



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **СКОРРЕКТИРОВАННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

Примечание: библиография отражает состояние при переиздании

(21)(22) Заявка: 2011147994/15, 23.04.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.04.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
27.04.2009 EP 09158788.1;
27.04.2009 US 61/214,650

(43) Дата публикации заявки: 10.06.2013 Бюл. № 16

(45) Опубликовано: 10.04.2015

(15) Информация о коррекции:
Версия коррекции №1 (W1 C2)

(48) Коррекция опубликована:
27.02.2016 Бюл. № 06

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: JONES R.G.A. et al. Development of
improved SNAP25 endopeptidase immuno-assays
for botulinum type A and E toxins. Journal of
Immunological Methods. 2008 Jan 1; 329 (1-2):
(см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 28.11.2011

(86) Заявка РСТ:
EP 2010/055432 (23.04.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/124998 (04.11.2010)

Адрес для переписки:
105064, Москва, а/я 88, "Патентные поверенные
Квашнин, Сапельников и партнеры"

(72) Автор(ы):

ПФАЙЛЬ Михаэль (DE),
ФРИДРИХ Йозеф (DE)

(73) Патентообладатель(и):

Мерц Фарма ГмбХ унд Ко. КГаА (DE)

(54) **СРЕДСТВА И СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ПОЛИПЕПТИДА НЕЙРОТОКСИНА И ЕГО КАТАЛИТИЧЕСКОЙ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЕЙ**

(57) Реферат:

Предложенная группа изобретений относится к области медицины. Предложены способы и устройства для определения количества процессированного полипептида нейротоксина в растворе путем вычитания количества частично

процессированного и непроцессированного нейротоксина из количества общего нейротоксина. Предложены наборы, содержащие систему первого антитела захвата, второго антитела захвата и антитела обнаружения,

средства для вычисления количества зрелого полипептида нейротоксина и соответствующие инструкции. Предложенная группа изобретений

позволяет эффективно определять количество процессированного нейротоксина в препарате. 6 н. и 18 з.п. ф-лы, 4 ил., 3 табл.

(56) (продолжение):

92-101. ВЕРТИЕВ Ю.В. и др. Эффективная экспрессия в клетках E. Coli фрагментов гена ботулинического нейротоксина типа А, кодирующих L-цепь и Н-цепь, с образованием продуктов, вызывающих протективный иммунитет к введению токсина. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2000; 4: 3-6. WO 0223195 A2, 21.03.2002

RU 2 5 4 5 7 8 3 C 9

RU 2 5 4 5 7 8 3 C 9



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 545 783** (13) **C9**

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

Note: Bibliography reflects the latest situation

(21)(22) Application: 2011147994/15, 23.04.2010

(24) Effective date for property rights:
23.04.2010

Priority:

(30) Convention priority:
27.04.2009 EP 09158788.1;
27.04.2009 US 61/214,650

(43) Application published: 10.06.2013 Bull. № 16

(45) Date of publication: 10.04.2015

(15) Correction information:
Corrected version no1 (W1 C2)

(48) Corrigendum issued on:
27.02.2016 Bull. № 06

(85) Commencement of national phase: 28.11.2011

(86) PCT application:
EP 2010/055432 (23.04.2010)

(87) PCT publication:
WO 2010/124998 (04.11.2010)

Mail address:

105064, Moskva, a/ja 88, "Patentnye poverennye
Kvashnin, Sapel'nikov i partnery"

(72) Inventor(s):

PFAJL' Mikhaehl' (DE),
FRIDRIKh Jozef (DE)

(73) Proprietor(s):

Merts Farma GmbKh und Ko. KGaA (DE)

(54) AGENTS AND METHODS FOR MEASURING POLYPEPTIDE NEUROTOXIN AND ITS CATALYTIC AND PROTEOLYTIC ACTIVITIES

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: presented group of inventions refers to medicine. Presented are methods and devices for measuring processed polypeptide neurotoxin in a solution by subtracting the amount of partially processed and unprocessed neurotoxin from an amount of total neurotoxin. Presented are kits that comprise a system

of first capture antibody, second capture antibody and detection antibody, media for computing an amount of mature polypeptide neurotoxin and related instructions.

EFFECT: presented group of inventions enables measuring processed neurotoxin in a preparation effectively.

24 cl, 4 dwg, 3 tbl

Настоящее изобретение относится к области средств для обеспечения получения полипептидов и контроля качества. В особенности, это касается способа определения количества процессированного (активного) полипептида нейротоксина в растворе, содержащем процессированный полипептид нейротоксин и частично процессированный или непроецессированный полипептид нейротоксин. Кроме того, настоящее изобретение относится к устройству для определения вышеуказанного количества и набору, подходящему для выполнения способа в соответствии с настоящим изобретением.

Clostridium botulinum и *Clostridium tetani* продуцируют весьма мощные нейротоксины, то есть ботулинические токсины (BoNTs) и токсин столбняка (TeNT), соответственно. Эти клостридиальные нейротоксины (CNTs) специфически связываются с нейрональными клетками и нарушают высвобождение нейромедиатора. Каждый токсин синтезируется как неактивный, непроецессированный одноцепочечный белок с молекулярной массой около 150 кДа. Посттрансляционный процессинг включает образование дисульфидных мостиков и ограниченный протеолиз (одноцепочечный разрыв) посредством бактериальной протеаз(ы). Активный нейротоксин состоит из двух цепей, N-концевой легкой цепи массой около 50 кДа и тяжелой цепи массой около 100 кДа, связанных дисульфидной связью. CNTs структурно и функционально состоят из трех доменов, то есть каталитической легкой цепи, тяжелой цепи, охватывающей транслокационный домен (N-концевая половина) и рецептор-связывающего домена (C-концевая половина), смотрите Krieglstein 1990, Eur J Biochem 188, 39; Krieglstein 1991, Eur J Biochem 202, 41; Krieglstein 1994, J Protein Chem 13, 49. Ботулинические нейротоксины синтезируются как молекулярные комплексы, содержащие белок нейротоксин массой 150 кДа и ассоциированные нетоксичные белки. Размеры комплекса различаются в зависимости от штамма *Clostridium* и различных серотипов нейротоксина в пределах от 300 кДа, более чем 500 кДа и 900 кДа. Нетоксичные белки в этих комплексах стабилизируют нейротоксин и защищают его от деградации, смотрите Silberstein 2004, Pain Practice 4, S19-S26.

Clostridium botulinum секретирует семь антигенно отличающихся серотипов, обозначаемые как ботулинические нейротоксины от А до G (BoNT). Все серотипы вместе с родственным столбнячным нейротоксином (TeNT), секретируемым *Clostridium tetani*, являются Zn^{2+} -эндопротеазами, которые блокируют синаптический экзоцитоз путем расщепления SNARE белков, смотрите Couesnon, 2006, Microbiology, 152, 759. CNTs cause the flaccid muscular paralysis seen in botulism and tetanus, see Fischer 2007, PNAS 104, 10447.

Несмотря на его токсические эффекты, комплекс ботулинического токсина применялся в качестве терапевтического агента для большого количества болезней. Серотип ботулинического токсина А был одобрен в Соединенных Штатах в 1989 г. для использования на людях для лечения косоглазия, блефароспазма и других расстройств. Он коммерчески доступен как белковый препарат Ботулинический токсин А, например, под торговым наименованием BOTOX (Allergan Inc) или под товарным знаком DYSPORT (Ipsen Ltd). Улучшенный, свободный от комплексов препарат Ботулинический токсин А, коммерчески доступен под товарным знаком XEOMIN (Merz Pharmaceuticals GmbH). Для терапевтических применений препарат вводится непосредственно в мышцу, которая подлежит лечению. При физиологических значениях pH токсин высвобождается из белкового комплекса и достигается желаемый фармакологический эффект. Эффект ботулинического токсина является только временным, что служит причиной того, что повторное введение ботулинического токсина необходимо для поддержания терапевтического эффекта.

Клостридиальные нейротоксины ослабляют силу произвольно сокращающихся мышц и являются эффективной терапией для косоглазия, фокусной дистонии, включая цервикальную дистонию и доброкачественный эссенциальный блефароспазм. Кроме того, для них было показано облегчение гемифациального спазма и фокальной спастичности, и, более того, была показана способность быть эффективными при широком диапазоне других показаний, таких как желудочно-кишечные расстройства, чрезмерное потоотделение и косметическая коррекция морщин, смотрите Jost 2007, Drugs 67, 669.

В ходе процесса получения клостридиальных нейротоксинов количественное определение также как и контроль качества активного полипептида нейротоксина имеет особенно важное значение. Доступные в настоящее время препараты нейротоксинов содержат в дополнение к требуемому активному (процессированному или зрелому) нейротоксину протеолитически непроцессированный предшественник или частично процессированный полипептид нейротоксин. Протеолитически непроцессированный предшественник или частично процессированный полипептид нейротоксин отличаются от зрелого (активного, процессированного) нейротоксического полипептида в последовательности только несколькими аминокислотами. Поэтому они с трудом могут быть количественно различимы на основании их химических и физических свойств. С другой стороны, часть протеолитически непроцессированного предшественника и/или частично процессированный полипептид нейротоксин полного белка все еще может иметь существенное значение в таких препаратах. Эта часть зависит от биологической системы, применяемой для получения, и следует из биосинтеза и условий процесса ферментации. Таким образом, количество требуемого зрелого, биологически активного полипептида нейротоксина в нейротоксических препаратах предопределено и в настоящее время довольно трудно для определения.

Средства и способы надежной качественной и количественной системы обнаружения зрелого (активного) полипептида нейротоксина весьма желательны, но еще недоступны.

Таким образом, техническая задача, лежащая в основе настоящего изобретения, может рассматриваться как предоставление средств и способов, обеспечивающих вышеупомянутые потребности. Техническая задача решается посредством примеров осуществления, охарактеризованных в формуле изобретения и приведенных ниже.

Настоящее изобретение относится к способу определения количества процессированного (активного) полипептида нейротоксина в растворе, содержащем процессированный полипептид нейротоксин и частично процессированный и/или непроцессированный полипептид нейротоксин, содержащему стадии:

а) контактирование первой части названного раствора с первым антителом захвата, которое специфически связывается с легкими цепями зрелого полипептида нейротоксина, частично процессированного и непроцессированного полипептида нейротоксина, при условиях, которые обеспечивают связывание упомянутого антитела с вышеназванным зрелым нейротоксином, частично процессированным и непроцессированным полипептидом нейротоксина, с формированием, таким образом, первого антитело-содержащего комплекса,

б) контактирование первого антитело-содержащего комплекса с антителом обнаружения, которое специфически связывается с тяжелой цепью вышеназванного зрелого нейротоксина, частично процессированного и непроцессированного полипептида нейротоксина в антитело-содержащем комплексе, сформированном на стадии а), посредством чего образуется первый комплекс обнаружения,

с) контактирование второй части вышеназванного раствора со вторым антителом

захвата, которое специфически связывается с линкерами упомянутого частично процессированного и неprocessированного полипептида нейротоксина, при условиях, которые позволяют связывание упомянутого антитела с упомянутым частично процессированным и неprocessированным полипептидом нейротоксином, с

5 формированием, таким образом, второго антитело-содержащего комплекса,

d) контактирование второго антитело-содержащего комплекса с антителом обнаружения, посредством чего образуется второй комплекс обнаружения,

e) определение количества первого и второго комплексов обнаружения, сформированных на стадиях b) и d),

10 f) вычисление количества зрелого полипептида нейротоксина на основании количеств первого и второго комплексов обнаружения, определенных на стадии e).

Вышеупомянутый способ может, в общем, содержать дополнительные стадии, включающие стадии для приготовления раствора, или стадии, касающиеся

дополнительной оценки результатов, полученных на стадии f). Кроме того, стадии a)

15 и b), также как и стадии c) и d), могут быть выполнены одновременно или

последовательно. В последнем случае стадии a) и b) могут быть выполнены до или

после стадий c) и d). Дальнейшее определение, упомянутое для стадии e), может быть проведено в названном случае после того, как обе серии стадий были проведены, или

определение на стадии e), поскольку будет затронут первый комплекс обнаружения,

20 проводится после стадий a) и b), в то время как определение, касающееся второго

комплекса обнаружения, проводится после стадий c) и d). Способ может быть частично или полностью автоматизирован. Инкубация и стадии измерений могут быть выполнены, например, роботом. Анализ данных и интерпретация могут быть выполнены на

компьютере, снабженным вычислительным алгоритмом.

25 Термин "полипептид нейротоксин", применяемый в настоящем изобретении, относится к семи отдельным серотипам ботулинических нейротоксинов, то есть BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G, и к столбнячному нейротоксину (TeNT), смотрите Таблицу 1, и вариантам вышеупомянутого.

