblastoma cultivado (tal como la línea celular Neuro2A colinérgica murina), líneas celulares SK-N-SH adrenérgicas humanas, líneas celulares NS-26 y células madre (ver, por ejemplo, Foster y Stringer (1999), Genetic Regulatory Elements Introduced Into Neural Stem and Progenitor Cell Populations, Brain Pathology 9: 547-567). De manera similar, se pueden usar líneas celulares neuroendocrinas y derivadas de neuroendocrinas. Debe apreciarse, sin embargo, que en el caso de BoNT recombinantes o mutadas que se dirigen hacia tipos de células no neuronales, las células huésped pueden seleccionarse de líneas celulares con la especificidad correspondiente.

Los constructos o proteínas de fusión del concepto inventivo pueden incluir una porción que contiene un indicador y un sitio de escisión. El sitio de escisión puede actuar como un sustrato para la actividad proteasa asociada con una cadena ligera de la toxina *botulínica*. Tales células transfectadas pueden demostrar una transformación estable o una transformación transitoria. La escisión del sitio de escisión libera al menos una porción de la porción que contiene el indicador de un remanente del constructo. La región indicadora puede incluir una etiqueta o grupo indicador observable, tal como un fluoróforo que proporciona una fluorescencia observable. Los fluoróforos adecuados incluyen colorantes fluorescentes y pueden incluir proteínas fluorescentes tales como la Proteína Verde Fluorescente (GFP), Proteína Cian Fluorescente (CFP), Proteína Amarilla Fluorescente (YFP), Citrina, Venus, YPet, mStrawberry y/o proteína mCherry. En algunas modalidades, la proteína híbrida puede incluir múltiples fluoróforos, por ejemplo, un segundo fluoróforo. Tal un segundo fluoróforo puede estar ubicado dentro de la región indicadora o en una ubicación distal. Por ejemplo, el fluoróforo de la región indicadora (es decir, el primer fluoróforo) se puede ubicar próximo a un extremo de la proteína híbrida mientras que el segundo fluoróforo se puede ubicar próximo a un extremo diferente de la proteína híbrida. Alternativamente, tanto el primer fluoróforo como el segundo fluoróforo pueden estar dentro de la región indicadora. En dependencia de la naturaleza de la detección, el primer fluoróforo y el segundo fluoróforo pueden ser la misma especie de fluoróforo o pueden ser diferentes especies de fluoróforo. Por ejemplo, en un sistema de ensayo que utiliza detección de FRET, el primer fluoróforo y el segundo fluoróforo pueden ser especies de fluoróforo diferentes.

En una modalidad preferida del concepto inventivo, la región indicadora incluye uno o más fluoróforos de la misma especie, que pueden disponerse de manera que no se produzca homo-FRET en un grado significativo (es decir, menos del 5 % de transferencia de energía de resonancia de Forster). En otras modalidades, el constructo puede incluir fluoróforos de diferentes especies, que pueden disponerse de manera que no se produzca FRET en un grado significativo (es decir, menos del 5 % de transferencia de energía de resonancia de Forster). Esto se puede lograr, por ejemplo, al colocar los fluoróforos en o cerca de diferentes extremos del constructos. En tales modalidades, los

espectros de emisión de un primer fluoróforo pueden superponerse con los espectros de excitación de un segundo fluoróforo sin una transferencia de energía de resonancia de Forster significativa (es decir, menos del 5 %), sin embargo, la emisión de fluorescencia del primer fluoróforo no se reduce significativamente (es decir, menos de 5 %) mediante extinción y la emisión de fluorescencia del segundo fluoróforo no aumenta significativamente (es decir, más del 5 %) mediante tal transferencia de energía. En otras modalidades del concepto inventivo, el constructo puede incluir un primer fluoróforo con un espectro de emisión que se superpone con el espectro de excitación de un segundo fluoróforo, con la posición de los fluoróforos dentro del constructo dispuesta de manera que se produzca una transferencia de energía de resonancia de Forster significativa (es decir, > 5 %) entre los fluoróforos. La fluorescencia de un constructo del concepto inventivo puede detectarse por cualquier medio adecuado para la configuración del constructo, por ejemplo, incluyendo la excitación y emisión directa de cada especie fluorescente, FRET y anisotropía de fluorescencia. En una modalidad preferida, se puede usar un fluorómetro de placa de micropocillos convencional configurado para la detección de excitación y emisión directa de cada especie de fluoróforo.

La proteína verde fluorescente y sus mutaciones, que fluorescen sin necesidad de cofactores o sustratos adicionales, son particularmente adecuados para su uso con constructos del concepto inventivo. Por ejemplo, la proteína amarilla fluorescente (YFP) es una mutación de la Proteína Verde Fluorescente, derivada de *Aequorea victoria*, y tiene un pico de excitación a 514 nm y un pico de emisión a 527 nm. Además de YFP, también se contempla el uso de proteínas relacionadas Citrina, Venus e YPet que pueden usarse en la porción que contiene el indicador. Estas mutaciones han reducido la sensibilidad al cloruro, maduración más rápida y un mayor brillo (producto del coeficiente de extinción y el rendimiento cuántico) en relación con GFP. Por supuesto, cualquiera de las proteínas fluorescentes mencionadas en la presente descripción puede modificarse para incluir características específicas (por ejemplo, espectrales) o truncarse a un tamaño específico. También se contempla que la porción que contiene el indicador incluye indicadores distintos de proteínas fluorescentes (por ejemplo, un compuesto fosforescente, un compuesto luminiscente, un cromóforo, una enzima, etc.).

En algunas modalidades del concepto inventivo, la señal de detección se caracteriza antes de la exposición de las células transfectadas a la toxina *botulínica* (BoNT), para proporcionar una señal basal. Esta señal basal puede servir como una base para la comparación con una señal del ensayo obtenida después de la exposición de las células transfectadas a la toxina *botulínica*, y puede servir para normalizar tal una señal de ensayo para corregir al menos parcialmente las variaciones en el número, densidad y/o forma de células entre diferentes sitios de prueba. Por ejemplo, el uso de una relación entre una señal de posterior a la exposición y la señal de basal puede servir para normalizar la intensidad de la fluorescencia entre ensayos realizados en diferentes pocillos de una placa de micropocillos, reduciendo así la variación entre mediciones similares. La sensibilidad se puede evaluar mediante la preparación de una serie de tales ensayos utilizando diferentes concentraciones de toxina *botulínica* para generar una curva de dosis/respuesta, que típicamente es sigmoidea. La sensibilidad se puede cuantificar al determinar la concentración de toxina *botulínica* que genera una respuesta que se correlaciona con una porción definida de la curva de respuesta a la dosis. Por ejemplo, La concentración *botulínica* que se correlaciona con el punto medio o el valor medio máximo de la curva de dosis/respuesta (normalmente informado como la EC50) se puede usar como una base para comparar la sensibilidad en tales ensayos.

Se pueden usar muchos métodos diferentes para medir la sensibilidad a la toxina *botulínica* mediante el uso de un ensayo basado en células. En una modalidad, se puede medir una relación de emisión de una primera proteína fluorescente y una segunda proteína fluorescente que no forman un par FRET (es decir, demuestran menos de aproximadamente 5 % de transferencia de energía a través de FRET) después de exponer la célula transfectada a la toxina *botulínica*. En tal una modalidad, antes de la exposición del híbrido a la toxina *Botulínica*, el constructo exhibe una señal basal, y la emisión de la primera proteína fluorescente y la emisión de la segunda fluorescente se miden por separado. Después de la exposición a la toxina *botulínica*, la porción que contiene el indicador que comprende la primera proteína fluorescente es escindida por la toxina *botulínica*, y la porción escindida que contiene el indicador se degrada subsecuentemente mediante proteólisis. En tal un ejemplo, la intensidad de emisión de la primera proteína fluorescente disminuye, mientras que la intensidad de emisión de la segunda proteína fluorescente permanece esencialmente igual. La emisión medida de esta segunda proteína fluorescente es, por tanto, una función del número de células, la densidad, la distribución, etc., y no es una función de la concentración de la toxina *botulínica*. Como tal, la emisión de la segunda proteína fluorescente puede usarse para normalizar la emisión medida desde un fluoróforo de la región indicadora (en este caso, la primera proteína fluorescente), por ejemplo, mediante el uso de una relación de emisión. Debe apreciarse que tal relación de emisión es inefectiva para la normalización de datos en constructos en las que los fluoróforos están dispuestos para realizar FRET, ya que las emisiones de ambos fluoróforos cambiarían con la escisión de tal un constructo. La relación de emisión (emisión de la primera proteína fluorescente/emisión de la segunda proteína fluorescente) disminuye cuando el constructo interactúa con la toxina *botulínica*. Un ejemplo de un constructo adecuado en tal una modalidad es uno que incluye la Proteína Cian Fluorescente (CFP) fuera de la región indicadora y en el que la región indicadora incluye la Proteína Amarilla Fluorescente (YFP), configurada de manera que la CFP y YFP no forman un par de FRET. Datos relacionados con el grado de degradación de YFP (es decir, emisiones de YFP y emisiones de CFP directamente excitadas por separado) después de la exposición a una toxina *botulínica* se pueden recolectar de una célula que exprese tal constructo. Esas emisiones pueden restarse del basal y dividirse la emisión de YFP por la emisión de CFP para controlar la densidad celular y la expresión del indicador en las células individuales.

La emisión sensible a la toxina *botulínica* de un fluoróforo de una región indicadora o una relación de emisión se puede usar para generar una curva de dosis respuesta que es útil para cuantificar la toxina *botulínica* en una muestra y/o para determinar la sensibilidad de un ensayo a la toxina *botulínica*. Tal sensibilidad se expresa frecuentemente como una concentración de la BoNT correspondiente a una porción característica de la curva de dosis/respuesta. Por ejemplo, una concentración de BoNT correspondiente al punto medio de tal una curva se denomina como EC₅₀.