30 Таблица 1

Ботулинические и столбнячные нейротоксины			
S E Q I D NO:	Ссылка	Номер доступа:	Нейротоксин (полной длины)/бактериальный штамм
17	Beecher 1997, J Protein Chem 16, 701-712; Krieglstein 1994, J Protein Chem 13, 49-57.	ABD65472.1 GI:89258592	BoNT/A (Hall/62A)
18	Antharavally 1998, J Protein Chem 17, 417-428	BAE48264.1 GI:81230332	BoNT/B (Okra)
19	Sagane 1999, J Protein Chem 18,885-892	BAA89713.1 GI:6729213	BoNT/CI (C-6814)
20	Sagane 1999, J Protein Chem 18,885-892	BAA90661.1 GI:6939795	BoNT/D (CB16)
21	Antharavally 1997, J Protein Chem 16, 787-799	CAA43999.1 GI:40394	BoNT/E (Beluga)
22	Sagane 1999, J Protein Chem 18,885-892	CAA73972.1 GI:3805790	BoNT/F (NCTC10281)
23	Campbell 1993, Biochim. Biophys. Acta 1216 (3), 487-491	CAA52275.1 GI:441276	BoNT/G
24	Krieglstein 1991, Eur J Biochem 202,41-51; Krieglstein et al. 1990, Eur J Biochem 188, 39-45	P04958.2 GI:135624	TeNT

Нейротоксины, упомянутые в настоящем изобретении, в принципе, содержат N-концевую легкую цепь и C-концевую тяжелую цепь. Нейротоксины продуцируются в виде одноцепочечных молекул-предшественников, называемых в настоящем изобретении как «неprocessированные полипептиды нейротоксины». Последовательности N-концевой легкой цепи и C-концевой тяжелой цепи разделены в неprocessированных нейротоксинах по меньшей мере одним сайтом протеолитического расщепления. Эти нейротоксины содержат линкерную последовательность между последовательностями легкой и тяжелой цепи, где легкая цепь локализована у N-конца, начиная от первого

сайта расщепления, и тяжелая цепь локализована у С-конца, начиная от второго сайта расщепления. В аспекте настоящего изобретения названный линкер имеет аминокислотную последовательность, как показано любой из последовательностей SEQ ID NOs:1-16. Во время процессинга нейротоксинов последовательность линкера

5 будет вырезана. Эти нейротоксины содержат два сайта протеолитического расщепления, один на N-концевом и один на С-концевом краях линкерной последовательности. В ходе процессинга таких нейротоксинов могут возникнуть интермедиаты, которые расщепляются по тому или другому сайту расщепления, то есть линкерная последовательность еще не вырезана, но остается либо на N-концевой легкой цепи,

10 либо на С-концевой тяжелой цепи. Такие интермедиаты упоминаются в настоящем описании как "частично процессированные полипептиды нейротоксины". Другие нейротоксины содержат только один сайт расщепления. Понятно, что для таких нейротоксинов не может быть вырезана никакая линкерная последовательность. Тем не менее, непротессированный нейротоксин может быть распознан иммунологически

15 благодаря присутствию интактного сайта протеолитического расщепления и фланкирующих последовательностей. Эти фланкирующие последовательности и сайт расщепления также рассматриваются как линкер в целях настоящего изобретения. Таким образом, термин "линкер", применяемый в настоящем изобретении и определенный выше, относится либо к последовательности между последовательностями

20 легких и тяжелых цепей полипептидов нейротоксинов, имеющих два сайта расщепления, либо к сайту расщепления и фланкирующим последовательностям для полипептидов нейротоксинов, имеющих только единственный сайт расщепления. В результате процессинга получается "процессированный полипептид нейротоксин". Названный нейротоксический полипептид нейротоксин показывает биологические свойства,

25 характерные для нейротоксина, а именно, (а) связывание с рецептором, (b) интернализация, (с) транслокация через эндосомальную мембрану в цитозоль, и/или (d) эндопротеолитическое расщепление белков, вовлеченных в слияние мембраны синаптического пузырька. Поэтому процессированный полипептид нейротоксин иногда упоминается в настоящем изобретении как активный или зрелый нейротоксический

30 полипептид. Биологическая активность полипептидов нейротоксинов, в некотором аспекте, является результатом всех вышеупомянутых биологических свойств. Исследования *in vivo* для оценки биологической активности включают определение LD₅₀ для мышей и анализ *ex vivo* одного из куполов диафрагмы мыши, как описано Pearce et al. и Dressier et al. (Pearce 1994, Toxicol Appl Pharmacol 128:69-77 and Dressier

35 2005, Mov Disord 20:1617-1619). Биологическая активность обычно выражается в мышинных единицах (ME). При использовании в настоящем изобретении, 1 ME - количество нейротоксического компонента, который убивает 50% обработанной популяции мышей после внутрибрюшинной инъекции, то есть LD₅₀ для мышей при внутрибрюшинном введении.

40 В аспекте способа настоящего изобретения названный полипептид нейротоксин выбирается из группы, состоящей из: а) полипептида нейротоксина, имеющего аминокислотную последовательность, как показано любой из последовательностей SEQ:17-24, и b) полипептида нейротоксина, имеющего аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 40% идентичной аминокислотной

45 последовательности полипептида нейротоксина, как показано любой из последовательностей SEQ:17-24. Вышеупомянутые аминокислотные последовательности показывают непротессированные полипептиды нейротоксины. Последовательности соответствующих частично процессированных или процессированных полипептидов

нейротоксинов могут быть выведены из названных последовательностей с помощью информации о сайтах расщепления, представленных ниже в Таблице 3. В другом варианте выполнения настоящего изобретения, полипептид нейротоксин имеет аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 40%, на 50%, на 60%, на 70%,
 5 на 75%, на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности, как показано SEQ:17-24. Термин «идентичная», при использовании в настоящем изобретении, относится к идентичности последовательностей аминокислотных последовательностей, где последовательности выровнены таким образом, что достигается наиболее высокая степень соответствия.
 10 Это может быть достигнуто при использовании опубликованных методик или способов, кодифицируемых в компьютерных программах, таких как, например, BLASTP, BLASTN, FASTA, Altschul 1990, J Mol Biol 215, 403. Величины процента идентичности, в одном варианте, вычисляются относительно полной аминокислотной последовательности. Ряд программ, основанных на различных алгоритмах, доступен квалифицированному
 15 специалисту в данной области техники для того, чтобы сравнивать различные последовательности. В этом контексте алгоритмы Нидлмана и Вунша или Смита и Ватермана дают особенно надежные результаты. Для проведения выравнивания последовательностей следует использовать программу PileUp (1987, J Mol Evolution 25, 351; Higgins 1989 CABIOS 5, 151) или программы Gap и BestFit (Needleman and Wunsch
 20 1970, J Mol Biol 48; 443; Smith and Waterman 1981, Adv AppI Math 2, 482), которые являются частью пакета программного обеспечения GCG (Genetics Computer Group 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711). Величины идентичности последовательностей, приведенные выше в процентах, должны быть определены, в одном варианте настоящего изобретения, с помощью программы GAP в районе полной
 25 последовательности со следующими параметрами настройки: вес гэпа: 50, вес длины: 3, среднее совпадение: 10.000 и среднее несовпадение: 0.000, которые, если иначе не определено, должны всегда использоваться в качестве стандартных параметров настройки для выравниваний последовательностей. Следует иметь в виду, что вышеупомянутые варианты, в аспекте настоящего изобретения, должны сохранить по
 30 меньшей мере одно из биологических свойств нейротоксинов и, в некотором варианте настоящего изобретения, все биологические свойства полипептида нейротоксина, рассматриваемого в настоящем изобретении. В следующем варианте выполнения настоящего изобретения, варианты могут быть нейротоксинами, имеющими улучшенные или измененные биологические свойства, например, они могут содержать сайты
 35 расщепления, которые улучшены для узнавания ферментом или для связывания с рецептором, или любое другое свойство, указанное выше. Понятно, что концепция настоящего изобретения основывается на присутствии двух или более сайтов расщепления между легкой и тяжелой цепями полипептида нейротоксина, в то время как природа сайтов расщепления и особенности аминокислотной последовательности
 40 между ними не имеет значения, пока агент является специфичным для частично процессированного или неprocessированного полипептида нейротоксина. Соответственно, другим вариантом является замена сайтов узнавания протеазы и пептидного линкера между тяжелой и легкой цепью полипептида нейротоксина.

В другом варианте полипептид нейротоксин в соответствии со способом по
 45 настоящему изобретению может быть химерной молекулой. Так называемая химерная молекула в одном варианте может иметь одиночные замещенные домены.

Соответственно, в другом варианте, часть тяжелой цепи нейротоксина замещается FC-фрагментом антитела.

Термин "количество", при применении в способе по настоящему изобретению, охватывает абсолютное количество полипептида, относительное количество или концентрацию названного полипептида, так же, как и любое значение или параметр, который коррелирует с ними или может быть выведен из них.

5 Термин "раствор", при применении в настоящем изобретении, относится к любой растворяющей системе, содержащей зрелый полипептид нейротоксин и его частично процессированные и/или неprocessированные предшественники полипептида нейротоксина. Растворяющая система, кроме того, содержит растворитель. Возможными растворителями в различных вариантах изобретения являются вода, водные буферные
10 системы, органические растворители и ионные жидкости. В одном варианте настоящего изобретения растворяющей системой является система водного растворителя. Кроме того, растворяющая система в дополнение к зрелому полипептиду нейротоксину и частично процессированному или неprocessированному предшественнику полипептида нейротоксина и растворителю может также содержать дополнительно молекулы,
15 включая дополнительные бактериальные полипептиды. В некотором варианте, раствором, который должен применяться в способе в соответствии с настоящим изобретением, будет культура бактериальных клеток или частично очищенный или очищенный препарат, полученный из такой бактериальной клеточной культуры.

Термин «порция», используемый в соответствии со способом по настоящему изобретению, относится к образцу или к аликвоте раствора. В варианте способа
20 настоящего изобретения первая порция и вторая порция, упоминаемые в настоящем изобретении, полностью эквиваленты по их объемам и содержанию. Это может быть достигнуто, например, измерением содержания общего белка первой и второй порции, в соответствии с чем, практически полная идентичность содержания общего белка
25 показательна для первой и второй порции, имеющих практически идентичное содержание. Однако в следующем варианте, порция, которая будет применяться в качестве первой или второй порции, может быть разбавлением образца или аликвоты раствора. Следует понимать, что в зависимости от количества подлежащего
30 определению полипептида нейротоксина (то есть частично процессированного или неprocessированного полипептида нейротоксина или общего нейротоксина) разбавление может быть необходимым, чтобы обеспечить оптимальное качественное и количественное определение. Как делать такие разбавления, хорошо известно специалистам в данной области техники.

Термин "контактирование", использующийся в соответствии со способом по настоящему изобретению, относится к (i) обеспечению вышеупомянутых антител захвата и раствора, содержащего нейротоксины, или (ii) обеспечению антитело-содержащих комплексов и антител обнаружения в физической близости, чтобы
35 позволить физическое и/или химическое взаимодействие. Подходящие условия, которые обеспечивают специфическое взаимодействие, известны квалифицированному специалисту в данной области техники. Названные условия будут зависеть от антител и раствора, которые будут применяться в способе по настоящему изобретению, и могут быть адаптированы специалистом в данной области техники. Помимо этого, время,
40 достаточное для осуществления взаимодействия, также может быть определено квалифицированным специалистом в данной области техники. Кроме того, нужно понимать, что между отдельными стадиями контактирования, изложенными в способе по настоящему изобретению, могут выполняться стадии промывки для обеспечения подходящих условий для контактирования. Например, после формирования первого антитело-содержащего комплекса на стадии а), оставшийся раствор должен быть удален

до применения антитела обнаружения к указанному антитело-содержащему комплексу. Кроме того, после того как первый комплекс обнаружения сформирован на стадии b), возможно будет необходимо удалить оставшееся (несвязавшееся) антитело обнаружения до определения количества первого комплекса обнаружения на стадии c). То же самое

5 применяется, конечно, для стадий от a) до f), соответственно.

Термин "антитело", используемый в настоящем изобретении, охватывает моноклональное антитело, поликлональное антитело, одноцепочечное антитело, химерное антитело, биспецифичное антитело, синтетическое антитело или фрагмент

10 любого из перечисленных антител. Фрагменты названных антител включают Fab, Fv или scFv фрагменты, или химически модифицированные производные любого из этих фрагментов. Антитела могут быть изготовлены с использованием способов, которые описаны, например, в Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Моноклональные антитела могут быть получены с помощью

15 методик, первоначально описанными в Köhler 1975, Nature 256, 495, и Galfre 1981, Meth Enzymol 73, 3. Названные методики содержат слияние клеток миеломы мыши с клетками селезенки, полученными из иммунизированных млекопитающих. Антитела могут быть далее улучшены с помощью методик, известных специалистам этой области техники. Например, поверхностный плазменный резонанс, использующийся в системе в BIACORE (R), может быть использован для повышения эффективности фаговых антител, которые

20 связываются с эпитопом, смотрите Schier 1996, Human Antibodies Hybridomas 7, 97; Malmborg 1995, J. Immunol Methods 183, 7. Антитела, используемые в настоящем изобретении, также содержат функциональные эквиваленты антител, то есть агентов, которые способны к специфическому связыванию с желательными эпитопами или частями полипептидов нейротоксинов. В некотором варианте такие функциональные

25 эквиваленты содержат рецептор или связывающие белки, упомянутые в других указанных как специфическое связывание.

Согласно способу в соответствии с настоящим изобретением, "первое антитело захвата" специфически связывается с эпитопами, содержащимися в легкой цепи зрелого полипептида нейротоксина и содержащимися в частично процессированном и/или

30 непроецессированном полипептиде нейротоксина. Термин «специфическое связывание», при использовании в настоящем изобретении, в общем, означает, что антитело не реагирует перекрестно в существенной степени с другими эпитопами на тяжелой цепи или линкере нейротоксического полипептида, подлежащего определению, или на других полипептидах. Специфическое связывание, как упоминается в настоящем изобретении,

35 может быть исследовано различными хорошо известными методиками, включая, например, эксперименты по конкуренции и Вестерн-блоты. Термин «эпитоп», при использовании в соответствии с настоящим изобретением, касается антигенной детерминанты, которая узнается антителом.

В другом варианте, различные антитела захвата могут использоваться, чтобы

40 заменить первое антитело захвата. С этой целью может применяться по меньшей мере одно антитело захвата, которое специфически связывается с эпитопами легкой цепи непроецессированного полипептида нейротоксина, по меньшей мере еще одно антитело захвата, которое специфически связывается с эпитопами легкой цепи частично

45 процессированного полипептида нейротоксина, и еще по меньшей мере одно антитело захвата, которое специфично связывается с эпитопами легкой цепи процессированного полипептида нейротоксина. Следует иметь в виду, что эти три типа антител имеют функциональное сходство с первым антителом захвата в целях способа по настоящему изобретению. Похожим образом, антитело захвата, которое специфически связывается

с эпитопами легкой цепи частично процессированного и неprocessированного полипептида нейротоксина, может применяться в комбинации с антителом захвата, которое специфически связывается с эпитопами легкой цепи процессированного полипептида нейротоксина.

- 5 Указанное первое антитело захвата в некотором варианте должно быть иммобилизовано. Названная иммобилизация антитела, в принципе, может достигаться, в некотором варианте, обратимым или необратимым, прямым или непрямым (через линкерные молекулы) связыванием антитела с твердой подложкой. В некотором варианте изобретения, первое антитело захвата иммобилизуется до выполнения способа.
- 10 В другом варианте, первое антитело захвата иммобилизуется после того, как был сформирован первый антитело-содержащий комплекс, но до контактирования комплекса с антителом обнаружения. Материалы для твердых подложек известны специалистам в данной области техники и включают, среди прочего, коммерчески доступные полисахаридные матрицы, выбранные из группы, состоящей из: сефарозы, сефадекса;
- 15 агарозы, сефацела, микроцеллюлозы и альгинатных гранул, полипептидных матриц, гранул полистирола, латексных гранул, магнитных гранул, коллоидных металлических частиц, стеклянных, пластмассовых и/или кремниевых крошек и поверхностей, нитроцеллюлозных полосок, мембран, листов, стабилизированных эритроцитов, лунки и стенки реакционных плашек, пластиковых пробирок. В некотором варианте
- 20 настоящего изобретения, названная твердая подложка изготовлена из полистирола, подвергнутого гамма-облучению.

Термин "первый антитело-содержащий комплекс" относится к комплексу, содержащему первое антитело захвата, специфически связанное с процессированными, частично процессированными, или формируется в результате контактирования первого

25 антитела захвата с раствором, содержащим названные процессированные, частично процессированные или неprocessированные полипептиды нейротоксины, как указано выше.