En un ejemplo, las células transfectadas se exponen a la toxina *botulínica* a una temperatura elevada en relación con aquella a la que normalmente se realiza el cultivo celular y tales ensayos (es decir, 37,0 °C). Debe apreciarse que tales temperaturas generalmente se consideran no óptimas para la supervivencia celular y que su uso es contrario a la intuición en ensayos que se basan en el uso de células viables. En una modalidad preferida, la temperatura a la que las células transfectadas se exponen a la toxina *botulínica* es tal que la sensibilidad aumenta al menos dos veces (es decir, por un factor de 2) en relación con un ensayo realizado a 37,0 °C (es decir, la EC₅₀ del ensayo realizado a temperatura elevada es menos de la mitad de la EC₅₀ del ensayo realizado a 37,0 °C). Sorprendentemente, los inventores han descubierto que tal una potenciación de la sensibilidad se produce dentro de un intervalo de temperaturas relativamente estrecho. En algunos ejemplos, las células transfectadas se exponen a la toxina *botulínica* de 38,0 °C a 41,0 °C. En otros ejemplos, las células transfectadas se exponen a la toxina *botulínica* a una temperatura entre 38,5 °C y 39,5 °C.

Alternativamente, las células transfectadas se pueden mantener a temperaturas superiores a 37,0 °C antes de la exposición a la toxina *botulínica*, por ejemplo 38,0 °C a 41,0 °C o 38,5 °C y 39,5 °C. En tales modalidades, la exposición de las células transfectadas a la toxina *botulínica* se puede realizar a 37,0 °C. Alternativamente, en algunos ejemplos, las células transfectadas pueden exponerse a temperaturas superiores a 37,0 °C (por ejemplo, 38,0 °C a 41,0 °C o 38,5 °C y 39,5 °C) tanto antes como durante la exposición a la toxina *botulínica*. De acuerdo con la presente invención, la temperatura de las células transfectadas aumenta durante la realización del ensayo. Por ejemplo, la temperatura de las células transfectadas puede comenzar a 37,0 °C en el punto de introducción de la toxina *botulínica* y luego aumentar (por ejemplo, a 41,0 °C) a medida que avanza el ensayo. Alternativamente, en algunas modalidades, la temperatura de las células transfectadas puede comenzar a una temperatura elevada (por ejemplo, 41,0 °C) en el punto de introducción de la toxina *botulínica* y reducirse a 37,0 °C durante el transcurso del ensayo.

En modalidades del concepto inventivo, un ensayo basado en células que detecta la presencia de la toxina *botulínica* puede tener un aumento de al menos dos veces en la sensibilidad a la toxina *botulínica* con un cambio de condiciones (por ejemplo, temperatura, osmolaridad, concentración de iones extracelulares, etc.). En un ejemplo, la sensibilidad a la toxina *botulínica* aumenta al menos tres veces cuando la célula transfectada se expone a la toxina *botulínica* a una temperatura superior a 37,0 °C, dentro de un intervalo de 38 °C a 41 °C, o dentro de un intervalo de 38,5 °C a 39,5 °C en comparación con la sensibilidad a la toxina *botulínica* a 37,0 °C. En otro ejemplo, la sensibilidad aumenta al menos cinco veces cuando la célula transfectada se expone a la toxina *botulínica* a una temperatura superior a 37,0 °C, dentro de un intervalo de 38 °C a 41 °C, o dentro de un intervalo de 38,5 °C a 39,5 °C en comparación con la sensibilidad a la toxina *botulínica* a 37,0 °C. En otros ejemplos más, la sensibilidad aumenta al menos diez veces cuando la célula transfectada se expone a la toxina *botulínica* a una temperatura superior a 37,0 °C, dentro de un intervalo de 38 °C a 41 °C, o dentro de un intervalo de 38,5 °C a 39,5 °C en comparación con la sensibilidad a la toxina *botulínica* a 37,0 °C.

También se cree que la osmolaridad reducida de un medio celular en el que la célula transfectada se expone a la BoNT también puede potenciar la sensibilidad a la BoNT. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, los inventores creen que la osmolaridad extracelular reducida puede resultar en una modulación de la actividad celular (por ejemplo, excitabilidad neuronal). Especialmente, en las células neuronales, la osmolaridad reducida potencia la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal, lo que aumenta la tasa de endocitosis. Por tanto, se contempla que una reducción en la osmolaridad de un medio celular en el que la célula transfectada se expone a la toxina *botulínica*, por ejemplo en un intervalo entre 220 miliOsm y 260 miliOsm puede conferir un aumento en la sensibilidad a la toxina *botulínica*. Debe apreciarse que tal una modificación es contraria a la intuición, ya que tales condiciones pueden afectar negativamente la viabilidad celular. Además, también se contempla que la osmolaridad reducida del medio celular puede potenciar, por ejemplo de una manera sinérgica, una sensibilidad aumentada a la toxina *botulínica* que resulta de una temperatura superior a 37,0 °C.

En otra modalidad, una sensibilidad aumentada a la toxina *botulínica* se puede lograr al disminuir la concentración de iones extracelulares específicos, por ejemplo, calcio libre (es decir, no en complejos o no quelado). Cuando la concentración de calcio extracelular cae por debajo del nivel fisiológico normal, la célula transfectada puede ser progresivamente más excitable. Similar a la osmolaridad reducida, el aumento de la excitabilidad celular puede potenciar la tasa de endocitosis y así potenciar la internalización de una toxina *botulínica* aplicada. Por tanto, también se contempla que la reducción de la concentración de calcio por debajo del nivel fisiológico (1,0 - 1,5 mM) puede conferir un aumento similar en la sensibilidad a la toxina *botulínica*. De manera similar, la adición de quelantes de calcio (por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etil-ene-glicoltetraacético (EGTA), éster tetra(acetoximetil) de ácido 1,2-bis-(2-aminofenoxy)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA/AM) y otros ácidos orgánicos) a los medios celulares pueden conferir aumentos similares en la sensibilidad a la toxina *botulínica*.

En otro ejemplo más no de acuerdo con el concepto inventivo, un aumento en la sensibilidad de un ensayo basado en células para una toxina *botulínica* aumenta cuando se reduce la concentración de iones de sodio del medio de cultivo

celular utilizado durante la realización del ensayo. Por ejemplo, se pueden preparar medios de cultivo celular con sales de sodio, por ejemplo NaCl y/o NaHCO₃, omitidas de la formulación. Tales medios de cultivo celular pueden tener una concentración final de iones de sodio de menos de aproximadamente 70 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 25 mM o aproximadamente 20 mM. En una modalidad preferida del concepto inventivo, el medio de cultivo celular usado para realizar un ensayo de toxina *botulínica* basado en células es menor o igual a aproximadamente 20 mM.

En la realización de un ensayo basado en células, las células que expresan un constructo sensible a *botulínica* como se describe anteriormente se puede preincubar con un medio de cultivo de bajo contenido de iones de sodio antes de la exposición a la toxina *botulínica*, luego poner en contacto con un medio de cultivo de bajo contenido de iones de sodio que contiene toxina *botulínica* (por ejemplo, de una muestra añadida). En modalidades preferidas de la invención, las células no se exponen a un medio de cultivo de bajo contenido de iones de sodio antes de la exposición de las células más allá de un breve intercambio o lavado (es decir, varios minutos) con medio de cultivo de bajo contenido de iones de sodio antes de entrar en contacto con la toxina *botulínica*.

En algunas modalidades no de acuerdo con el concepto inventivo, los iones de sodio en los medios de cultivo celular pueden ser reemplazados por otros iones que no muestran el efecto de los iones de sodio (por ejemplo, iones de potasio) o por otros agentes modificadores de la osmolaridad (por ejemplo, N-óxido de trietil-amina) para retener la osmolaridad fisiológica de los medios de cultivo celular al tiempo que proporciona la potenciación de la sensibilidad obtenida por la reducción en la concentración de iones de sodio.

Debe apreciarse que pueden combinarse temperatura elevada, osmolaridad media reducida, concentración extracelular reducida de iones específicos (por ejemplo, iones sodio) y proteína adicional, y que tales combinaciones pueden ejercer un efecto sinérgico. Por ejemplo, los inventores han descubierto sorprendentemente que la temperatura elevada durante la exposición de las células transfectadas a la toxina *botulínica* y el uso de medios con osmolaridad reducida tiene un efecto sinérgico en la mejora de la sensibilidad de un ensayo basado en células.

Se han identificado varios serotipos de toxina *botulínica* (BoNT) con diferentes especificidades de sustrato y sitios de escisión específicos, incluidos BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C, BoNT/D, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G y una BoNT/H propuesta. En algunas modalidades del concepto inventivo, un método de potenciación de la sensibilidad puede ser selectivo para una especie específica de BoNT. Por ejemplo, el uso de un medio de cultivo celular con bajo contenido de sodio puede dar como resultado una sensibilidad potenciada para un ensayo basado en células para BoNT/A, pero tiene poco efecto sobre la sensibilidad de un ensayo basado en células BoNT/E. En algunas modalidades del concepto inventivo, esta potenciación selectiva de la sensibilidad a una o más especies de BoNT se produce cuando se usa la misma línea celular que expresa el mismo constructo para caracterizar múltiples especies de BoNT.

Se contempla que un constructo del concepto inventivo pueda responder (es decir, actuar como un sustrato) para una o más de tales BoNT. De manera similar, se contempla que las células transfectadas que expresan las proteínas que portan el indicador híbrido/sitio de escisión pueden actuar como sustratos para BoNT recombinantes o modificadas con especificidad alterada y los serotipos y/o isoformas de BoNT aún no identificados responderán a los métodos del concepto inventivo. También se contempla que las células transfectadas que expresan proteínas con un indicador similar y diferentes porciones del sitio de escisión que responden a las neurotoxinas del tétano (TeNT) pueden mostrar aumentos similares en la sensibilidad a la TeNT respectiva cuando se aplican los métodos del concepto inventivo.

En un ejemplo, las temperaturas superiores a 37,0 °C significativamente y los medios de cultivo celular con una concentración baja de iones de sodio (es decir, menos de aproximadamente 70 mM) potencian la sensibilidad de la línea celular modelo BOCELL™ a la neurotoxina *botulínica* tipo A (BoNT/A). Tal una línea celular se describe en el documento núm. WO2012/166943.

Las BoNT reconocen el sitio de escisión y escinden la proteína híbrida en la porción que contiene el indicador y el remanente de la proteína híbrida. La secuencia del sitio de escisión de la presente invención puede comprender ventajosamente (a) una proteína, motivo o muteína SNARE (o una porción escindible de éstos). Se entiende que las proteínas SNARE incluyen SNAP-25, sinaptobrevina (VAMP) y syntaxina. Las "muteínas" de una proteína deben interpretarse en la presente descripción como que tienen al menos 30 % de identidad con una proteína nativa correspondiente, incluidas, por ejemplo, composiciones que tienen al menos 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad con la proteína nativa. Las variaciones de la identidad pueden comprender cualquiera o más de adiciones, deleciones y sustituciones. Las muteínas contempladas incluyen fragmentos, truncados y proteínas de fusión.

Sin desear estar ligado a la teoría, los inventores creen que el aumento observado de la sensibilidad a la toxina *botulínica* a temperaturas más altas podría ser una consecuencia de un aumento de la unión específica y endocitosis de la toxina *botulínica*. En el ensayo basado en células, la BoNT debe internalizarse al citoplasma celular mediante endocitosis mediada por receptores. Por lo tanto, es posible que cualquier cosa que provoque que se internalice más BoNT y que interactúe con el sitio de escisión de las proteínas híbridas/constructos resultaría en que la célula transfectada sea más sensible a la BoNT. Como se muestra en la **Figura 1A**, que representa las curvas de dosis/respuesta obtenidas con la toxina *botulínica* a diferentes temperaturas, cambios relativamente pequeños de

temperatura producen un efecto sorprendentemente grande sobre la sensibilidad de un ensayo de toxina *Botulinica* (determinada por EC50). La **Figura 1B** muestra el resultado de estudios similares realizados mediante el uso de toxina *Botulinica* intacta (es decir, holotoxina) y la cadena ligera de la toxina *botulinica*, que tiene la actividad proteasa capaz de escindir el constructo indicador de la célula pero no tiene actividad de unión al receptor. La falta de cambio en la relación de emisión del constructo observada a temperaturas convencionales y elevadas cuando las células se exponen a la cadena ligera indica que los efectos de la temperatura no son un resultado de una endocitosis generalmente potenciada y son un resultado de procesos mediados por receptores. Esto está respaldado por los datos que se muestran en la **Figura 1C**, que muestra los efectos de diferentes temperaturas en las células transfectadas expuestas a toxina *botulinica* en presencia o ausencia de la cadena pesada de la toxina *botulinica*, que carece de la capacidad de escindir el constructo indicador, pero puede ocupar sitios receptores específicos de la toxina. La **Figura 1C** muestra que la cadena pesada de la toxina *Botulinica* es efectiva para bloquear los efectos de la holotoxina pero menos efectiva a temperatura elevada, lo que indica que el efecto de la temperatura de la sensibilidad del ensayo basado en células puede ser un proceso mediado por receptores.

La expresión aumentada de proteínas receptoras de toxina *botulinica* en la superficie de la célula transfectada pueden dar como resultado una endocitosis potenciada de la toxina *botulinica*. Por ejemplo, la toxina *botulinica* A, D y E se internalizan en el citoplasma celular mediante la interacción con proteínas de la vesícula sináptica (SV2) expresadas en la superficie celular. Por lo tanto, también se contempla que la coexpresión de la proteína SV2 en la célula transfectada pueda inferir un aumento similar en la sensibilidad a la toxina *botulinica*.

El aumento de la actividad de las proteínas de respuesta a estrés endógenas, que incluyen la Proteína de Choque Térmico 70 (HSP70) y la Proteína de Choque Térmico 90 (HSP90), a temperaturas más altas puede potencialmente inducir una sensibilidad potenciada a la toxina *botulinica*. Tanto HSP70 como HSP 90 se activan a temperaturas más altas que el intervalo de temperatura fisiológica (entre 35,0 - 37,0 °C) y potencian la actividad de proteólisis de la célula. Sin desear estar ligado a la teoría, se contempla que el aumento de la actividad de HSP70 o HSP90 puede facilitar la degradación de la porción de la proteína híbrida que contiene el indicador.

Aún más, un cambio conformacional de la proteína híbrida a la temperatura más alta, mediante el cual se puede aumentar la señal FRET basal, puede inducir una sensibilidad potenciada a la toxina *botulinica*. HSP70 funciona para ayudar al plegamiento correcto de las proteínas, y el aumento de la actividad de HSP70 puede inducir un cambio conformacional de la proteína híbrida. Por lo tanto, también se contempla que el tratamiento con activador de HSP70 (por ejemplo, YM1 cloruro de (2-((Z)-((E)-3-etil-5-(3-metilbenzo[d]tiazol-2(3H)-ilideno)-4-oxotiazolidin-2-iliden)metil)-1-metilpiridin-1-ilo, cloruro de 2-[3-etil-5-(3-metil-3H-benzotiazol-2-ilideno)-4-oxo-tiazolidin-2-ilidenmetil]-1-metil-piridinio)) a la célula transfectada puede inferir un aumento similar en la sensibilidad a la toxina *botulinica*.

Se contempla además que se pueden combinar varias condiciones descritas anteriormente para producir una sensibilidad potenciada adicionalmente a la BoNT en el ensayo basado en células. Por ejemplo, la fuerza osmótica reducida y la concentración de sodio reducida en el medio se pueden combinar para proporcionar potenciaciones adicionales de sensibilidad. Se contempla que tales combinaciones puedan producir efectos sinérgicos.

EJEMPLOS

Efectos de la Temperatura. Los ensayos basados en células para detectar la toxina *botulinica* (ensayo BOCELL™) se realizaron a 35,0 °C, 37,0 °C y 39,0 °C (Pruebas 1 y 2), y a 37 °C, 39 °C y 41 °C (Prueba 3) mediante el uso de la toxina *botulinica*/holotoxina A en concentraciones que oscilan entre 10-15 M a 10-9 M. Las células transfectadas se expusieron a una de las tres temperaturas mientras estaban expuestas a la toxina *botulinica*. Las curvas de dosis/respuesta se generaron caracterizando las relaciones de emisión (YFP/CFP) en cada concentración y graficándolas como una función de la concentración de toxina *botulinica*/A. Como se muestra en la **Figura 1A**, al aumentar la temperatura usada en el ensayo de 37 °C a 39,0 °C o 41 °C, la sensibilidad a la toxina *botulinica* (medida como un valor de EC50) se potencia más de 5 veces.

En los estudios descritos en la **Figura 1B** las células transfectadas se trataron con toxina *botulinica*/holotoxina A o cadena ligera de toxina *botulinica*/A y se incuban a 37,0 °C o 39,0 °C. La cadena ligera de la toxina *botulinica*/A retiene la capacidad de escindir el constructo de detección expresado por las células, pero carece de la capacidad de unirse al receptor de superficie celular específico utilizado por la holotoxina intacta. En estos estudios la cadena ligera de la toxina *botulinica*/A no escinde el sitio de escisión que contiene la porción del constructo indicador, incluso a altas concentraciones. Esto indica que la BoNT/A intacta experimenta un proceso de captación y activación de toxinas mediada por receptores dentro de la célula a 37,0 °C y 39,0 °C, y que la sensibilidad potenciada es un proceso mediado por receptores.

La confirmación de esto se encuentra en los estudios mostrados en la **Figura 1C**. Las células transfectadas se pretrataron con cadena pesada de la toxina *botulinica*/A o el vehículo equivalente antes de la adición de *botulinica* toxina/holotoxina A. La cadena pesada de la toxina *botulinica*/A carece de toxicidad (es decir, actividad proteolítica) y no puede escindir el constructo de detección expresado por la célula, pero se une a un receptor específico unido por la holoxina. La preincubación de las células transfectadas con la cadena pesada, que comprende el dominio de unión al

receptor, la captación de la toxina *botulínica*/holotoxina A y la escisión del indicador a 37,0 °C y 39,0 °C, lo que indica un requisito de endocitosis mediada por receptores de la holotoxina BoNT/A para la escisión del indicador a temperaturas elevadas.

5 Los efectos del pretratamiento de células mediante el uso de temperaturas elevadas se muestran en la **Figura 2**. Los ensayos basados en células para detectar BoNT (ensayo BoCell™) se realizaron a 35,0 °C, 37,0 °C y 39,0 °C, mediante el uso de toxina *botulínica*/holotoxina A en concentraciones que oscilan entre 10-15 M a 10-9 M. Las células transfectadas se expusieron a una de estas tres temperaturas antes de ser expuestas a la toxina *botulínica*, luego se expusieron a la misma o diferente temperatura entre las tres temperaturas durante la exposición. La sensibilidad a la
10 toxina *botulínica*, caracterizada como un valor de EC50 reducido, se potenció en las células transfectadas expuestas a la toxina *botulínica* a 39,0 °C. La sensibilidad a la toxina *botulínica* a 39,0 °C fue al menos 3 veces mayor que la sensibilidad a la toxina *botulínica* a 37,0 °C, y al menos más de 10 veces en comparación con la sensibilidad a la toxina *Botulínica* a 35,0 °C.