Согласно способу по настоящему изобретению, "второе антитело захвата" специфически связывается с эпитопом, который содержит линкер неprocessированного

30 и/или частично процессированного полипептида нейротоксина или его частей. В случаях, где линкерная последовательность отсутствует, предусматривается, что названное второе антитело захвата специфически связывается с эпитопом, содержащим нерасщепленный сайт протеолитического расщепления или его части. В некотором аспекте изобретения, второе антитело захвата не реагирует перекрестно с

35 processированным полипептидом нейротоксином в существенной степени. В некотором варианте настоящего изобретения, названное второе иммобилизованное антитело захвата специфически связывается с эпитопом, по существу состоящим из аминокислотной последовательности, как показано SEQ ID NO:1-16, содержащим ее или содержащимся ей, смотрите Таблицы 2 или 3, приведенные ниже.

40

Таблица 2		
Аминокислотная последовательность сайтов расщепления различных полипептидов нейротоксинов и фланкирующих последовательностей		
SEQ	Последовательность эпитопа, включающая сайты расщепления (выделено)	Нейротоксин (бактериальный штамм)
1	KLLCVRGHTSKTKSLDKGYNKALN...DLCIKV	BoNT/A (Hall/62A)
2	IQMCKSVKAPG...ICIDV	BoNT/B (Okra)
3	TKFCHKAIDGRSL...YNKTL...DCRELIV	BoNT/CI (C-6814)
4	TKVCLRLTK...NSRD...DSTCIKV	BoNT/D
5	IRFCKNIVSVKG...IRK...SICIEI	BoNT/E (Beluga)
6	VKFKSVIPRKG...TKAP...PRLCIRV	BoNT/F(NCTC10281)

45

7	IAMCKPVMYKNT...GKS...EQCHV	BoNT/G
8	IGLCKKHPPTNIRENLNRTASLTDLGELCIKI	TeNT

Таблица 3			
Аминокислотные последовательности линкерных участков			
SEQ ID NO:	Последовательность эпитопов	Сайты расщепления	Нейротоксин/бактериальный штамм
9	TKSLDKGYNK	K438/T439 K448/A449	BoNT/A (Hall/62A)
10	CKSVKAPGIC	K441/A442	BoNT/B (Okra)
11	SLYNK	R444/S445 K449/T450	BoNT/CI (C-6814)
12	NSR	K442/N443	BoNT/D (CB16)
		R445/D446	
13	GIR	K419/G420 R422/K423	BoNT/E (Beluga)
14	KGTK	R435/K436 K439/A440	BoNT/F(NCTC 10281)
15	NGTK		BoNT/G
16	ENLYNR	R449 (альтернативно R455)	TeNT

Благодаря присутствию вышеупомянутого эпитопа, непротессированные или частично протессированные полипептиды нейротоксины могут специфически связываться вторым антителом захвата и, таким образом, формировать второй антитело-содержащий комплекс. Названное второе антитело захвата является иммобилизованным, как подробно объяснено выше.

Соответственно, термин "второй антитело-содержащий комплекс" относится к комплексу, содержащему второе антитело захвата, специфически связанное с частично протессированным или непротессированным полипептидом нейротоксином. Названный второй антитело-содержащий комплекс, однако, не должен содержать протессированный полипептид нейротоксин.

Согласно способу по настоящему изобретению "антитело обнаружения" специфически связывается с первым и/или вторым антитело-содержащим комплексом. В некотором варианте изобретения, антитело обнаружения идентично для первого и второго антитело-содержащего комплекса. Однако в другом варианте, для первого и второго антитело-содержащего комплекса могут использоваться различные антитела обнаружения. В некотором варианте, антитело обнаружения специфически связывается с эпитопами на тяжелой цепи протессированного, частично протессированного и непротессированного полипептида нейротоксина. Вследствие присутствия одного и того же эпитопа в обоих комплексах, первый антитело-содержащий комплекс или второй антитело-содержащий комплекс могут быть специфически связаны и, таким образом, обнаружены с помощью антитела обнаружения в указанном варианте настоящего изобретения.

В результате специфического связывания антитела обнаружения, формируются первый комплекс обнаружения или второй комплекс обнаружения, соответственно.

Поэтому термин "первый комплекс обнаружения" относится к комплексу, содержащему первый антитело-содержащий комплекс и антитело обнаружения. Аналогично, термин "второй комплекс обнаружения" относится к комплексу, содержащему второй антитело-содержащий комплекс и антитело обнаружения.

В аспекте способа по настоящему изобретению, указанное антитело обнаружения, содержащееся в первом или втором комплексе обнаружения, соединено с детектируемой меткой, позволяющей измерять количество антитела обнаружения, которое связано с комплексом обнаружения. С помощью измерения количества названного связанного антитела обнаружения может быть определено количество первых или вторых антитело-содержащих комплексов, так как количество связанного антитела обнаружения в

комплексе обнаружения коррелирует с количеством антитело-содержащего комплекса, содержащимся в комплексе обнаружения. Мечение может быть проведено прямыми или непрямими методами. Прямое мечение включает в себя непосредственное

5 Косвенное мечение включает в себя связывание (ковалентно или нековалентно) агента, который специфически связывается с антителом обнаружения и который несет детектируемую метку. Таким агентом может быть, например, вторичное (более высокого порядка) антитело, которое специфически связывается с антителом обнаружения. Вторичное антитело в таком случае будет соединено с детектируемой меткой. Следует
10 иметь в виду, что дополнительные антитела более высокого порядка часто используются также для детектирования комплекса обнаружения. Антитела более высокого порядка часто используются для усиления сигнала. Подходящие антитела более высокого порядка могут также включать хорошо известную систему стрептавидин-биотин (Vector Laboratories, Inc.) и хорошо известный Dako LSAB™2 и LSAB™+ (меченый стрептавидин-
15 биотин), или Dako PAP (пероксидаза антипероксидаза). В следующем варианте указанная метка первого антитела обнаружения выбирается из группы, состоящей из: флуоресцентных красителей, хемоллюминесцентных молекул, радиоактивных меток и ферментов, способных генерировать детектируемый сигнал. Типичные флуоресцентные метки включают флуоресцентные белки (такие как GFP и его производные), Cy3, Cy5, Texas Red, флуоресцеин и Texas Red (например, Alexa 568). Типичные радиоактивные
20 метки включают ³⁵S, ¹²⁵I, ³²P, ³³P и т.п. Альтернативно, детектируемая метка, соединенная с названным первым антителом обнаружения, может также быть ферментом, который способен к генерированию детектируемого сигнала, например, путем конверсии субстрата. В некотором варианте, такой фермент может быть
25 пероксидазой (например, пероксидазой хрена) или щелочной фосфатазой.

Термин "определение количества", используемый в настоящем изобретении, касается измерения абсолютного количества, относительного количества или концентрации количественным или полуколичественным способом. Измерение будет осуществляться
30 на основе химических, физических или биологических свойств детектируемой метки, соединенной с первым антителом обнаружения. Подходящие единицы измерения для обнаружения хорошо известны специалистам в данной области техники и зависят от природы детектируемой метки, как указывалось выше. Однако необходимо понимать, что количество детектируемой метки, которое может быть измерено, прямо коррелирует
35 с количеством комплекса обнаружения, которое в свою очередь коррелирует с количеством антитело-содержащего комплекса и, таким образом, с количеством подлежащих определению видов нейротоксина, которые должны быть определены, то есть либо общего (процессированного, непроцессированного и частично
40 процессированного нейротоксина), либо непроцессированного и частично процессированного нейротоксина. Следует понимать, что определение количества полипептидов нейротоксинов, в некотором варианте, также требует калибровки способа путем применения стандартных растворов с предопределенным количеством полипептидов нейротоксинов. То, как выполнять такую калибровку, хорошо известно
специалистам в данной области техники.

Термин «вычисление», используемый в соответствии со способом по настоящему изобретению, касается математических операций, которые позволяют определить
45 количество процессированного нейротоксина на основании количеств общего нейротоксина (то есть процессированного, непроцессированного и частично процессированного нейротоксина) и количества частично процессированного и

непроцессированного нейротоксина. В отношении способа по настоящему изобретению, вышеуказанные вычисления включают вычитание количества частично процессированного и непроцессированного нейротоксина из количества общего нейротоксина.

- 5 Способ в соответствии с настоящим изобретением преимущественно позволяет надежно определять количество процессированного нейротоксина в данном препарате. Соответственно, качество препаратов на основе нейротоксина может быть повышено, так как препараты могут быть проверены на постоянное содержание требующегося процессированного полипептида нейротоксина.
- 10 В принципе, способ по настоящему изобретению может быть выполнен присоединением первого антитела захвата к твердой подложке, такой как реакционная пробирка. Точно так же, второе антитело захвата должно быть соединено с другой физически отдельной твердой подложкой (например, с дополнительной реакционной пробиркой). Оба антитела захвата, присоединенные к твердым подложкам, будут
- 15 последовательно вовлечены в контакт с названными порциями раствора, содержащими процессированный, непроцессированный и/или частично процессированный нейротоксин, подлежащий определению. Таким раствором может быть, например, очищенная бактериальная клеточная культура *Clostridium* sp. Следует иметь в виду, что первая порция будет вовлечена в контакт с первым антителом захвата на первой твердой
- 20 подложке, а вторая порция будет вовлечена в контакт со вторым антителом захвата на второй твердой подложке. Порции обычно имеют равный объем и нормализованы относительно их содержимого, например, содержания общего белка. Контактное взаимодействие будет выполнено в течение времени, достаточного для специфического связывания первых и вторых антител захвата с их соответствующими антигенами. Например,
- 25 контактное взаимодействие может быть выполнено при комнатной температуре в течение около одного часа. Впоследствии первая и вторая порции раствора удаляются, и твердые подложки (например, реакционные пробирки) будут промыты один или два раза буфером, при условиях, которые не влияют на первый и второй антитело-содержащие комплексы, которые были к тому времени сформированы с антителами захвата на
- 30 твердых подложках. После того как стадии промывки были выполнены, (первое) антитело обнаружения должно быть добавлено к твердым подложкам, при условиях, которые позволяют специфическое связывание антитела обнаружения. Избыток антитела обнаружения должен быть удален дальнейшими стадиями промывки с использованием подходящего буфера. Впоследствии, количество первого и второго комплексов
- 35 обнаружения может быть определено определением количества специфически связанного антитела обнаружения. Это достигается в зависимости от природы метки антитела обнаружения, например, измерением оптической плотности или интенсивности флуоресценции. Измеренное количество для детектируемой метки может сравниваться со стандартами калибровки, чтобы определить количество видов нейротоксина, то
- 40 есть либо общий (процессированный, непроцессированный и частично процессированный нейротоксин), либо непроцессированный и частично процессированный нейротоксин в первом или во втором комплексе обнаружения. Следует иметь в виду, что первый комплекс обнаружения представляет количество общего нейротоксина, в то время как второй комплекс обнаружения представляет количество только частично
- 45 процессированных и непроцессированных полипептидов нейротоксина. Соответственно, количество процессированного полипептида нейротоксина может быть вычислено вышеупомянутым способом, вычитанием количества частично процессированного или непроцессированного полипептида нейротоксина из общего количества полипептида

нейротоксина.

Следует понимать, что вышеприведенные определения и объяснения терминов применяются с изменениями и оговорками в отношении всех вариантов, описанных в этом описании, если не указано иное.

5 Настоящее изобретение также касается способа определения количества процессированного (активного) полипептида нейротоксина в растворе, содержащем процессированный полипептид нейротоксин и частично процессированный и/или непроцессированный полипептид нейротоксин, содержащего стадии:

а) контактирование первой порции указанного раствора с первым антителом захвата,
10 которое специфически связывается с тяжелыми цепями зрелого полипептида нейротоксина, частично процессированного и непроцессированного полипептида нейротоксина, при условиях, которые обеспечивают связывание названного антитела с указанным зрелым нейротоксином, частично процессированным и непроцессированным полипептидом нейротоксином, с формированием, таким образом,
15 первого антитело-содержащего комплекса,

б) контактирование первого антитело-содержащего комплекса с антителом обнаружения, которое специфически связывается с легкой цепью указанного зрелого нейротоксина, частично процессированного и непроцессированного полипептида нейротоксина в антитело-содержащем комплексе, сформированном на стадии а),
20 посредством чего формируется первый комплекс обнаружения,

с) контактирование второй порции указанного раствора со вторым антителом захвата, которое специфически связывается с линкерами указанных частично процессированного и непроцессированного полипептида нейротоксина, при условиях, которые обеспечивают связывание указанного антитела с названным частично
25 процессированным и непроцессированным полипептидом нейротоксином, с формированием, таким образом, второго антитело-содержащего комплекса,

д) контактирование второго антитело-содержащего комплекса с антителом обнаружения, посредством чего формируется второй комплекс обнаружения,

е) определение количества первого и второго комплексов обнаружения,
30 сформированных на стадии б) и стадии д), и

ф) вычисление количества зрелого полипептида нейротоксина на основании количеств первого и второго комплексов обнаружения, определенных на стадии е).

В другом варианте способов в соответствии с настоящим изобретением, названные способы дополнительно содержат определение связывающей активности полипептида
35 нейротоксина.

Термин "связывающая активность", применяющийся в соответствии со способом по настоящему изобретению, относится к способности процессированного полипептида нейротоксина связываться с поверхностным рецепторным белком, который присутствует, например, на периферийных холинергических нервных окончаниях.

40 Рецепторные белки включают SV2 для BoNT/A, синап-тотагмины I и II для BoNT/B и BoNT/G, и ганглиозидный (GT1B) корецептор. В отношении способа в соответствии с настоящим изобретением, названная связывающая активность может быть определена методом ex vivo с использованием модельного субстрата, который заменяет поверхностный белковый рецептор путем имитации его связывающего домена.

45 Названный модельный субстрат является, в некотором варианте, меченым пептидом, полученным из вышеупомянутых рецепторных белков. В другом варианте, подходящие метки включают те, которые упомянуты в другой части описания настоящего изобретения, и, в частности, биотин.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу определения связывающей активности полипептида нейротоксина, содержащему стадии

а) контактирование порции раствора, содержащего полипептид нейротоксин, с меченым пептидом, посредством чего формируется комплекс, и

5 б) определение указанного комплекса, сформированного на стадии (а), основанное на метке, посредством которой присутствие или отсутствие комплекса, или его количество свидетельствуют о связывающей активности полипептида нейротоксина в указанном растворе.

10 Комплекс может быть определен на основе природы метки, которая использовалась для мечения пептида. В некотором варианте, например, биотинилированный пептид, содержащийся в комплексе, может быть определен с помощью стрептавидинового конъюгата, способного генерировать детектируемый сигнал. Присутствие, отсутствие или интенсивность будут свидетельствовать о связывающей активности полипептидов нейротоксинов в растворе или их силы.

15 В другом варианте способа в соответствии с настоящим изобретением, указанный способ дополнительно содержит определение протеолитической активности полипептида нейротоксина.

Термин "протеолитическая активность", применяющийся в соответствии со способом по настоящему изобретению, касается способности процессированного нейротоксина 20 протеолитически расщеплять чувствительный к N-этилмалеимиду фактор, обеспечивающий прикрепление белков (SNARE), вовлеченных в слияние мембраны синаптического пузырька. В некотором варианте указанное расщепление является цинк-независимым. Названная протеолитическая активность может быть определена с использованием модельного субстрата, который заменяет природный SNARE-белок. 25 Более того, при расщеплении детектируемая метка, такая как краситель, должна высвобождаться из названного модельного субстрата. В одном варианте, модельным субстратом является соединение, имеющее общую формулу X-пара-нитроанилид, где X - это аргинин или пептид, имеющий последовательность аргинин-Y, в которой Y представляет собой одну или более аминокислот, и в другом варианте, соединением 30 является аргинин-пара-нитроанилид.

Таким образом, настоящее изобретение, кроме того, относится к способу определения протеолитической активности нейротоксина, включающему стадии

а) контактирование порции раствора, содержащего полипептид нейротоксин, с соединением, имеющим общую формулу: X-пара-нитроанилид, где X является аргинином 35 или пептидом, имеющим последовательность аргинин-Y, где Y представляет собой одну или более аминокислот, и

б) определение протеолитической активности полипептида нейротоксина в указанном растворе на основе количества высвободившегося пара-нитроанилина на стадии б), которое коррелирует с количеством полипептида нейротоксина.

40 В этом варианте Y представляет остаток пептида, имеющего аминокислотную последовательность, как показано любой из последовательностей SEQ ID NOs:25 или 26.

Процессированный полипептид нейротоксин, содержащийся указанной порцией раствора, может расщепляться и, таким образом, высвобождать пара-нитроанилин из 45 оставшегося пептида. Пара-нитроанилин является красителем, хорошо известным специалистам в данной области техники. Определение протеолитической активности полипептида нейротоксина в указанном растворе основано на количестве высвобождающегося пара-нитроанилина, которое коррелирует с количеством

полипептида нейротоксина.

Настоящее изобретение также относится к устройству для определения количества процессированного полипептида нейротоксина в растворе, содержащему:

а) систему первого антитела захвата, второго антитела захвата и антитела обнаружения, где указанная система позволяет проводить стадии а)-е) вышеупомянутых способов; и

б) средства для вычисления количества зрелого полипептида нейротоксина на основании количеств первого и второго комплексов обнаружения, определенных с помощью системы в соответствии с а).

Термин "устройство", применяющийся в настоящем изобретении, касается системы, содержащей по меньшей мере вышеуказанную установку и средства, операционно связанные друг с другом, чтобы делать возможным определение. В некотором варианте, система может представлять собой твердую подложку с иммобилизованными антителами захвата, как упомянуто выше, которые могут находиться в физически разделенных пробирках, чтобы позволить отдельное контактирование с первой и второй порцией раствора. Более того, устройство может содержать, в некотором варианте, блок для определения количества комплексов обнаружения. В зависимости от вида используемых антител обнаружения, такой блок будет содержать детектор для сигналов, генерируемых антителом обнаружения. Кроме того, блок может также содержать, в некотором варианте, средства для калибровки, например, алгоритм, основанный на компьютере, для сравнения измеряемых сигналов с калибровочными стандартами, чтобы определять количество полипептидов нейротоксинов, присутствующих в растворе или в его порциях. Устройство будет также содержать средства для вычисления количества зрелого полипептида нейротоксина на основании количества первого и второго комплексов обнаружения, например, компьютерный алгоритм для проведения вычисления.

Кроме того, настоящее изобретение относится к набору, подходящему для проведения вышеуказанных способов, причем указанный набор содержит:

а) систему первого антитела захвата, второго антитела захвата и антитела обнаружения, где указанная система позволяет проведение стадий от а) до е) вышеупомянутых способов;

б) средства для вычисления количества зрелого полипептида нейротоксина на основании количеств первого и второго комплексов обнаружения, определенных с помощью системы в соответствии с а); и

с) инструкции для проведения указанного способа.

Термин "набор", используемый в настоящем изобретении, относится к набору вышеупомянутых средств или реактивов в соответствии с настоящим изобретением, которые могут быть упакованы вместе или по отдельности. Компоненты набора могут содержать отдельные ампулы (то есть как набор отдельных частей) или поставляться в виде единственной ампулы. Кроме того, следует понимать, что набор в соответствии с настоящим изобретением предназначен для осуществления способов, упомянутых в описании настоящего изобретения, приведенном выше. В одном варианте предусматривается, что все компоненты поставляются в состоянии, готовом для осуществления вышеупомянутых способов. В другом варианте, набор содержит инструкции для того, чтобы выполнить указанные способы. Инструкции могут быть представлены в виде руководства для пользователя в бумажной или электронной форме. Например, руководство может содержать инструкции для интерпретации результатов, полученных при выполнении вышеупомянутых способов с использованием набора в соответствии с настоящим изобретением.

Все ссылки, процитированные в настоящем описании, таким образом включены посредством как в отношении их полного содержания, так и в отношении их конкретно упомянутой части.

Чертежи

- 5 Фиг.1: Схема связывания по меньшей мере одного (или более) антитела обнаружения.
 Фиг.2: Схема специфического связывания второго антитела захвата с частично процессированным или непроцессированным предшественником полипептида нейротоксина и последующего связывания по меньшей мере одного (или более) антитела обнаружения.
 10 Фиг.3: Схема определения связывающей активности полипептида нейротоксина.
 Фиг.4: Схема определения протеолитической активности полипептида нейротоксина.

Формула изобретения

1. Способ определения количества процессированного полипептида нейротоксина
 15 в растворе, содержащем процессированный полипептид нейротоксин и частично процессированный и/или непроцессированный полипептид нейротоксин, содержащий стадии:

- а) контактирование первой порции указанного раствора с первым антителом захвата, которое специфически связывается с легкими цепями процессированных, частично
 20 процессированных и непроцессированных полипептидов нейротоксинов, при условиях, обеспечивающих связывание указанного антитела с указанным нейротоксином, с формированием, таким образом, первого антитело-содержащего комплекса,
 б) контактирование первого антитело-содержащего комплекса с антителом обнаружения, которое специфически связывается с тяжелыми цепями указанных
 25 процессированных, непроцессированных и частично процессированных полипептидов нейротоксинов в антитело-содержащем комплексе, сформированном на стадии а), посредством чего формируется первый комплекс обнаружения,
 в) контактирование второй порции указанного раствора со вторым антителом захвата, которое специфически связывается с линкером указанного частично
 30 процессированного или непроцессированного полипептида нейротоксина, при условиях, обеспечивающих связывание указанного антитела с указанным частично процессированным или непроцессированным полипептидом нейротоксином, с формированием, таким образом, второго антитело-содержащего комплекса,
 г) контактирование второго антитело-содержащего комплекса с антителом
 35 обнаружения, посредством чего формируется второй комплекс обнаружения,
 е) определение количества первого и второго комплексов обнаружения, сформированных на стадии б) и стадии г), и
 ф) вычисление количества зрелого полипептида нейротоксина на основании количеств первого и второго комплексов обнаружения, определенных на стадии е).

- 40 2. Способ по п.1, в котором указанное первое антитело захвата иммобилизовано.

3. Способ по п.1, в котором указанное второе антитело захвата иммобилизовано.

4. Способ по п.1, в котором вычисление на стадии ф) содержит вычитание определенного количества второго комплекса обнаружения из определенного количества первого комплекса обнаружения.

- 45 5. Способ по п.1, в котором указанное второе антитело захвата специфически связывается с пептидным эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность, как показано любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-16.

6. Способ по п.1, в котором указанный полипептид нейротоксин выбирается из

группы, состоящей из:

а) полипептида нейротоксина, как показано любой из SEQ ID NO: 17-24; и

б) полипептида нейротоксина, имеющего аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 40% идентичной аминокислотной последовательности полипептида нейротоксина согласно а).

7. Способ по п.1, где указанный способ дополнительно содержит определение связывающей активности полипептида нейротоксина.

8. Способ по п.7, содержащий стадии:

а) контактирование порции раствора, содержащего полипептид нейротоксин, с меченым пептидом, посредством чего формируется комплекс, и

б) определение указанного комплекса, сформированного на стадии (а), основанное на метке, где присутствие или отсутствие комплекса, или его количество свидетельствуют о связывающей активности полипептида нейротоксина в указанном растворе.

9. Способ по п.1, где указанный способ дополнительно содержит определение протеолитической активности полипептида нейротоксина.

10. Способ по п.9, содержащий стадии:

а) контактирование порции раствора, содержащего полипептид нейротоксин, с соединением, имеющим общую формулу: X-пара-нитроанилид, где X является аргинином или пептидом, имеющим последовательность аргинин-У, где У представляет собой одну или более аминокислот, и

б) определение протеолитической активности полипептида нейротоксина в указанном растворе на основании количества высвободившегося пара-нитроанилина на стадии б), которое коррелирует с количеством полипептида нейротоксина.

11. Способ определения количества процессированного (активного) полипептида нейротоксина в растворе, содержащем процессированный полипептид нейротоксин и частично процессированный и/или непроцессированный полипептид нейротоксин, содержащий стадии:

а) контактирование первой порции указанного раствора с первым антителом захвата, которое специфически связывается с тяжелыми цепями зрелого полипептида нейротоксина, частично процессированного и непроцессированного полипептида нейротоксина, при условиях, которые обеспечивают связывание указанного антитела с указанным зрелым нейротоксином, частично процессированным и непроцессированным полипептидом нейротоксином, с формированием, таким образом, первого антитело-содержащего комплекса,

б) контактирование первого антитело-содержащего комплекса с антителом обнаружения, которое специфически связывается с легкой цепью указанного зрелого нейротоксина, частично процессированного и непроцессированного полипептида нейротоксина в антитело-содержащем комплексе, сформированном на стадии а), посредством чего формируется первый комплекс обнаружения,

с) контактирование второй порции указанного раствора со вторым антителом захвата, которое специфически связывается с линкерами указанного частично процессированного и непроцессированного полипептида нейротоксина, при условиях, которые обеспечивают связывание указанного антитела с указанным частично процессированным и непроцессированным полипептидом нейротоксином, с формированием, таким образом, второго антитело-содержащего комплекса,

д) контактирование второго антитело-содержащего комплекса с антителом обнаружения, посредством чего формируется второй комплекс обнаружения,

е) определение количества первого и второго комплексов обнаружения,

сформированных на стадии b) и стадии d), и

f) вычисление количества зрелого полипептида нейротоксина на основании количеств первого и второго комплексов обнаружения, определенных на стадии e).

12. Способ по п.11, в котором указанное первое антитело захвата иммобилизовано.

5 13. Способ по п.11, в котором указанное второе антитело захвата иммобилизовано.

14. Способ по п.11, в котором вычисление на стадии f) содержит вычитание определенного количества второго комплекса обнаружения из определенного количества первого комплекса обнаружения.

10 15. Способ по п.11, в котором указанное второе антитело захвата специфически связывается с пептидным эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность, как показано любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-16.

16. Способ по п.11, в котором указанный полипептид нейротоксин выбирается из группы, состоящей из:

a) полипептида нейротоксина, как показано любой из SEQ ID NO: 17-24; и

15 b) полипептида нейротоксина, имеющего аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 40% идентичной аминокислотной последовательности полипептида нейротоксина согласно a).

17. Способ по п.11, где указанный способ дополнительно содержит определение связывающей активности полипептида нейротоксина.

20 18. Способ по п.17, содержащий стадии:

a) контактирование порции раствора, содержащего полипептид нейротоксин, с меченым пептидом, посредством чего формируется комплекс, и

25 b) определение указанного комплекса, сформированного на стадии (a), основанное на метке, где присутствие или отсутствие комплекса, или его количество свидетельствуют о связывающей активности полипептида нейротоксина в указанном растворе.

19. Способ по п.11, где указанный способ дополнительно содержит определение протеолитической активности полипептида нейротоксина.

20. Способ по п.19, содержащий стадии:

30 a) контактирование порции раствора, содержащего полипептид нейротоксин, с соединением, имеющим общую формулу: X-пара-нитроанилид, где X является аргинином или пептидом, имеющим последовательность аргинин-Y, где Y представляет собой одну или более аминокислот, и

35 b) определение протеолитической активности полипептида нейротоксина в указанном растворе на основании количества высвободившегося пара-нитроанилина на стадии b), которое коррелирует с количеством полипептида нейротоксина.

21. Устройство для определения количества процессированного полипептида нейротоксина в растворе, содержащее:

40 a) систему первого антитела захвата, второго антитела захвата и антитела обнаружения, где указанная система позволяет проводить стадии a)-e) способов по любому из пп.1-10; и

b) средства для вычисления количества зрелого полипептида нейротоксина на основании количеств первого и второго комплексов обнаружения, определенных с помощью системы согласно a).

45 22. Устройство для определения количества процессированного полипептида нейротоксина в растворе, содержащее:

a) систему первого антитела захвата, второго антитела захвата и антитела обнаружения, где указанная система позволяет проводить стадии a)-e) способов по любому из пп.11-20; и

б) средства для вычисления количества зрелого полипептида нейротоксина на основании количеств первого и второго комплексов обнаружения, определенных с помощью системы согласно а).

23. Набор, подходящий для осуществления способа по любому из пп.1-10, где
5 указанный набор содержит:

а) систему первого антитела захвата, второго антитела захвата и антитела обнаружения, где указанная система позволяет осуществление стадий а)-е) способов по любому из пп.1-10;

б) средства для вычисления количества зрелого полипептида нейротоксина на
10 основании количеств первого и второго комплексов обнаружения, определенных с помощью системы в соответствии с а); и

с) инструкции для осуществления указанного способа.

24. Набор, подходящий для осуществления способа по любому из пп.11-20, где
указанный набор содержит:

а) систему первого антитела захвата, второго антитела захвата и антитела
15 обнаружения, где указанная система позволяет осуществление стадий а)-е) способов по любому из пп.11-20;

б) средства для расчета количества зрелого полипептида нейротоксина на основании
количеств первого и второго комплексов обнаружения, определенных с помощью
20 системы в соответствии с а); и

с) инструкции для осуществления указанного способа.