15 Los efectos de la temperatura elevada combinados con la osmolaridad reducida se muestran en las **Figuras 3A y 3B**. Los ensayos basados en células para detectar toxina *botulínica* (ensayo BO-CELL™) se realizaron a 35,0 °C, 37,0 °C y 39,0 °C, donde las células transfectadas se expusieron a la toxina *Botulínica* en un medio celular con una osmolaridad de aproximadamente 270 mOsm (es decir, osmolaridad normal). De acuerdo con las observaciones anteriores y como se muestra en la **Figura 3A**, la sensibilidad observada a la toxina *botulínica* a 39,0 °C aumenta hasta
20 aproximadamente 2 veces en comparación con la sensibilidad a 37,0 °C. Se realizaron estudios similares mediante el uso de un medio de cultivo celular por lo demás idéntico con una osmolaridad de menos de 250 mOsm. Los resultados se muestran en la **Figura 3B**. La sensibilidad a la toxina *botulínica* a 39,0 °C aumenta hasta aproximadamente 7 veces en comparación con la sensibilidad a la toxina *botulínica* a 37,0 °C. Sorprendentemente, la osmolaridad reducida tuvo un efecto relativamente pequeño a 37 °C y en realidad disminuyó la sensibilidad a 35 °C, lo que indica una interacción sinérgica entre la osmolaridad reducida y la temperatura elevada.
25

Como se muestra en la **Figura 4A**, el efecto de potenciar la sensibilidad de la temperatura elevada ocurre dentro de un intervalo estrecho de temperaturas. Los datos de fluorescencia de los ensayos basados en células realizados a temperaturas elevadas muestran una pérdida de señal de una proteína fluorescente del constructo a 41,0 °C en
30 comparación con temperaturas más bajas, lo que puede ser indicativo de una mala salud celular. Las imágenes de células transfectadas bajo microscopía de campo claro y fluorescencia confirman la mala salud celular a 41,0 °C, como se muestra en la **Figura 4B**. Las células transfectadas muestran una morfología mala a 41,0 °C (campo claro) y una disminución y difusión general de la proteína indicadora del constructo (YFP) a 41,0 °C.

35 La selectividad del efecto de la temperatura se muestra en la **Figura 5**. Los estudios de temperatura mostrados anteriormente representan los resultados del uso de BoNT/A y células transformadas que expresan un constructo que puede escindirse por BoNT/A. BoNT/A y BoNT/E, ambos escinden sitios dentro de SNAP-25, y un constructo indicador que incorpora SNAP-25 o una porción de SNAP-25 que incluye estos sitios de escisión puede potencialmente usarse en la detección de BoNT/A y BoNT/E. La **Figura 5** muestra los resultados de los ensayos basados en células para
40 BoNT/E que utilizan las células BOCELL™ descritas anteriormente. Sorprendentemente, a pesar de utilizar las mismas células y medios de cultivo celular, el uso de temperatura elevada dentro del intervalo que se consideró efectivo para potenciar la sensibilidad del ensayo de BoNT/A (es decir, 39 °C) resultó en una disminución en la sensibilidad para BoNT/E (que se muestra como un valor de EC50 elevado). Esto indica que el efecto de la temperatura puede ser selectivo para BoNT específicas.
45

Efectos de los Iones de Sodio. Los resultados de los estudios que muestran el efecto de la concentración reducida de cloruro de sodio (NaCl) se muestran en la **Figura 6A**. Se preparó un medio de cultivo celular basal personalizado que no contenía NaCl añadido. Las variaciones de este medio basal personalizado se prepararon al añadir NaCl a varias
50 concentraciones y los ensayos basados en células para toxina *botulínica*/A se realizaron mediante el uso de células BOCELL. Las células se incubaron durante 3 horas antes de la aplicación del medio que contenía BoNT/A a las concentraciones indicadas. La fluorescencia de los fluoróforos (es decir, YFP y CFP) del constructo expresado por las células se caracterizó 48 horas después de poner en contacto las células con BoNT/A. La concentración más alta de NaCl (48 mM) representa el contenido de NaCl de los medios de cultivo celular basales convencionales. Como se muestra, la reducción de la concentración de NaCl produce una potenciación espectacular de la sensibilidad (indicada por los valores de EC50 reducidos), lo que finalmente da como resultado un aumento de casi 50 veces en la
55 sensibilidad en ausencia de NaCl añadido.

Los efectos de la concentración reducida de NaCl sobre la morfología celular (campo claro) en ausencia de BoNT/A y la distribución del constructo dentro de las células transformadas (YFP) en ausencia y presencia de BoNT/A después de 48 horas se muestran en la **Figura 6B**. No hay evidencia de cambios en la morfología o distribución del constructo a diversas concentraciones de NaCl en los medios de cultivo celular.
60

El impacto de la variación del contenido de NaCl de los medios de cultivo celular se muestra en la **Figura 7**. Se preparó un medio de cultivo celular basal personalizado que no contenía Na-Cl añadido. Las variaciones de este medio basal
65 personalizado se prepararon al añadir NaCl a varias concentraciones y los ensayos basados en células para toxina *botulínica*/A se realizaron mediante el uso de células BO-CELL. El medio basal que contiene 48,3 mM de NaCl

representa la concentración de NaCl del medio basal convencional. Las células se incubaron con medio que contenía BoNT/A a las concentraciones indicadas durante 48, 72 y 96 horas. La fluorescencia de los fluoróforos (es decir, YFP y CFP) del constructo expresado por las células se caracterizó 48 horas después de poner en contacto las células con BoNT/A. La concentración más alta de NaCl (48 mM) representa el contenido de NaCl convencional de los medios de cultivo celular basales. Como se muestra, la concentración de NaCl tiene poco efecto sobre el momento del ensayo basado en células.

Las **Figuras 8A, 8B y 8C** muestran resultados típicos de estudios de los efectos del momento de la introducción de medios con bajo contenido de sodio sobre la sensibilidad de los ensayos de BoNT basados en células. La **Figura 8A** muestra los resultados de células que portan constructos indicadores apropiados incubadas en un medio basal con contenido de sodio convencional antes de la exposición (es decir, preincubación) a una concentración de BoNT/A en un medio basal de bajo contenido de sodio durante 4 horas o 24 horas. Después de estos períodos de tiempo, las células se transfirieron a un medio basal con contenido de sodio convencional que contenía una concentración correspondiente de BoNT/A, de manera que el tiempo total de exposición a BoNT/A fue de 48 horas. Las células también se expusieron a BoNT/A en medio basal con bajo contenido de sodio durante todo el período de 48 horas para proporcionar condiciones de control. La **Figura 8B** muestra resultados típicos de estudios similares realizados con medios basales con bajo contenido de sodio para la preincubación. Debe apreciarse que los medios usados para la preincubación de las células no tuvieron un efecto discernible sobre las células, lo que indica que no es necesario el preacondicionamiento de las células usando medios con bajo contenido de sodio.

El efecto de la preincubación también se examinó en los estudios que se muestran en la **Figura 8C**, que muestra resultados típicos. Las células se preincubaron con un medio con contenido de sodio convencional suplementado (Medio A) o con un medio personalizado con bajo contenido de sodio (Medio B). A continuación, las células se lavaron brevemente con un medio con contenido de sodio convencional no suplementado (Medio C) o el medio personalizado de bajo contenido de sodio antes de ponerse en contacto con BoNT. Como se muestra, la preincubación en medios con bajo contenido de sodio no es necesaria para generar la sensibilidad potenciada a la BoNT.

Efectos de contracciones. El contenido de sodio del medio de cultivo celular usado en un ensayo de BoNT basado en células del concepto inventivo puede manipularse al ajustar la concentración de sales de sodio distintas de NaCl. Como se muestra en la **Figura 9A**, una reducción en el contenido de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) de un medio basal también es efectiva para aumentar la sensibilidad de un ensayo de BoNT basado en células. Como se muestra en la **Figura 9B**, al igual que con el NaCl, se observan grandes mejoras en la sensibilidad con cambios relativamente pequeños en el contenido de sodio.

Efectos de Fuerza Iónica y Osmolaridad. Los efectos de la eliminación de sodio de los medios usados en un ensayo de BoNT basado en células no se deben a cambios en la fuerza iónica. La **Figura 10** muestra resultados típicos de estudios en los que una serie de medios personalizados que tienen contenido de sodio convencional (es decir, 70 %) y reducido (es decir, 25 %) y en los que el sodio se reemplaza por potasio a las mismas concentraciones. Si bien el aumento de la sensibilidad en un ensayo de BoNT basado en células es evidente en la reducción de la concentración de sodio, no se observa un aumento similar cuando el sodio se reemplaza por potasio y la concentración se reduce posteriormente. Como tal, el efecto es independiente de la fuerza iónica y puede verse como específico del ion y/o selectivo de iones.

La **Figura 11** muestra los resultados de suplementar los medios con bajo contenido de sodio con sustancias no iónicas para aumentar la fuerza iónica. Los ensayos de BoNT basados en células se realizaron en medios de cultivo que contenían NaCl 48 mM (70 % Neurobasal, $[\text{Na}^+]_{\text{total}} = 53$ mM), NaCl 0 mM (NaCl al 70 % personalizado 0 mM, $[\text{Na}^+]_{\text{total}} = 19$ mM) y NaCl 0 mM medio suplementado con sacarosa o N-óxido de trimetilamina (TMAO). Tanto la sacarosa como el TMAO se usan comúnmente para ajustar la osmolaridad. La potenciación de la sensibilidad producida por la reducción de sodio en los medios de cultivo se mantiene a pesar de ajustar la osmolaridad al equivalente de NaCl 48 mM. Por lo tanto, los efectos de la reducción del contenido de sodio en los medios de cultivo utilizados en los ensayos de BoNT basados en células son independientes de la osmolaridad.