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Merz Pharma GmbH & Co. KGaA

<120> Средства и способы определения количества полипептида нейротоксина и его каталитической и протеолитической активностей

<130> MP66084EP

<160> 26

<170> Patentin version 3.5

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 1

Lys Leu Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu
1 5 10 15

Asp Lys Gly Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val
20 25 30

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 2

Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys Ile Asp Val
1 5 10 15

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 3

Thr Lys Phe Cys His Lys Ala Ile Asp Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Lys
1 5 10 15

Thr Leu Asp Cys Arg Glu Leu Leu Val
20 25

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 4

Thr Lys Val Cys Leu Arg Leu Thr Lys Asn Ser Arg Asp Asp Ser Thr
1 5 10 15

Cys Ile Lys Val
20

<210> 5
<211> 21
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<400> 5

Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser
1 5 10 15

Ile Cys Ile Glu Ile
20

<210> 6
<211> 23
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<400> 6

Val Lys Phe Cys Lys Ser Val Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Ala Pro
1 5 10 15

Pro Arg Leu Cys Ile Arg Val
20

<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<400> 7

Ile Ala Met Cys Lys Pro Val Met Tyr Lys Asn Thr Gly Lys Ser Glu
1 5 10 15

Gln Cys Ile Ile Val
20

<210> 8
<211> 35
<212> PRT
<213> Clostridium tetani

<400> 8

Ile Gly Leu Cys Lys Lys Ile Ile Pro Pro Thr Asn Ile Arg Glu Asn
1 5 10 15

Leu Tyr Asn Arg Thr Ala Ser Leu Thr Asp Leu Gly Gly Glu Leu Cys
20 25 30

Ile Lys Ile
35

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<400> 9

Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys
1 5 10

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<400> 10

Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys
1 5 10

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<400> 11

Ser Leu Tyr Asn Lys
1 5

<210> 12
<211> 3
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<400> 12

Asn Ser Arg
1

<210> 13
<211> 3
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<400> 13

Gly Ile Arg
1

<210> 14
<211> 4

<212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<400> 14

Lys Gly Thr Lys
1

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<400> 15

Asn Gly Thr Lys
1

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> Clostridium tetani

<400> 16

Glu Asn Leu Tyr Asn Arg
1 5

<210> 17
<211> 1296
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<400> 17

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
1 5 10 15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
20 25 30

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
35 40 45

Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
50 55 60

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
65 70 75 80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu
85 90 95

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val

100					105					110					
Arg	Gly	Ile	Pro	Phe	Trp	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Asp	Thr	Glu	Leu	Lys
		115					120					125			
Val	Ile	Asp	Thr	Asn	Cys	Ile	Asn	Val	Ile	Gln	Pro	Asp	Gly	Ser	Tyr
	130					135					140				
Arg	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Leu	Val	Ile	Ile	Gly	Pro	Ser	Ala	Asp	Ile
145					150					155					160
Ile	Gln	Phe	Glu	Cys	Lys	Ser	Phe	Gly	His	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Thr
				165					170					175	
Arg	Asn	Gly	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln	Tyr	Ile	Arg	Phe	Ser	Pro	Asp	Phe
			180					185					190		
Thr	Phe	Gly	Phe	Glu	Glu	Ser	Leu	Glu	Val	Asp	Thr	Asn	Pro	Leu	Leu
		195					200					205			
Gly	Ala	Gly	Lys	Phe	Ala	Thr	Asp	Pro	Ala	Val	Thr	Leu	Ala	His	Glu
	210					215					220				
Leu	Ile	His	Ala	Gly	His	Arg	Leu	Tyr	Gly	Ile	Ala	Ile	Asn	Pro	Asn
225					230					235					240
Arg	Val	Phe	Lys	Val	Asn	Thr	Asn	Ala	Tyr	Tyr	Glu	Met	Ser	Gly	Leu
				245					250					255	
Glu	Val	Ser	Phe	Glu	Glu	Leu	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	His	Asp	Ala	Lys
			260					265					270		
Phe	Ile	Asp	Ser	Leu	Gln	Glu	Asn	Glu	Phe	Arg	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Asn
		275					280					285			
Lys	Phe	Lys	Asp	Ile	Ala	Ser	Thr	Leu	Asn	Lys	Ala	Lys	Ser	Ile	Val
	290					295					300				
Gly	Thr	Thr	Ala	Ser	Leu	Gln	Tyr	Met	Lys	Asn	Val	Phe	Lys	Glu	Lys
305					310					315					320
Tyr	Leu	Leu	Ser	Glu	Asp	Thr	Ser	Gly	Lys	Phe	Ser	Val	Asp	Lys	Leu
				325					330					335	
Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Lys	Met	Leu	Thr	Glu	Ile	Tyr	Thr	Glu	Asp
			340					345					350		

RU 2 545 783 C9 (W1 C2)

Asn	Phe	Val	Lys	Phe	Phe	Lys	Val	Leu	Asn	Arg	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn
		355					360					365			
Phe	Asp	Lys	Ala	Val	Phe	Lys	Ile	Asn	Ile	Val	Pro	Lys	Val	Asn	Tyr
	370					375					380				
Thr	Ile	Tyr	Asp	Gly	Phe	Asn	Leu	Arg	Asn	Thr	Asn	Leu	Ala	Ala	Asn
385					390					395					400
Phe	Asn	Gly	Gln	Asn	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Met	Asn	Phe	Thr	Lys	Leu
				405					410					415	
Lys	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Phe	Glu	Phe	Tyr	Lys	Leu	Leu	Cys	Val	Arg
			420					425					430		
Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys	Ser	Leu	Asp	Lys	Gly	Tyr	Asn	Lys
		435					440					445			
Ala	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys	Ile	Lys	Val	Asn	Asn	Trp	Asp	Leu	Phe	Phe
	450					455					460				
Ser	Pro	Ser	Glu	Asp	Asn	Phe	Thr	Asn	Asp	Leu	Asn	Lys	Gly	Glu	Glu
465					470					475					480
Ile	Thr	Ser	Asp	Thr	Asn	Ile	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Asn	Ile	Ser	Leu
				485					490					495	
Asp	Leu	Ile	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asn	Phe	Asp	Asn	Glu	Pro
			500					505					510		
Glu	Asn	Ile	Ser	Ile	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	Ile	Gly	Gln	Leu
		515					520					525			
Glu	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Glu	Arg	Phe	Pro	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Glu
	530					535					540				
Leu	Asp	Lys	Tyr	Thr	Met	Phe	His	Tyr	Leu	Arg	Ala	Gln	Glu	Phe	Glu
545					550					555					560
His	Gly	Lys	Ser	Arg	Ile	Ala	Leu	Thr	Asn	Ser	Val	Asn	Glu	Ala	Leu
				565					570					575	
Leu	Asn	Pro	Ser	Arg	Val	Tyr	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser	Asp	Tyr	Val	Lys
			580					585					590		
Lys	Val	Asn	Lys	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Met	Phe	Leu	Gly	Trp	Val	Glu
		595					600					605			

Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
 610 615 620
 Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
 625 630 635 640
 Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
 645 650 655
 Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
 660 665 670
 Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
 675 680 685
 Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
 690 695 700
 Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
 705 710 715 720
 Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
 725 730 735
 Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
 740 745 750
 Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
 755 760 765
 Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
 770 775 780
 Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
 785 790 795 800
 Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
 805 810 815
 Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
 820 825 830
 Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
 835 840 845
 Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
 850 855 860

Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
865 870 875 880

Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
885 890 895

Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn
900 905 910

Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu
915 920 925

Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser
930 935 940

Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn
945 950 955 960

Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
965 970 975

Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu
980 985 990

Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Se
995 1000 1005

Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg
1010 1015 1020

Leu Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln
1025 1030 1035

Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile
1040 1045 1050

Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp
1055 1060 1065

Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu
1070 1075 1080

Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys
1085 1090 1095

Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met

1100		1105		1110
Leu Asn 1115	Leu Tyr Asp Pro	Asn 1120	Lys Tyr Val Asp	Val Asn Asn Val 1125
Gly Ile 1130	Arg Gly Tyr Met	Tyr 1135	Leu Lys Gly Pro	Arg Gly Ser Val 1140
Met Thr 1145	Thr Asn Ile Tyr	Leu 1150	Asn Ser Ser Leu	Tyr Arg Gly Thr 1155
Lys Phe 1160	Ile Ile Lys Lys	Tyr 1165	Ala Ser Gly Asn	Lys Asp Asn Ile 1170
Val Arg 1175	Asn Asn Asp Arg	Val 1180	Tyr Ile Asn Val	Val Val Lys Asn 1185
Lys Glu 1190	Tyr Arg Leu Ala	Thr 1195	Asn Ala Ser Gln	Ala Gly Val Glu 1200
Lys Ile 1205	Leu Ser Ala Leu	Glu 1210	Ile Pro Asp Val	Gly Asn Leu Ser 1215
Gln Val 1220	Val Val Met Lys	Ser 1225	Lys Asn Asp Gln	Gly Ile Thr Asn 1230
Lys Cys 1235	Lys Met Asn Leu	Gln 1240	Asp Asn Asn Gly	Asn Asp Ile Gly 1245
Phe Ile 1250	Gly Phe His Gln	Phe 1255	Asn Asn Ile Ala	Lys Leu Val Ala 1260
Ser Asn 1265	Trp Tyr Asn Arg	Gln 1270	Ile Glu Arg Ser	Ser Arg Thr Leu 1275
Gly Cys 1280	Ser Trp Glu Phe	Ile 1285	Pro Val Asp Asp	Gly Trp Gly Glu 1290
Arg Pro 1295	Leu			

<210> 18
 <211> 1291
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum

<400> 18

Met Pro Val Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asp Asn

1	5	10	15
Asn Asn Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Phe Ala Arg Gly Thr Gly Arg	20	25	30
Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Ile Pro Glu	35	40	45
Arg Tyr Thr Phe Gly Tyr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Lys Ser Ser Gly	50	55	60
Ile Phe Asn Arg Asp Val Cys Glu Tyr Tyr Asp Pro Asp Tyr Leu Asn	65	70	75
Thr Asn Asp Lys Lys Asn Ile Phe Leu Gln Thr Met Ile Lys Leu Phe	85	90	95
Asn Arg Ile Lys Ser Lys Pro Leu Gly Glu Lys Leu Leu Glu Met Ile	100	105	110
Ile Asn Gly Ile Pro Tyr Leu Gly Asp Arg Arg Val Pro Leu Glu Glu	115	120	125
Phe Asn Thr Asn Ile Ala Ser Val Thr Val Asn Lys Leu Ile Ser Asn	130	135	140
Pro Gly Glu Val Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Ala Asn Leu Ile Ile	145	150	155
Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Glu Asn Glu Thr Ile Asp Ile Gly	165	170	175
Ile Gln Asn His Phe Ala Ser Arg Glu Gly Phe Gly Gly Ile Met Gln	180	185	190
Met Lys Phe Cys Pro Glu Tyr Val Ser Val Phe Asn Asn Val Gln Glu	195	200	205
Asn Lys Gly Ala Ser Ile Phe Asn Arg Arg Gly Tyr Phe Ser Asp Pro	210	215	220
Ala Leu Ile Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr	225	230	235
Gly Ile Lys Val Asp Asp Leu Pro Ile Val Pro Asn Glu Lys Lys Phe	245	250	255

Phe Met Gln Ser Thr Asp Ala Ile Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe
260 265 270

Gly Gly Gln Asp Pro Ser Ile Ile Thr Pro Ser Thr Asp Lys Ser Ile
275 280 285

Tyr Asp Lys Val Leu Gln Asn Phe Arg Gly Ile Val Asp Arg Leu Asn
290 295 300

Lys Val Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ile Tyr
305 310 315 320

Lys Asn Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Asp Ser Glu Gly
325 330 335

Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu
340 345 350

Met Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys
355 360 365

Thr Arg Ala Ser Tyr Phe Ser Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys
370 375 380

Asn Leu Leu Asp Asn Glu Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Gly Phe Asn Ile
385 390 395 400

Ser Asp Lys Asp Met Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile
405 410 415

Asn Lys Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr
420 425 430

Lys Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys Ile Asp
435 440 445

Val Asp Asn Glu Asp Leu Phe Phe Ile Ala Asp Lys Asn Ser Phe Ser
450 455 460

Asp Asp Leu Ser Lys Asn Glu Arg Ile Glu Tyr Asn Thr Gln Ser Asn
465 470 475 480

Tyr Ile Glu Asn Asp Phe Pro Ile Asn Glu Leu Ile Leu Asp Thr Asp
485 490 495

Leu Ile Ser Lys Ile Glu Leu Pro Ser Glu Asn Thr Glu Ser Leu Thr
500 505 510

Asp	Phe	Asn	Val	Asp	Val	Pro	Val	Tyr	Glu	Lys	Gln	Pro	Ala	Ile	Lys
		515					520					525			
Lys	Ile	Phe	Thr	Asp	Glu	Asn	Thr	Ile	Phe	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Gln
	530					535					540				
Thr	Phe	Pro	Leu	Asp	Ile	Arg	Asp	Ile	Ser	Leu	Thr	Ser	Ser	Phe	Asp
545					550					555					560
Asp	Ala	Leu	Leu	Phe	Ser	Asn	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Phe	Ser	Met	Asp
				565					570					575	
Tyr	Ile	Lys	Thr	Ala	Asn	Lys	Val	Val	Glu	Ala	Gly	Leu	Phe	Ala	Gly
			580					585					590		
Trp	Val	Lys	Gln	Ile	Val	Asn	Asp	Phe	Val	Ile	Glu	Ala	Asn	Lys	Ser
		595					600						605		
Asn	Thr	Met	Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Ser	Leu	Ile	Val	Pro	Tyr	Ile
	610					615					620				
Gly	Leu	Ala	Leu	Asn	Val	Gly	Asn	Glu	Thr	Ala	Lys	Gly	Asn	Phe	Glu
625					630					635					640
Asn	Ala	Phe	Glu	Ile	Ala	Gly	Ala	Ser	Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Ile	Pro
				645					650					655	
Glu	Leu	Leu	Ile	Pro	Val	Val	Gly	Ala	Phe	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile
			660					665						670	
Asp	Asn	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile	Lys	Thr	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu	Thr	Lys
		675					680					685			
Arg	Asn	Glu	Lys	Trp	Ser	Asp	Met	Tyr	Gly	Leu	Ile	Val	Ala	Gln	Trp
	690					695					700				
Leu	Ser	Thr	Val	Asn	Thr	Gln	Phe	Tyr	Thr	Ile	Lys	Glu	Gly	Met	Tyr
705					710					715					720
Lys	Ala	Leu	Asn	Tyr	Gln	Ala	Gln	Ala	Leu	Glu	Glu	Ile	Ile	Lys	Tyr
				725					730					735	
Arg	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Ser	Glu	Lys	Glu	Lys	Ser	Asn	Ile	Asn	Ile	Asp
			740					745					750		
Phe	Asn	Asp	Ile	Asn	Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Gly	Ile	Asn	Gln	Ala	Ile
		755					760					765			

Asp Asn Ile Asn Asn Phe Ile Asn Gly Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met
770 775 780

Lys Lys Met Ile Pro Leu Ala Val Glu Lys Leu Leu Asp Phe Asp Asn
785 790 795 800

Thr Leu Lys Lys Asn Leu Leu Asn Tyr Ile Asp Glu Asn Lys Leu Tyr
805 810 815

Leu Ile Gly Ser Ala Glu Tyr Glu Lys Ser Lys Val Asn Lys Tyr Leu
820 825 830

Lys Thr Ile Met Pro Phe Asp Leu Ser Ile Tyr Thr Asn Asp Thr Ile
835 840 845

Leu Ile Glu Met Phe Asn Lys Tyr Asn Ser Glu Ile Leu Asn Asn Ile
850 855 860

Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Lys Asp Asn Asn Leu Ile Asp Leu Ser Gly
865 870 875 880