Estudios Mecanicistas de Medios con Bajo Contenido de Sodio. Hay una variedad de mecanismos que pueden estar involucrados en la potenciación de la sensibilidad de los ensayos de BoNT basados en células mediante el uso de medios de cultivo con bajo contenido de sodio. La **Figura 12A** muestra resultados típicos obtenidos en estudios dirigidos a bloquear la captación de BoNT mediada por receptores de superficie celular por células en medios de cultivo con bajo contenido de sodio. Tales células se trataron con un fragmento de la cadena pesada recombinante de BoNT/A (HcR/A, a 1 mM) antes de la exposición de las células a la de holotoxina intacta BoNT/A. Tales fragmentos de la cadena pesada de BoNT/A se unen a los mismos receptores de la superficie celular que la holotoxina pero carecen de actividad proteolítica y no pueden escindir el constructo de detección. Como se muestra, el bloqueo de estos sitios receptores bloquea efectivamente los efectos tóxicos de la holotoxina BoNT/A cuando se aplica en medios de cultivo con bajo contenido de sodio en todas las concentraciones de holotoxina excepto las altas.

El fragmento de la cadena ligera recombinante de BoNT/A (Lc/A) retiene la actividad proteolítica de la holotoxina BoNT/A, pero carece de la capacidad de unirse a los receptores de la superficie celular utilizados para la internalización de la holotoxina. La **Figura 12B** muestra resultados típicos para un estudio sobre la internalización de la

cadena ligera de BoNT/A por células en medios de cultivo con bajo contenido de sodio. Como se muestra, Lc/A tiene un impacto mínimo en estas células, lo que indica que la endocitosis inespecífica no es un factor principal en la potenciación de la sensibilidad observada con los medios con bajo contenido de sodio.

- 5 Debería ser evidente para los expertos en la técnica que son posibles muchas más modificaciones además de las ya descritas sin apartarse de los conceptos inventivos del presente documento. El tema de la invención, por lo tanto, no debe restringirse excepto las reivindicaciones adjuntas. Además, al interpretar la descripción y las reivindicaciones, todos los términos deben interpretarse de la manera más amplia posible de acuerdo con el contexto. En particular, los términos "comprende" y "que comprende" deben interpretarse como que se refieren a los elementos, componentes o
- 10 pasos de una manera no exclusiva, lo que indica que los elementos, componentes o pasos a los que se hace referencia pueden estar presentes, o utilizados, o combinados con otros elementos, componentes o etapas que no se mencionan expresamente. Cuando las reivindicaciones de la descripción se refieren a una primera y una segunda etapas, el texto debe interpretarse en el sentido de que la primera y la segunda etapa se pueden practicar en cualquier orden, no que la reivindicación requiera que ambos elementos estén presentes o que dos elementos estén en tal
- 15 orden. Cuando las reivindicaciones de la descripción se refieren a al menos uno de algo seleccionado del grupo que consiste en A, B, C.... y N, el texto debe interpretarse en el sentido de que requiere solo un elemento del grupo, no A más N, o B más N, etc. De manera similar, se considera que la materia objeto inventiva incluye todas las combinaciones posibles de los elementos descritos. Por lo tanto, si una modalidad comprende los elementos A, B y C, y una segunda modalidad comprende los elementos B y D, entonces el tema inventivo también se considera que
- 20 incluye otras combinaciones restantes de A, B, C o D, incluso si no es explícitamente descrito.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la sensibilidad de la detección basada en células de una toxina botulínica, que comprende:
 - 5 (i) proporcionar una célula transfectada que produce un constructo que comprende;
 - (a) un primer extremo que comprende una porción que contiene un indicador, en donde la porción que contiene un indicador presenta una señal; y,
 - (b) un sitio de escisión que interactúa con la toxina botulínica de una manera que produce una escisión de la porción que contiene el indicador de un remanente del constructo;
 - 10 (ii) exponer la célula transfectada a la toxina botulínica a una primera temperatura de exposición a la toxina;
 - 15 (iii) hacer la transición de la temperatura de la célula transfectada desde la primera temperatura de exposición a la toxina a una segunda temperatura de exposición a la toxina; en donde la primera temperatura de exposición a la toxina es más baja que la segunda temperatura de exposición a la toxina; o en donde la primera temperatura de exposición a la toxina es mayor que la segunda temperatura de exposición a la toxina; y
 - 20 (iii) obtener la señal de la porción que contiene el indicador, en donde la sensibilidad de la respuesta de la célula transfectada a la toxina botulínica aumenta en relación con la sensibilidad de la célula transfectada a la toxina botulínica cuando se mantiene a 37 °C durante toda la exposición a la toxina botulínica; en donde la primera temperatura de exposición a la toxina es de 37 °C y la segunda temperatura de exposición a la toxina es de hasta 41 °C, o en donde la segunda temperatura de exposición a la toxina es de 37 °C y la primera temperatura de exposición a la toxina es de hasta 41 °C.
2. El método de la reivindicación 1 en donde la célula transfectada se selecciona del grupo que consiste en una célula neuronal, una célula tumoral neuroendocrina, una célula híbrida y una célula madre.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, en donde la porción que contiene el indicador comprende un primer fluoróforo.
4. El método de la reivindicación 1 en donde la proteína híbrida comprende además un segundo fluoróforo; preferentemente en donde el segundo fluoróforo se encuentra próximo a un segundo extremo de la proteína híbrida; o en donde el primer fluoróforo y el segundo fluoróforo demuestran <5 % de transferencia de energía de resonancia de Forster.
- 30 5. El método de la reivindicación 1 en donde la célula transformada se mantiene en un medio de cultivo celular que tiene menos de la osmolaridad fisiológica durante la exposición a la toxina botulínica.
- 35