Tyr Gly Ala Lys Val Glu Val Tyr Asp Gly Val Glu Leu Asn Asp Lys
885 890 895

Asn Gln Phe Lys Leu Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys Ile Arg Val Thr
900 905 910

Gln Asn Gln Asn Ile Ile Phe Asn Ser Val Phe Leu Asp Phe Ser Val
915 920 925

Ser Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Lys Asn Asp Gly Ile Gln Asn
930 935 940

Tyr Ile His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Lys Asn Asn Ser
945 950 955 960

Gly Trp Lys Ile Ser Ile Arg Gly Asn Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile
965 970 975

Asp Ile Asn Gly Lys Thr Lys Ser Val Phe Phe Glu Tyr Asn Ile Arg
980 985 990

Glu Asp Ile Ser Glu Tyr Ile Asn Arg Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr
995 1000 1005

Asn Asn Leu Asn Asn Ala Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Lys Leu Glu

1010	1015	1020
Ser Asn Thr Asp Ile Lys Asp 1025	Ile Arg Glu Val 1030	Ile Ala Asn Gly 1035
Glu Ile Ile Phe Lys Leu Asp 1040	Gly Asp Ile Asp 1045	Arg Thr Gln Phe 1050
Ile Trp Met Lys Tyr Phe Ser 1055	Ile Phe Asn Thr 1060	Glu Leu Ser Gln 1065
Ser Asn Ile Glu Glu Arg Tyr 1070	Lys Ile Gln Ser 1075	Tyr Ser Glu Tyr 1080
Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn 1085	Pro Leu Met Tyr 1090	Asn Lys Glu Tyr 1095
Tyr Met Phe Asn Ala Gly Asn 1100	Lys Asn Ser Tyr 1105	Ile Lys Leu Lys 1110
Lys Asp Ser Pro Val Gly Glu 1115	Ile Leu Thr Arg 1120	Ser Lys Tyr Asn 1125
Gln Asn Ser Lys Tyr Ile Asn 1130	Tyr Arg Asp Leu 1135	Tyr Ile Gly Glu 1140
Lys Phe Ile Ile Arg Arg Lys 1145	Ser Asn Ser Gln 1150	Ser Ile Asn Asp 1155
Asp Ile Val Arg Lys Glu Asp 1160	Tyr Ile Tyr Leu 1165	Asp Phe Phe Asn 1170
Leu Asn Gln Glu Trp Arg Val 1175	Tyr Thr Tyr Lys 1180	Tyr Phe Lys Lys 1185
Glu Glu Glu Lys Leu Phe Leu 1190	Ala Pro Ile Ser 1195	Asp Ser Asp Glu 1200
Phe Tyr Asn Thr Ile Gln Ile 1205	Lys Glu Tyr Asp 1210	Glu Gln Pro Thr 1215
Tyr Ser Cys Gln Leu Leu Phe 1220	Lys Lys Asp Glu 1225	Glu Ser Thr Asp 1230
Glu Ile Gly Leu Ile Gly Ile 1235	His Arg Phe Tyr 1240	Glu Ser Gly Ile 1245

Val Phe Glu Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr
1250 1255 1260

Leu Lys Glu Val Lys Arg Lys Pro Tyr Asn Leu Lys Leu Gly Cys
1265 1270 1275

Asn Trp Gln Phe Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Thr Glu
1280 1285 1290

<210> 19
<211> 1280
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<400> 19

Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val Asp Asn
1 5 10 15

Lys Asn Ile Leu Tyr Leu Asp Thr His Leu Asn Thr Leu Ala Asn Glu
20 25 30

Pro Glu Lys Ala Phe Arg Ile Ile Gly Asn Ile Trp Val Ile Pro Asp
35 40 45

Arg Phe Ser Arg Asp Ser Asn Pro Asn Leu Asn Lys Pro Pro Arg Val
50 55 60

Thr Ser Pro Lys Ser Gly Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
65 70 75 80

Ser Glu Lys Asp Thr Phe Leu Lys Glu Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg
85 90 95

Ile Asn Ser Arg Glu Ile Gly Glu Glu Leu Ile Tyr Arg Leu Ala Thr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Pro Gly Asn Asn Asn Thr Pro Ile Asn Thr Phe Asp
115 120 125

Phe Asp Val Asp Phe Asn Ser Val Asp Val Lys Thr Arg Gln Gly Asn
130 135 140

Asn Trp Val Lys Thr Gly Ser Ile Asn Pro Ser Val Ile Ile Thr Gly
145 150 155 160

Pro Arg Glu Asn Ile Ile Asp Pro Glu Thr Ser Thr Phe Lys Leu Thr
165 170 175

Asn	Asn	Thr	Phe	Ala	Ala	Gln	Glu	Gly	Phe	Gly	Ala	Leu	Ser	Ile	Ile
			180					185					190		
Ser	Ile	Ser	Pro	Arg	Phe	Met	Leu	Thr	Tyr	Ser	Asn	Ala	Thr	Asn	Asn
		195					200					205			
Val	Gly	Glu	Gly	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Glu	Phe	Cys	Met	Asp	Pro	Ile
	210					215					220				
Leu	Ile	Leu	Met	His	Glu	Leu	Asn	His	Ala	Met	His	Asn	Leu	Tyr	Gly
225					230					235					240
Ile	Ala	Ile	Pro	Asn	Asp	Gln	Arg	Ile	Ser	Ser	Val	Thr	Ser	Asn	Ile
				245					250					255	
Phe	Tyr	Ser	Gln	Tyr	Lys	Val	Lys	Leu	Glu	Tyr	Ala	Glu	Ile	Tyr	Ala
			260					265					270		
Phe	Gly	Gly	Pro	Thr	Ile	Asp	Leu	Ile	Pro	Lys	Ser	Ala	Arg	Lys	Tyr
		275					280					285			
Phe	Glu	Glu	Lys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Ile	Ala	Lys	Arg	Leu
	290					295					300				
Asn	Ser	Ile	Thr	Thr	Ala	Asn	Pro	Ser	Ser	Phe	Asn	Lys	Tyr	Ile	Gly
305					310					315					320
Glu	Tyr	Lys	Gln	Lys	Leu	Ile	Arg	Lys	Tyr	Arg	Phe	Val	Val	Glu	Ser
				325					330					335	
Ser	Gly	Glu	Val	Ala	Val	Asp	Arg	Asn	Lys	Phe	Ala	Glu	Leu	Tyr	Lys
			340					345					350		
Glu	Leu	Thr	Gln	Ile	Phe	Thr	Glu	Phe	Asn	Tyr	Ala	Lys	Ile	Tyr	Asn
		355					360					365			
Val	Gln	Asn	Arg	Lys	Ile	Tyr	Leu	Ser	Asn	Val	Tyr	Thr	Pro	Val	Thr
		370				375					380				
Ala	Asn	Ile	Leu	Asp	Asp	Asn	Val	Tyr	Asp	Ile	Gln	Asn	Gly	Phe	Asn
385					390					395					400
Ile	Pro	Lys	Ser	Asn	Leu	Asn	Val	Leu	Phe	Met	Gly	Gln	Asn	Leu	Ser
				405					410					415	
Arg	Asn	Pro	Ala	Leu	Arg	Lys	Val	Asn	Pro	Glu	Asn	Met	Leu	Tyr	Leu
			420					425					430		

Phe Thr Lys Phe Cys His Lys Ala Ile Asp Gly Arg Ser Leu Tyr Asn
 435 440 445

Lys Thr Leu Asp Cys Arg Glu Leu Leu Val Lys Asn Thr Asp Leu Pro
 450 455 460

Phe Ile Gly Asp Ile Ser Asp Ile Lys Thr Asp Ile Phe Leu Ser Lys
 465 470 475 480

Asp Ile Asn Glu Glu Thr Glu Val Ile Asp Tyr Pro Asp Asn Val Ser
 485 490 495

Val Asp Gln Val Ile Leu Ser Lys Asn Thr Ser Glu His Gly Gln Leu
 500 505 510

Asp Leu Leu Tyr Pro Ile Ile Glu Gly Glu Ser Gln Val Leu Pro Gly
 515 520 525

Glu Asn Gln Val Phe Tyr Asp Asn Arg Thr Gln Asn Val Asp Tyr Leu
 530 535 540

Asn Ser Tyr Tyr Tyr Leu Glu Ser Gln Lys Leu Ser Asp Asn Val Glu
 545 550 555 560

Asp Phe Thr Phe Thr Thr Ser Ile Glu Glu Ala Leu Asp Asn Ser Gly
 565 570 575

Lys Val Tyr Thr Tyr Phe Pro Lys Leu Ala Asp Lys Val Asn Thr Gly
 580 585 590

Val Gln Gly Gly Leu Phe Leu Met Trp Ala Asn Asp Val Val Glu Asp
 595 600 605

Phe Thr Thr Asn Ile Leu Arg Lys Asp Thr Leu Asp Lys Ile Ser Asp
 610 615 620

Val Ser Ala Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Ser Asn
 625 630 635 640

Ser Val Arg Arg Gly Asn Phe Thr Glu Ala Phe Ala Val Thr Gly Val
 645 650 655

Thr Ile Leu Leu Glu Ala Phe Gln Glu Phe Thr Ile Pro Ala Leu Gly
 660 665 670

Ala Phe Val Ile Tyr Ser Lys Val Gln Glu Arg Asn Glu Ile Ile Lys
 675 680 685

Thr	Ile	Asp	Asn	Cys	Leu	Glu	Gln	Arg	Ile	Lys	Arg	Trp	Lys	Asp	Ser
690						695					700				
Tyr	Glu	Trp	Met	Ile	Gly	Thr	Trp	Leu	Ser	Arg	Ile	Thr	Thr	Gln	Phe
705					710					715					720
Asn	Asn	Ile	Ser	Tyr	Gln	Met	Tyr	Asp	Ser	Leu	Asn	Tyr	Gln	Ala	Asp
				725					730					735	
Ala	Ile	Lys	Asp	Lys	Ile	Asp	Leu	Glu	Tyr	Lys	Lys	Tyr	Ser	Gly	Ser
			740					745					750		
Asp	Lys	Glu	Asn	Ile	Lys	Ser	Gln	Val	Glu	Asn	Leu	Lys	Asn	Ser	Leu
		755					760					765			
Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Ile	Asn	Lys	Phe	Ile	Arg
	770					775					780				
Glu	Cys	Ser	Val	Thr	Tyr	Leu	Phe	Lys	Asn	Met	Leu	Pro	Lys	Val	Ile
785					790					795					800
Asp	Glu	Leu	Asn	Lys	Phe	Asp	Leu	Lys	Thr	Lys	Thr	Glu	Leu	Ile	Asn
			805						810					815	
Leu	Ile	Asp	Ser	His	Asn	Ile	Ile	Leu	Val	Gly	Glu	Val	Asp	Arg	Leu
			820					825					830		
Lys	Ala	Lys	Val	Asn	Glu	Ser	Phe	Glu	Asn	Thr	Ile	Pro	Phe	Asn	Ile
		835					840					845			
Phe	Ser	Tyr	Thr	Asn	Asn	Ser	Leu	Leu	Lys	Asp	Ile	Ile	Asn	Glu	Tyr
	850					855					860				
Phe	Asn	Ser	Ile	Asn	Asp	Ser	Lys	Ile	Leu	Ser	Leu	Gln	Asn	Lys	Lys
865					870					875					880
Asn	Ala	Leu	Val	Asp	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asn	Ala	Glu	Val	Arg	Leu	Glu
				885					890					895	
Gly	Asp	Val	Gln	Val	Asn	Thr	Ile	Tyr	Thr	Asn	Asp	Phe	Lys	Leu	Ser
			900					905					910		
Ser	Ser	Gly	Asp	Lys	Ile	Ile	Val	Asn	Leu	Asn	Asn	Asn	Ile	Leu	Tyr
		915					920					925			
Ser	Ala	Ile	Tyr	Glu	Asn	Ser	Ser	Val	Ser	Phe	Trp	Ile	Lys	Ile	Ser

						930							935							940			
Lys 945	Asp	Leu	Thr	Asn	Ser 950	His	Asn	Glu	Tyr	Thr 955	Ile	Ile	Asn	Ser	Ile 960								
Lys	Gln	Asn	Ser	Gly 965	Trp	Lys	Leu	Cys	Ile 970	Arg	Asn	Gly	Asn	Ile	Glu 975								
Trp	Ile	Leu	Gln	Asp 980	Ile	Asn	Arg	Lys 985	Tyr	Lys	Ser	Leu	Ile	Phe	Asp								
Tyr	Ser	Glu 995	Ser	Leu	Ser	His	Thr 1000	Gly	Tyr	Thr	Asn	Lys 1005	Trp	Phe	Phe								
Val	Thr 1010	Ile	Thr	Asn	Asn	Ile 1015	Met	Gly	Tyr	Met	Lys 1020	Leu	Tyr	Ile									
Asn	Gly 1025	Glu	Leu	Lys	Gln	Ser 1030	Glu	Arg	Ile	Glu	Asp 1035	Leu	Asn	Glu									
Val	Lys 1040	Leu	Asp	Lys	Thr	Ile 1045	Val	Phe	Gly	Ile	Asp 1050	Glu	Asn	Ile									
Asp	Glu 1055	Asn	Gln	Met	Leu	Trp 1060	Ile	Arg	Asp	Phe	Asn 1065	Ile	Phe	Ser									
Lys	Glu 1070	Leu	Ser	Asn	Glu	Asp 1075	Ile	Asn	Ile	Val	Tyr 1080	Glu	Gly	Gln									
Ile	Leu 1085	Arg	Asn	Val	Ile	Lys 1090	Asp	Tyr	Trp	Gly	Asn 1095	Pro	Leu	Lys									
Phe	Asp 1100	Thr	Glu	Tyr	Tyr	Ile 1105	Ile	Asn	Asp	Asn	Tyr 1110	Ile	Asp	Arg									
Tyr	Ile 1115	Ala	Pro	Lys	Ser	Asn 1120	Ile	Leu	Val	Leu	Val 1125	Gln	Tyr	Pro									
Asp	Arg 1130	Ser	Lys	Leu	Tyr	Thr 1135	Gly	Asn	Pro	Ile	Thr 1140	Ile	Lys	Ser									
Val	Ser 1145	Asp	Lys	Asn	Pro	Tyr 1150	Ser	Arg	Ile	Leu	Asn 1155	Gly	Asp	Asn									
Ile	Met 1160	Phe	His	Met	Leu	Tyr 1165	Asn	Ser	Gly	Lys	Tyr 1170	Met	Ile	Ile									

Arg	Asp	Thr	Asp	Thr	Ile	Tyr	Ala	Ile	Glu	Gly	Arg	Glu	Cys	Ser	
1175						1180					1185				
Lys	Asn	Cys	Val	Tyr	Ala	Leu	Lys	Leu	Gln	Ser	Asn	Leu	Gly	Asn	
1190						1195					1200				
Tyr	Gly	Ile	Gly	Ile	Phe	Ser	Ile	Lys	Asn	Ile	Val	Ser	Gln	Asn	
1205						1210					1215				
Lys	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ile	Phe	Ser	Ser	Phe	Met	Lys	Asn	Thr	Met	
1220						1225					1230				
Leu	Leu	Ala	Asp	Ile	Tyr	Lys	Pro	Trp	Arg	Phe	Ser	Phe	Glu	Asn	
1235						1240					1245				
Ala	Tyr	Thr	Pro	Val	Ala	Val	Thr	Asn	Tyr	Glu	Thr	Lys	Leu	Leu	
1250						1255					1260				
Ser	Thr	Ser	Ser	Phe	Trp	Lys	Phe	Ile	Ser	Arg	Asp	Pro	Gly	Trp	
1265						1270					1275				
Val	Glu														
1280															
<210>	20														
<211>	1285														
<212>	PRT														
<213>	Clostridium botulinum														
<400>	20														
Met	Thr	Trp	Pro	Val	Lys	Asp	Phe	Asn	Tyr	Ser	Asp	Pro	Val	Asn	Asp
1				5					10					15	
Asn	Asp	Ile	Leu	Tyr	Leu	Arg	Ile	Pro	Gln	Asn	Lys	Leu	Ile	Thr	Thr
			20					25					30		
Pro	Val	Lys	Ala	Phe	Met	Ile	Thr	Gln	Asn	Ile	Trp	Val	Ile	Pro	Glu
		35					40					45			
Arg	Phe	Ser	Ser	Asp	Thr	Asn	Pro	Ser	Leu	Ser	Lys	Pro	Pro	Arg	Pro
	50					55					60				
Thr	Ser	Lys	Tyr	Gln	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Ser	Tyr	Leu	Ser	Thr	Asp
65					70					75					80
Glu	Gln	Lys	Asp	Thr	Phe	Leu	Lys	Gly	Ile	Ile	Lys	Leu	Phe	Lys	Arg
					85				90					95	

Ile Asn Glu Arg Asp Ile Gly Lys Lys Leu Ile Asn Tyr Leu Val Val
 100 105 110
 Gly Ser Pro Phe Met Gly Asp Ser Ser Thr Pro Glu Asp Thr Phe Asp
 115 120 125
 Phe Thr Arg His Thr Thr Asn Ile Ala Val Glu Lys Phe Glu Asn Gly
 130 135 140
 Ser Trp Lys Val Thr Asn Ile Ile Thr Pro Ser Val Leu Ile Phe Gly
 145 150 155 160
 Pro Leu Pro Asn Ile Leu Asp Tyr Thr Ala Ser Leu Thr Leu Gln Gly
 165 170 175
 Gln Gln Ser Asn Pro Ser Phe Glu Gly Phe Gly Thr Leu Ser Ile Leu
 180 185 190
 Lys Val Ala Pro Glu Phe Leu Leu Thr Phe Ser Asp Val Thr Ser Asn
 195 200 205
 Gln Ser Ser Ala Val Leu Gly Lys Ser Ile Phe Cys Met Asp Pro Val
 210 215 220
 Ile Ala Leu Met His Glu Leu Thr His Ser Leu His Gln Leu Tyr Gly
 225 230 235 240
 Ile Asn Ile Pro Ser Asp Lys Arg Ile Arg Pro Gln Val Ser Glu Gly
 245 250 255
 Phe Phe Ser Gln Asp Gly Pro Asn Val Gln Phe Glu Glu Leu Tyr Thr
 260 265 270
 Phe Gly Gly Ser Asp Val Glu Ile Ile Pro Gln Ile Glu Arg Leu Gln
 275 280 285
 Leu Arg Glu Lys Ala Leu Gly His Tyr Lys Asp Ile Ala Lys Arg Leu
 290 295 300
 Asn Asn Ile Asn Lys Thr Ile Pro Ser Ser Trp Ser Ser Asn Ile Asp
 305 310 315 320
 Lys Tyr Lys Lys Ile Phe Ser Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Lys Asp Asn
 325 330 335
 Thr Gly Asn Phe Val Val Asn Ile Asp Lys Phe Asn Ser Leu Tyr Ser
 340 345 350

Asp Leu Thr Asn Val Met Ser Glu Val Val Tyr Ser Ser Gln Tyr Asn
 355 360 365

Val Lys Asn Arg Thr His Tyr Phe Ser Lys His Tyr Leu Pro Val Phe
 370 375 380

Ala Asn Ile Leu Asp Asp Asn Ile Tyr Thr Ile Ile Asn Gly Phe Asn
 385 390 395 400

Leu Thr Thr Lys Gly Phe Asn Ile Glu Asn Ser Gly Gln Asn Ile Glu
 405 410 415

Arg Asn Pro Ala Leu Gln Lys Leu Ser Ser Glu Ser Val Val Asp Leu
 420 425 430

Phe Thr Lys Val Cys Leu Arg Leu Thr Arg Asn Ser Arg Asp Asp Ser
 435 440 445

Thr Cys Ile Gln Val Lys Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Val Ala Asp Lys
 450 455 460

Asp Ser Ile Ser Gln Glu Ile Phe Glu Ser Gln Ile Ile Thr Asp Glu
 465 470 475 480

Thr Asn Val Glu Asn Tyr Ser Asp Asn Phe Ser Leu Asp Glu Ser Ile
 485 490 495

Leu Asp Ala Lys Val Pro Thr Asn Pro Glu Ala Val Asp Pro Leu Leu
 500 505 510

Pro Asn Val Asn Met Glu Pro Leu Asn Val Pro Gly Glu Glu Glu Val
 515 520 525

Phe Tyr Asp Asp Ile Thr Lys Asp Val Asp Tyr Leu Asn Ser Tyr Tyr
 530 535 540

Tyr Leu Glu Ala Gln Lys Leu Ser Asn Asn Val Glu Asn Ile Thr Leu
 545 550 555 560

Thr Thr Ser Val Glu Glu Ala Leu Gly Tyr Ser Asn Lys Ile Tyr Thr
 565 570 575

Phe Leu Pro Ser Leu Ala Glu Lys Val Asn Lys Gly Val Gln Ala Gly
 580 585 590

Leu Phe Leu Asn Trp Ala Asn Glu Val Val Glu Asp Phe Thr Thr Asn
 595 600 605

RU 2 545 783 C9 (W1 C2)

Ile	Met	Lys	Lys	Asp	Thr	Leu	Asp	Lys	Ile	Ser	Asp	Val	Ser	Ala	Ile
610						615					620				
Ile	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala	Leu	Asn	Ile	Gly	Asn	Ser	Ala	Leu	Arg
625					630					635					640
Gly	Asn	Phe	Lys	Gln	Ala	Phe	Ala	Thr	Ala	Gly	Val	Ala	Phe	Leu	Leu
				645					650					655	
Glu	Gly	Phe	Pro	Glu	Phe	Thr	Ile	Pro	Ala	Leu	Gly	Val	Phe	Thr	Phe
			660					665					670		
Tyr	Ser	Ser	Ile	Gln	Glu	Arg	Glu	Lys	Ile	Ile	Lys	Thr	Ile	Glu	Asn
		675					680					685			
Cys	Leu	Glu	Gln	Arg	Val	Lys	Arg	Trp	Lys	Asp	Ser	Tyr	Gln	Trp	Met
	690					695					700				
Val	Ser	Asn	Trp	Leu	Ser	Arg	Ile	Thr	Thr	Arg	Phe	Asn	His	Ile	Ser
705					710					715					720
Tyr	Gln	Met	Tyr	Asp	Ser	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ala	Asp	Ala	Ile	Lys	Ala
				725					730					735	
Lys	Ile	Asp	Leu	Glu	Tyr	Lys	Lys	Tyr	Ser	Gly	Ser	Asp	Lys	Glu	Asn
			740					745					750		
Ile	Lys	Ser	Gln	Val	Glu	Asn	Leu	Lys	Asn	Ser	Leu	Asp	Val	Lys	Ile
		755					760					765			
Ser	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Ile	Asn	Lys	Phe	Ile	Arg	Glu	Cys	Ser	Val
	770					775					780				
Thr	Tyr	Leu	Phe	Lys	Asn	Met	Leu	Pro	Lys	Val	Ile	Asp	Glu	Leu	Asn
785					790					795					800
Lys	Phe	Asp	Leu	Lys	Thr	Lys	Thr	Glu	Leu	Ile	Asn	Leu	Ile	Asp	Ser
				805					810					815	
His	Asn	Ile	Ile	Leu	Val	Gly	Glu	Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Ala	Lys	Val
			820					825					830		
Asn	Glu	Ser	Phe	Glu	Asn	Thr	Ile	Pro	Phe	Asn	Ile	Phe	Ser	Tyr	Thr
		835					840					845			
Asn	Asn	Ser	Leu	Leu	Lys	Asp	Met	Ile	Asn	Glu	Tyr	Phe	Asn	Ser	Ile

850	855	860
Asn Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Lys Lys Asn Thr Leu Met		
865	870	875 880
Asp Thr Ser Gly Tyr Asn Ala Glu Val Arg Val Glu Gly Asn Val Gln		
	885	890 895
Leu Asn Pro Ile Phe Pro Phe Asp Phe Lys Leu Gly Ser Ser Gly Asp		
	900	905 910
Asp Arg Gly Lys Val Ile Val Thr Gln Asn Glu Asn Ile Val Tyr Asn		
	915	920 925
Ala Met Tyr Glu Ser Phe Ser Ile Ser Phe Trp Ile Arg Ile Asn Lys		
	930	935 940
Trp Val Ser Asn Leu Pro Gly Tyr Thr Ile Ile Asp Ser Val Lys Asn		
	945	950 955 960
Asn Ser Gly Trp Ser Ile Gly Ile Ile Ser Asn Phe Leu Val Phe Thr		
	965	970 975
Leu Lys Gln Asn Glu Asn Ser Glu Gln Asp Ile Asn Phe Ser Tyr Asp		
	980	985 990
Ile Ser Lys Asn Ala Ala Gly Tyr Asn Lys Trp Phe Phe Val Thr Ile		
	995	1000 1005
Thr Thr Asn Met Met Gly Asn Met Met Ile Tyr Ile Asn Gly Lys		
	1010	1015 1020
Leu Ile Asp Thr Ile Lys Val Lys Glu Leu Thr Gly Ile Asn Phe		
	1025	1030 1035
Ser Lys Thr Ile Thr Phe Gln Met Asn Lys Ile Pro Asn Thr Gly		
	1040	1045 1050
Leu Ile Thr Ser Asp Ser Asp Asn Ile Asn Met Trp Ile Arg Asp		
	1055	1060 1065
Phe Tyr Ile Phe Ala Lys Glu Leu Asp Asp Lys Asp Ile Asn Ile		
	1070	1075 1080
Leu Phe Asn Ser Leu Gln Tyr Thr Asn Val Val Lys Asp Tyr Trp		
	1085	1090 1095

Gly	Asn	Asp	Leu	Arg	Tyr	Asp	Lys	Glu	Tyr	Tyr	Met	Ile	Asn	Val
1100						1105					1110			
Asn	Tyr	Met	Asn	Arg	Tyr	Met	Ser	Lys	Lys	Gly	Asn	Gly	Ile	Val
1115						1120					1125			
Phe	Asn	Thr	Arg	Lys	Asn	Asn	Asn	Asp	Phe	Asn	Glu	Gly	Tyr	Lys
1130						1135					1140			
Ile	Ile	Ile	Lys	Arg	Ile	Arg	Gly	Asn	Thr	Asn	Asp	Thr	Arg	Val
1145						1150					1155			
Arg	Gly	Glu	Asn	Val	Leu	Tyr	Phe	Asn	Thr	Thr	Ile	Asp	Asn	Lys
1160						1165					1170			
Gln	Tyr	Ser	Leu	Gly	Met	Tyr	Lys	Pro	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Thr
1175						1180					1185			
Asp	Leu	Val	Pro	Leu	Gly	Ala	Leu	Asp	Gln	Pro	Met	Asp	Glu	Ile
1190						1195					1200			
Arg	Lys	Tyr	Gly	Ser	Phe	Ile	Ile	Gln	Pro	Cys	Asn	Thr	Phe	Asp
1205						1210					1215			
Tyr	Tyr	Ala	Ser	Gln	Leu	Phe	Leu	Ser	Ser	Asn	Ala	Thr	Thr	Asn
1220						1225					1230			
Arg	Leu	Gly	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ser	Tyr	Ser	Phe	Lys	Leu	Gly
1235						1240					1245			
Asp	Asp	Tyr	Trp	Phe	Asn	His	Glu	Tyr	Leu	Ile	Pro	Val	Ile	Lys
1250						1255					1260			
Ile	Glu	His	Tyr	Ala	Ser	Leu	Leu	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	His	Trp
1265						1270					1275			
Val	Phe	Val	Pro	Ala	Ser	Glu								
1280						1285								

<210> 21
 <211> 1251
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum

<400> 21

Met	Pro	Lys	Ile	Asn	Ser	Phe	Asn	Tyr	Asn	Asp	Pro	Val	Asn	Asp	Arg
1					5					10				15	

Thr	Ile	Leu	Tyr	Ile	Lys	Pro	Gly	Gly	Cys	Gln	Glu	Phe	Tyr	Lys	Ser	20	25	30
Phe	Asn	Ile	Met	Lys	Asn	Ile	Trp	Ile	Ile	Pro	Glu	Arg	Asn	Val	Ile	35	40	45
Gly	Thr	Thr	Pro	Gln	Asp	Phe	His	Pro	Pro	Thr	Ser	Leu	Lys	Asn	Gly	50	55	60
Asp	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Asn	Tyr	Leu	Gln	Ser	Asp	Glu	Glu	Lys	65	70	75
Asp	Arg	Phe	Leu	Lys	Ile	Val	Thr	Lys	Ile	Phe	Asn	Arg	Ile	Asn	Asn	85	90	95
Asn	Leu	Ser	Gly	Gly	Ile	Leu	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Lys	Ala	Asn	Pro	100	105	110
Tyr	Leu	Gly	Asn	Asp	Asn	Thr	Pro	Asp	Asn	Gln	Phe	His	Ile	Gly	Asp	115	120	125
Ala	Ser	Ala	Val	Glu	Ile	Lys	Phe	Ser	Asn	Gly	Ser	Gln	Asp	Ile	Leu	130	135	140
Leu	Pro	Asn	Val	Ile	Ile	Met	Gly	Ala	Glu	Pro	Asp	Leu	Phe	Glu	Thr	145	150	155
Asn	Ser	Ser	Asn	Ile	Ser	Leu	Arg	Asn	Asn	Tyr	Met	Pro	Ser	Asn	His	165	170	175
Arg	Phe	Gly	Ser	Ile	Ala	Ile	Val	Thr	Phe	Ser	Pro	Glu	Tyr	Ser	Phe	180	185	190
Arg	Phe	Asn	Asp	Asn	Cys	Met	Asn	Glu	Phe	Ile	Gln	Asp	Pro	Ala	Leu	195	200	205
Thr	Leu	Met	His	Glu	Leu	Ile	His	Ser	Leu	His	Gly	Leu	Tyr	Gly	Ala	210	215	220
Lys	Gly	Ile	Thr	Thr	Lys	Tyr	Thr	Ile	Thr	Gln	Lys	Gln	Asn	Pro	Leu	225	230	235
Ile	Thr	Asn	Ile	Arg	Gly	Thr	Asn	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Thr	Phe	Gly	245	250	255
Gly	Thr	Asp	Leu	Asn	Ile	Ile	Thr	Ser	Ala	Gln	Ser	Asn	Asp	Ile	Tyr	260	265	270