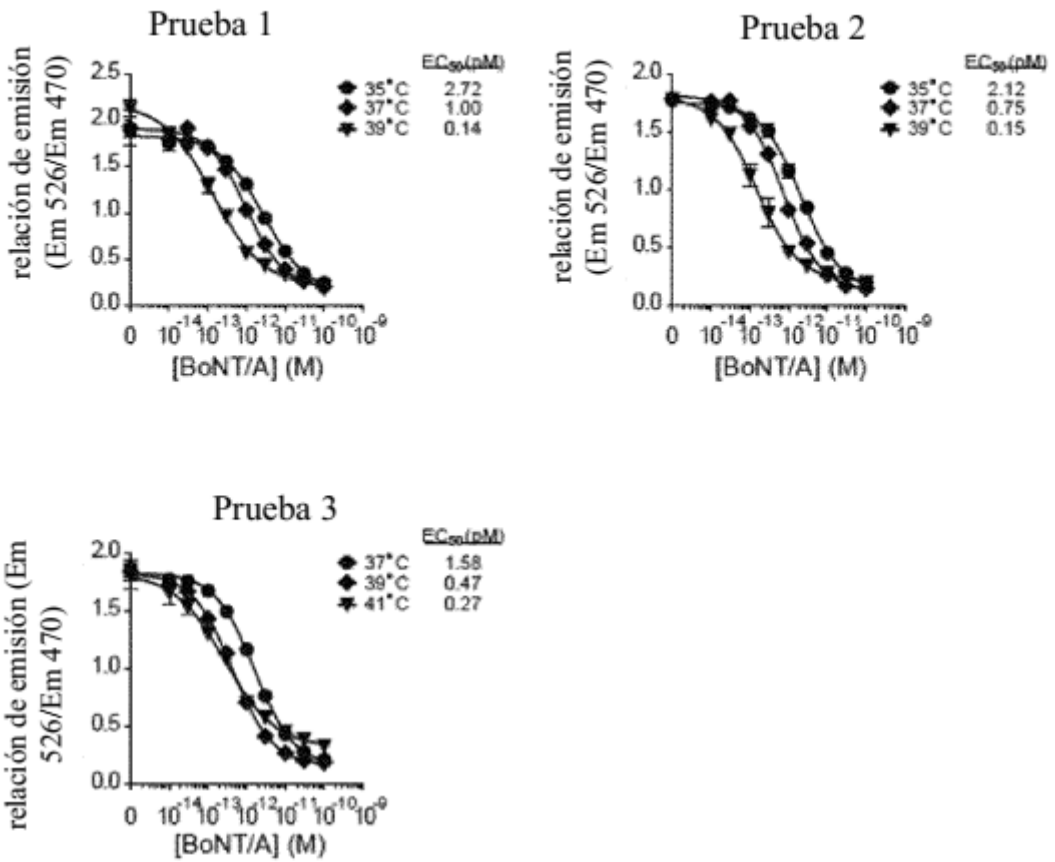


Figura 1A

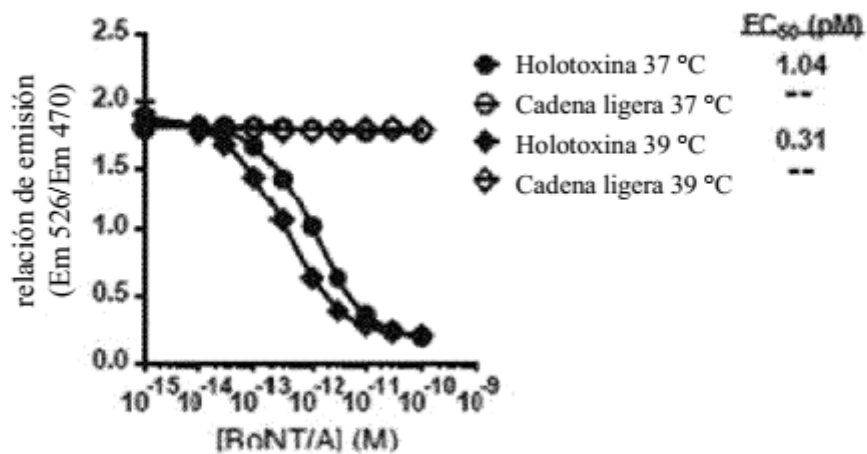


Figura 1B

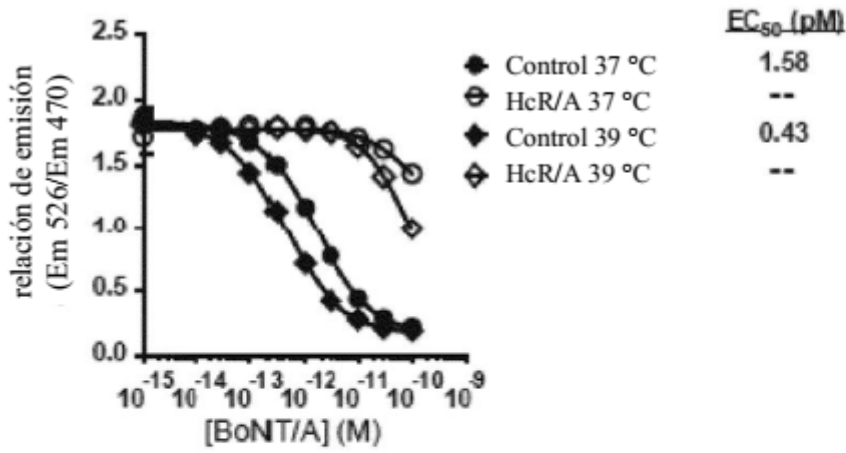


Figura 1C

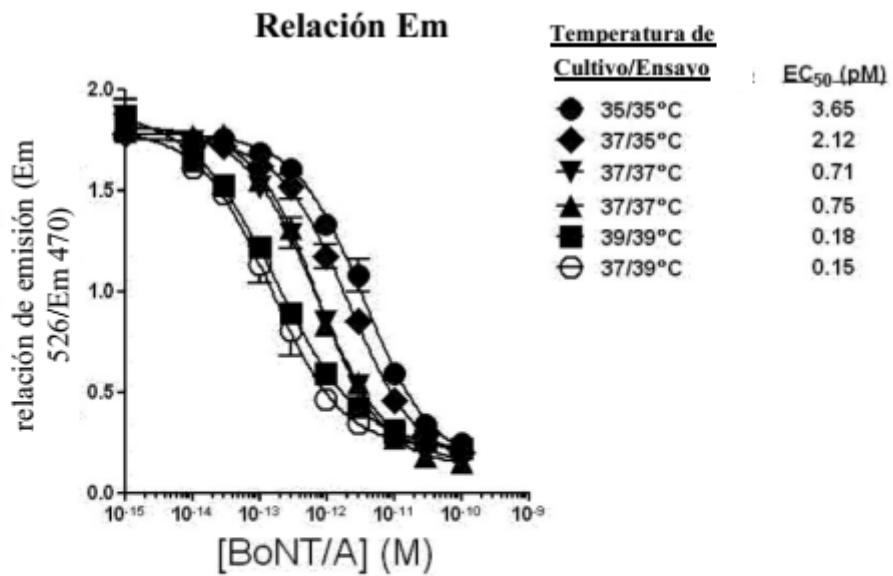


Figura 2

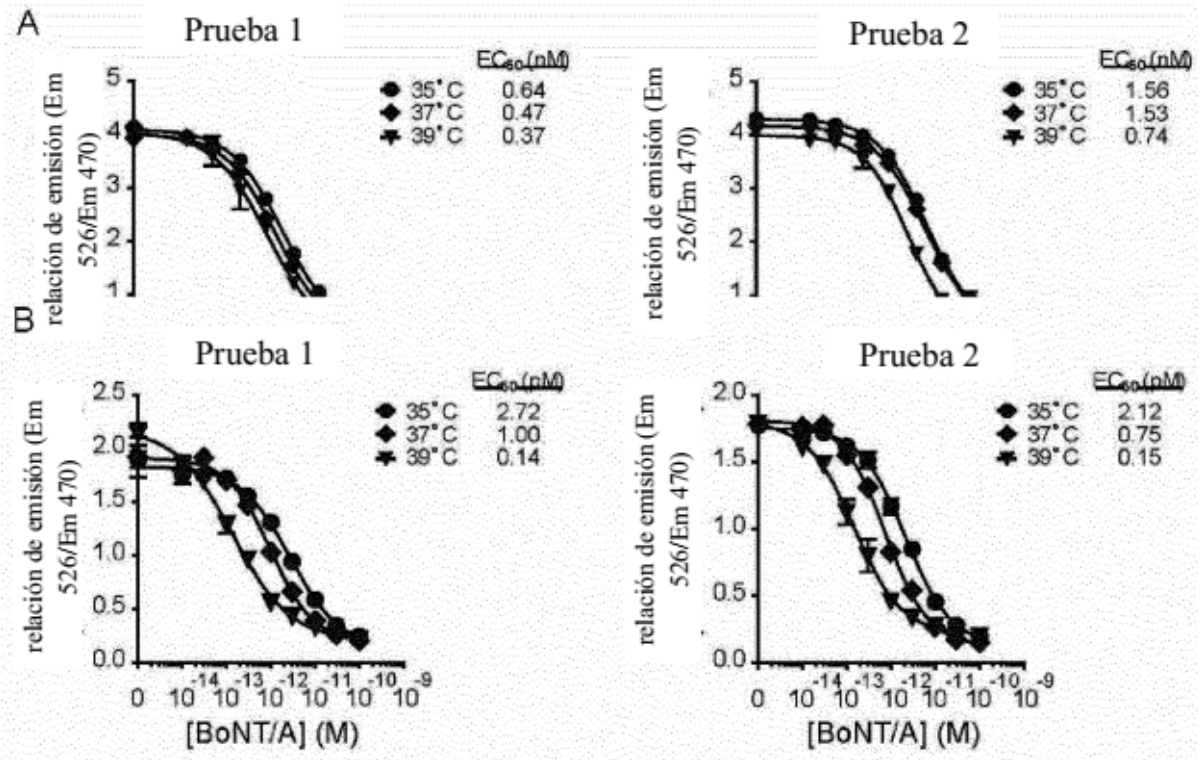
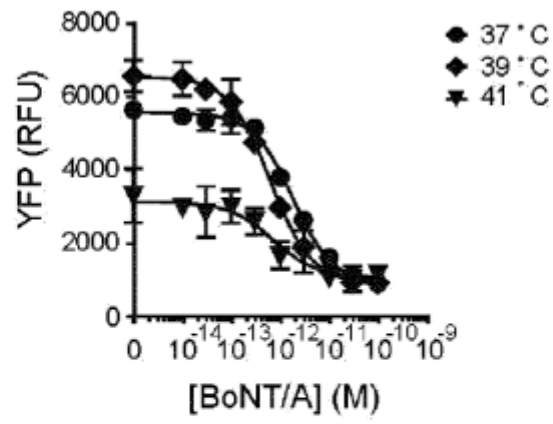
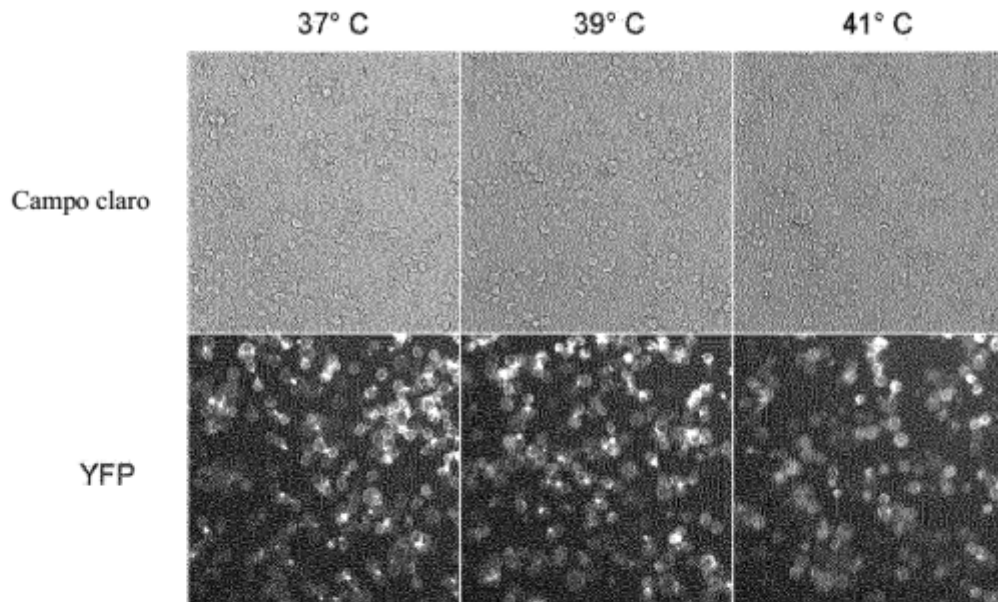


Figura 3

A



B



Figuras 4A y 4B

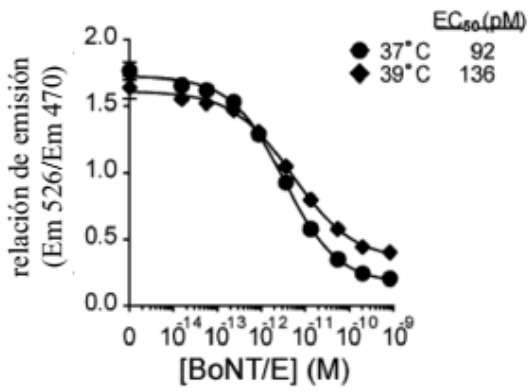


Figura 5

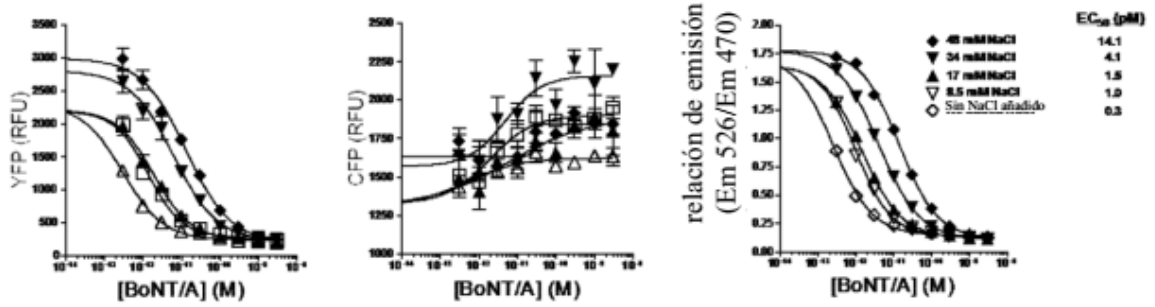


Figura 6A

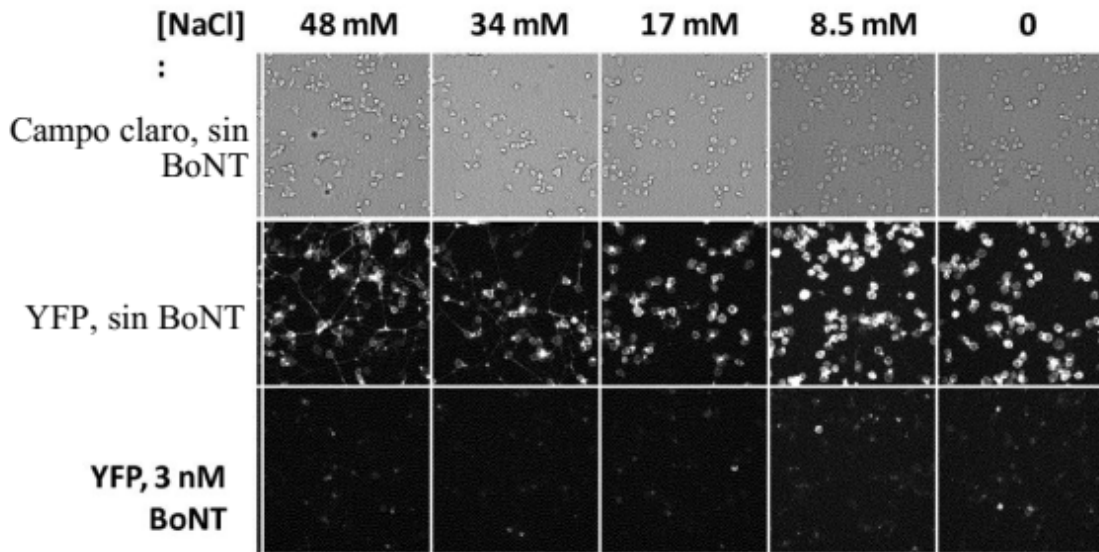


Figura 6B

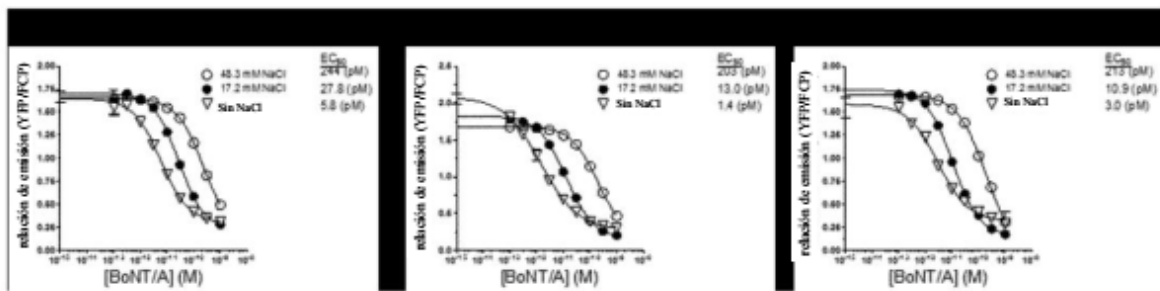
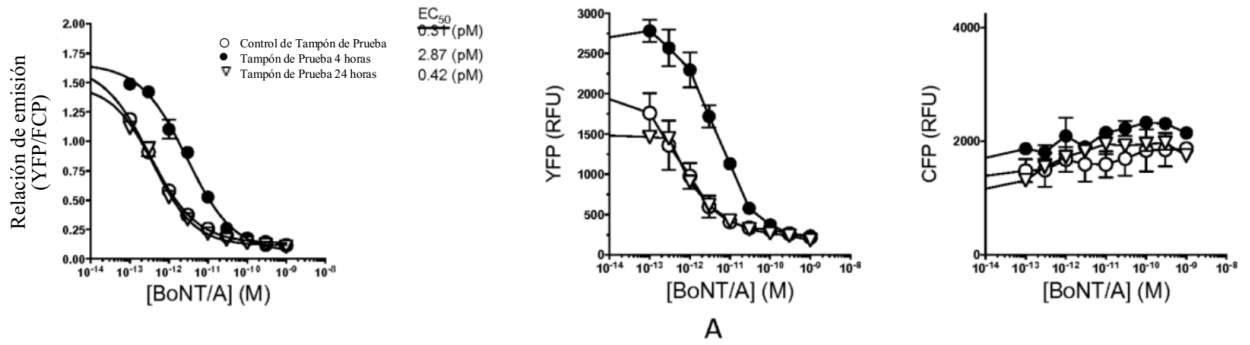
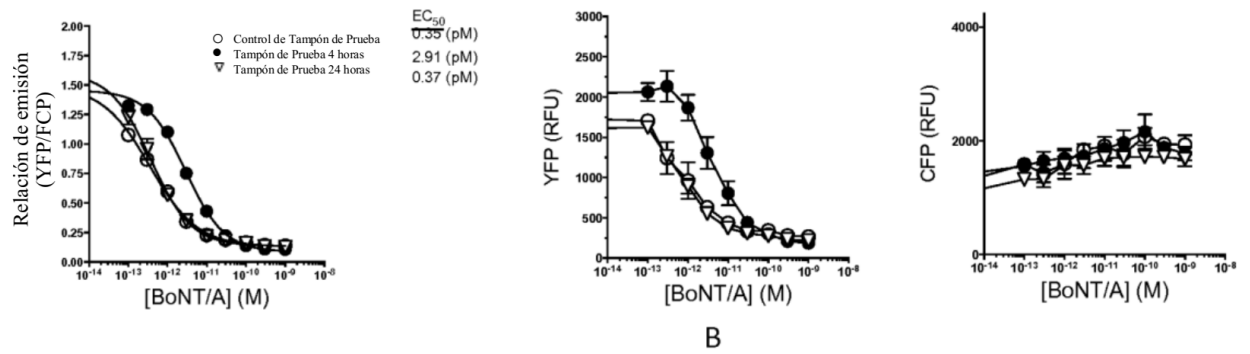


Figura 7



A



B

Figuras 8A y 8B

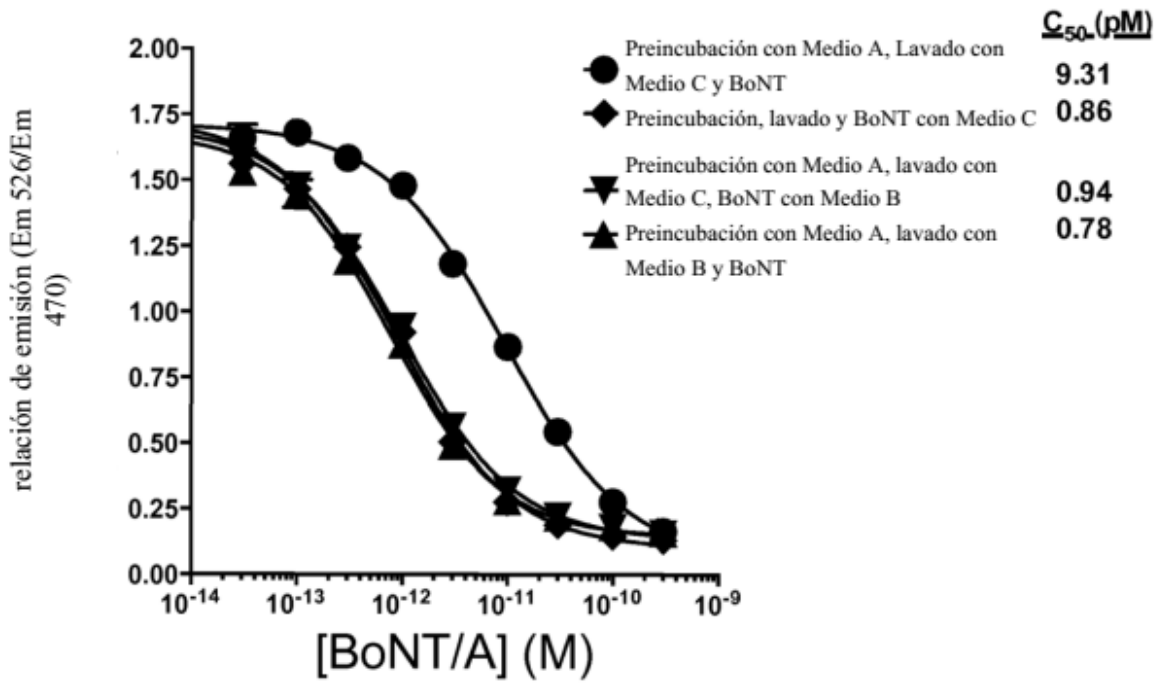


Figura 8C

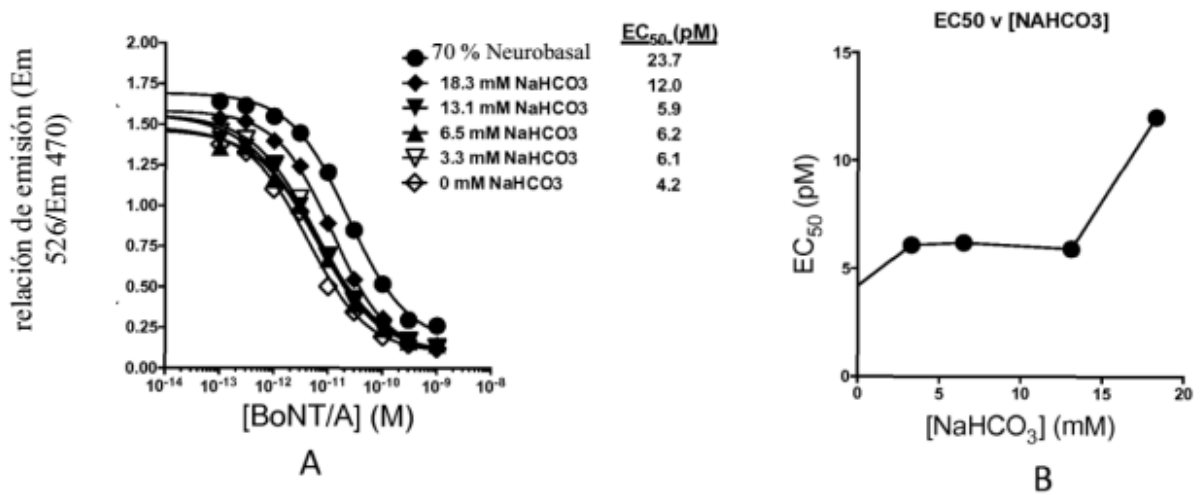


Figura 9A y 9B

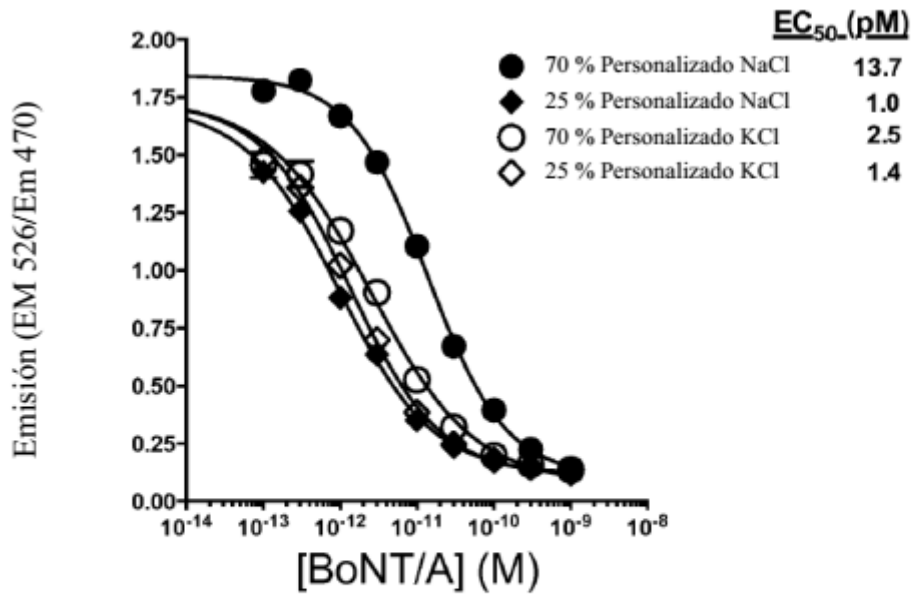


Figura 10

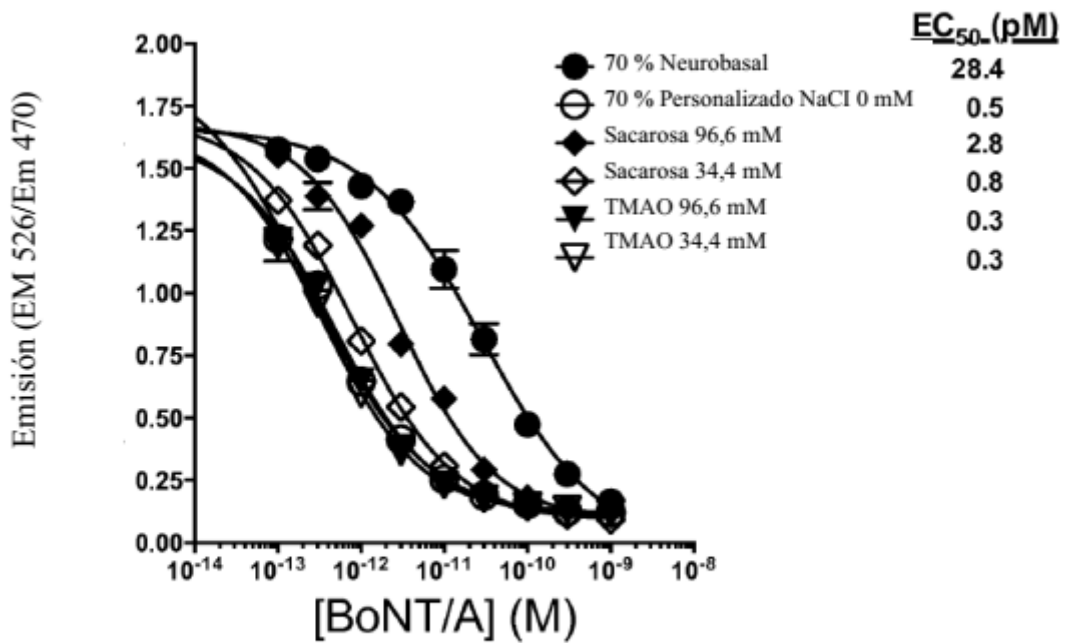


Figura 11

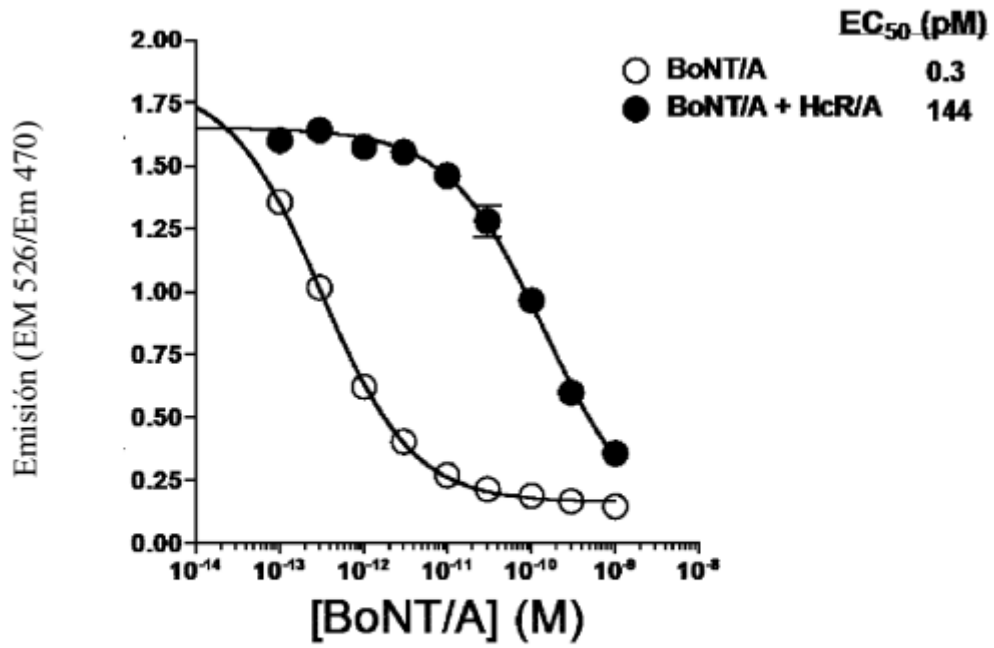


Figura 12A

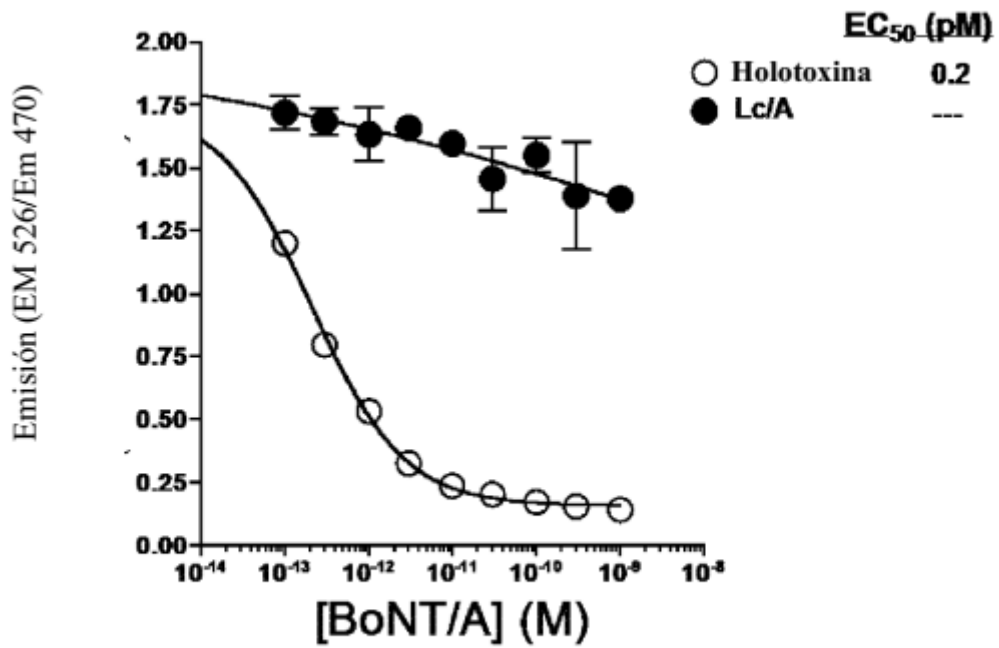


Figura 12B