Thr Asn Leu Leu Ala Asp Tyr Lys Lys Ile Ala Ser Lys Leu Ser Lys
 275 280 285
 Val Gln Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu
 290 295 300
 Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn
 305 310 315 320
 Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu
 325 330 335
 Phe Asp Leu Arg Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile
 340 345 350
 Gly Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile
 355 360 365
 Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe
 370 375 380
 Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr
 385 390 395 400
 Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val
 405 410 415
 Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys Ile Glu Ile Asn Asn Gly
 420 425 430
 Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Asn Ser Tyr Asn Asp Asp Asn Ile
 435 440 445
 Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Val Thr Ser Asn Asn Asn Tyr
 450 455 460
 Glu Asn Asp Leu Asp Gln Val Ile Leu Asn Phe Asn Ser Glu Ser Ala
 465 470 475 480
 Pro Gly Leu Ser Asp Glu Lys Leu Asn Leu Thr Ile Gln Asn Asp Ala
 485 490 495
 Tyr Ile Pro Lys Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Asp Ile Glu Gln His
 500 505 510
 Asp Val Asn Glu Leu Asn Val Phe Phe Tyr Leu Asp Ala Gln Lys Val
 515 520 525

Pro	Glu	Gly	Glu	Asn	Asn	Val	Asn	Leu	Thr	Ser	Ser	Ile	Asp	Thr	Ala
530						535					540				
Leu	Leu	Glu	Gln	Pro	Lys	Ile	Tyr	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser	Glu	Phe	Ile
545					550					555					560
Asn	Asn	Val	Asn	Lys	Pro	Val	Gln	Ala	Ala	Leu	Phe	Val	Ser	Trp	Ile
				565					570					575	
Gln	Gln	Val	Leu	Val	Asp	Phe	Thr	Thr	Glu	Ala	Asn	Gln	Lys	Ser	Thr
			580					585					590		
Val	Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Ser	Ile	Val	Val	Pro	Tyr	Ile	Gly	Leu
		595					600					605			
Ala	Leu	Asn	Ile	Gly	Asn	Glu	Ala	Gln	Lys	Gly	Asn	Phe	Lys	Asp	Ala
	610					615					620				
Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Glu	Pro	Glu	Leu
625					630					635					640
Leu	Ile	Pro	Thr	Ile	Leu	Val	Phe	Thr	Ile	Lys	Ser	Phe	Leu	Gly	Ser
				645					650					655	
Ser	Asp	Asn	Lys	Asn	Lys	Val	Ile	Lys	Ala	Ile	Asn	Asn	Ala	Leu	Lys
			660					665					670		
Glu	Arg	Asp	Glu	Lys	Trp	Lys	Glu	Val	Tyr	Ser	Phe	Ile	Val	Ser	Asn
		675					680					685			
Trp	Met	Thr	Lys	Ile	Asn	Thr	Gln	Phe	Asn	Lys	Arg	Lys	Glu	Gln	Met
	690					695					700				
Tyr	Gln	Ala	Leu	Gln	Asn	Gln	Val	Asn	Ala	Ile	Lys	Thr	Ile	Ile	Glu
705					710					715					720
Ser	Lys	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Glu	Leu	Thr	Asn
				725					730					735	
Lys	Tyr	Asp	Ile	Lys	Gln	Ile	Glu	Asn	Glu	Leu	Asn	Gln	Lys	Val	Ser
			740					745					750		
Ile	Ala	Met	Asn	Asn	Ile	Asp	Arg	Phe	Leu	Thr	Glu	Ser	Ser	Ile	Ser
		755					760					765			
Tyr	Leu	Met	Lys	Ile	Ile	Asn	Glu	Val	Lys	Ile	Asn	Lys	Leu	Arg	Glu

770	775	780
Tyr Asp Glu Asn Val Lys Thr Tyr Leu Leu Asn Tyr Ile Ile Gln His 785 790 795 800		
Gly Ser Ile Leu Gly Glu Ser Gln Gln Glu Leu Asn Ser Met Val Thr 805 810 815		
Asp Thr Leu Asn Asn Ser Ile Pro Phe Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Asp 820 825 830		
Asp Lys Ile Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Lys Phe Phe Lys Arg Ile Lys 835 840 845		
Ser Ser Ser Val Leu Asn Met Arg Tyr Lys Asn Asp Lys Tyr Val Asp 850 855 860		
Thr Ser Gly Tyr Asp Ser Asn Ile Asn Ile Asn Gly Asp Val Tyr Lys 865 870 875 880		
Tyr Pro Thr Asn Lys Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Asp Lys Leu Ser 885 890 895		
Glu Val Asn Ile Ser Gln Asn Asp Tyr Ile Ile Tyr Asp Asn Lys Tyr 900 905 910		
Lys Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Asn Tyr Asp Asn 915 920 925		
Lys Ile Val Asn Val Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Arg 930 935 940		
Asp Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn His Asn Glu Ile Ile 945 950 955 960		
Trp Thr Phe Glu Asp Asn Arg Gly Ile Asn Gln Lys Leu Ala Phe Asn 965 970 975		
Tyr Gly Asn Ala Asn Gly Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe 980 985 990		
Val Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Asn 995 1000 1005		
Gly Asn Leu Ile Asp Gln Lys Ser Ile Leu Asn Leu Gly Asn Ile 1010 1015 1020		

His	Val	Ser	Asp	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys	Ile	Val	Asn	Cys	Ser	Tyr
1025						1030					1035			
Thr	Arg	Tyr	Ile	Gly	Ile	Arg	Tyr	Phe	Asn	Ile	Phe	Asp	Lys	Glu
1040						1045					1050			
Leu	Asp	Glu	Thr	Glu	Ile	Gln	Thr	Leu	Tyr	Ser	Asn	Glu	Pro	Asn
1055						1060					1065			
Thr	Asn	Ile	Leu	Lys	Asp	Phe	Trp	Gly	Asn	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Asp
1070						1075					1080			
Lys	Glu	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Asn	Val	Leu	Lys	Pro	Asn	Asn	Phe	Ile
1085						1090					1095			
Asp	Arg	Arg	Lys	Asp	Ser	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Asn	Ile	Arg	Ser
1100						1105					1110			
Thr	Ile	Leu	Leu	Ala	Asn	Arg	Leu	Tyr	Ser	Gly	Ile	Lys	Val	Lys
1115						1120					1125			
Ile	Gln	Arg	Val	Asn	Asn	Ser	Ser	Thr	Asn	Asp	Asn	Leu	Val	Arg
1130						1135					1140			
Lys	Asn	Asp	Gln	Val	Tyr	Ile	Asn	Phe	Val	Ala	Ser	Lys	Thr	His
1145						1150					1155			
Leu	Phe	Pro	Leu	Tyr	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Thr	Asn	Lys	Glu	Lys
1160						1165					1170			
Thr	Ile	Lys	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn	Arg	Phe	Asn	Gln	Val	Val
1175						1180					1185			
Val	Met	Asn	Ser	Val	Gly	Asn	Cys	Thr	Met	Asn	Phe	Lys	Asn	Asn
1190						1195					1200			
Asn	Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Leu	Leu	Gly	Phe	Lys	Ala	Asp	Thr	Val
1205						1210					1215			
Val	Ala	Ser	Thr	Trp	Tyr	Tyr	Thr	His	Met	Arg	Asp	His	Thr	Asn
1220						1225					1230			
Ser	Asn	Gly	Cys	Phe	Trp	Asn	Phe	Ile	Ser	Glu	Glu	His	Gly	Trp
1235						1240					1245			
Gln	Glu	Lys												
1250														

<210> 22
 <211> 1280
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum

<400> 22

Met Pro Val Val Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp
 1 5 10 15

Glu Thr Ile Leu Tyr Met Gln Lys Pro Tyr Glu Glu Arg Ser Arg Lys
 20 25 30

Tyr Tyr Lys Ala Phe Glu Ile Met Pro Asn Val Trp Ile Met Pro Glu
 35 40 45

Arg Asp Thr Ile Gly Thr Lys Pro Asp Glu Phe Gln Val Pro Asp Ser
 50 55 60

Leu Lys Asn Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Thr Thr
 65 70 75 80

Asp Ala Glu Lys Asp Arg Tyr Leu Lys Thr Met Ile Lys Leu Phe Asn
 85 90 95

Arg Ile Asn Ser Asn Pro Thr Gly Lys Val Leu Leu Glu Glu Val Ser
 100 105 110

Asn Ala Arg Pro Tyr Leu Gly Asp Asp Asp Thr Leu Ile Asn Glu Phe
 115 120 125

Leu Pro Val Asn Val Thr Thr Ser Val Asn Ile Lys Phe Ser Thr Asp
 130 135 140

Val Glu Ser Ser Ile Ile Ser Asn Leu Leu Val Leu Gly Ala Gly Pro
 145 150 155 160

Asp Ile Phe Lys Ala Tyr Cys Thr Pro Leu Val Arg Phe Asn Lys Ser
 165 170 175

Asp Lys Leu Ile Glu Pro Ser Asn His Gly Phe Gly Ser Ile Asn Ile
 180 185 190

Leu Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Glu His Ile Phe Asn Asp Ile Ser Gly
 195 200 205

Gly Asn His Asn Ser Thr Glu Ser Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ile Ser
 210 215 220

Leu	Ala	His	Glu	Leu	Ile	His	Ala	Leu	His	Gly	Leu	Tyr	Gly	Ala	Lys
225					230					235					240
Ala	Val	Thr	His	Lys	Glu	Ser	Leu	Val	Ala	Glu	Arg	Gly	Pro	Leu	Met
				245					250					255	
Ile	Ala	Glu	Lys	Pro	Ile	Arg	Leu	Glu	Glu	Phe	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly
			260					265					270		
Glu	Asp	Leu	Asn	Ile	Ile	Pro	Ser	Ala	Met	Lys	Glu	Lys	Ile	Tyr	Asn
		275					280					285			
Asp	Leu	Leu	Ala	Asn	Tyr	Glu	Lys	Ile	Ala	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Val
	290					295					300				
Asn	Thr	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	Asp	Ile	Asn	Glu	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Phe
305					310					315					320
Gln	Trp	Lys	Tyr	Gly	Leu	Asp	Arg	Asn	Ala	Asp	Gly	Ser	Tyr	Thr	Val
				325					330					335	
Asn	Arg	Asn	Lys	Phe	Asn	Glu	Ile	Tyr	Lys	Lys	Leu	Tyr	Ser	Phe	Thr
			340					345					350		
Glu	Ile	Asp	Leu	Ala	Asn	Lys	Phe	Lys	Val	Lys	Cys	Arg	Asn	Thr	Tyr
		355					360					365			
Phe	Ile	Lys	Tyr	Gly	Phe	Val	Lys	Val	Pro	Asn	Leu	Leu	Asp	Asp	Asp
	370					375					380				
Ile	Tyr	Thr	Val	Ser	Glu	Gly	Phe	Asn	Ile	Gly	Asn	Leu	Ala	Val	Asn
385					390					395					400
Asn	Arg	Gly	Gln	Asn	Ile	Asn	Leu	Asn	Pro	Lys	Ile	Ile	Asp	Ser	Ile
				405					410					415	
Pro	Asp	Lys	Gly	Leu	Val	Glu	Lys	Ile	Ile	Lys	Phe	Cys	Lys	Ser	Ile
			420					425					430		
Ile	Pro	Arg	Lys	Gly	Thr	Lys	Gln	Ser	Pro	Ser	Leu	Cys	Ile	Arg	Val
		435					440					445			
Asn	Asn	Arg	Glu	Leu	Phe	Phe	Val	Ala	Ser	Glu	Ser	Ser	Tyr	Asn	Glu
	450					455					460				
Ser	Asp	Ile	Asn	Thr	Pro	Lys	Glu	Ile	Asp	Asp	Thr	Thr	Asn	Leu	Asn
465					470					475					480

RU 2 545 783 C9 (W1 C2)

Asn	Asn	Tyr	Arg	Asn	Asn	Leu	Asp	Glu	Val	Ile	Leu	Asp	Tyr	Asn	Ser	
				485							490			495		
Glu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ile	Ser	Asn	Arg	Thr	Leu	Asn	Thr	Leu	Val	Gln	
				500							505			510		
Asp	Asn	Ser	Tyr	Val	Pro	Arg	Tyr	Asp	Ser	Asn	Gly	Thr	Ser	Glu	Ile	
				515							520			525		
Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Val	Asp	Phe	Asn	Val	Phe	Phe	Tyr	Leu	His	Ala	
				530							535			540		
Gln	Lys	Val	Pro	Glu	Gly	Glu	Thr	Asn	Ile	Ser	Leu	Thr	Ser	Ser	Ile	
				545							550			555		
Asp	Thr	Ala	Leu	Leu	Glu	Glu	Ser	Lys	Val	Tyr	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser	
				565							570			575		
Glu	Phe	Ile	Asp	Thr	Ile	Asn	Lys	Pro	Val	Asn	Ala	Ala	Leu	Phe	Ile	
				580							585			590		
Asp	Trp	Ile	Ser	Lys	Val	Ile	Arg	Asp	Phe	Thr	Thr	Glu	Ala	Thr	Gln	
				595							600			605		
Lys	Ser	Thr	Val	Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Ser	Leu	Ile	Val	Pro	Tyr	
				610							615			620		
Val	Gly	Leu	Ala	Leu	Asn	Ile	Val	Ile	Glu	Ala	Glu	Lys	Gly	Asn	Phe	
				625							630			635		
Glu	Glu	Ala	Phe	Glu	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	
				645							650			655		
Pro	Glu	Leu	Thr	Ile	Pro	Val	Ile	Leu	Val	Phe	Thr	Ile	Lys	Ser	Tyr	
				660							665			670		
Ile	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asn	Lys	Asn	Lys	Ala	Ile	Lys	Ala	Ile	Asn	Asn	
				675							680			685		
Ser	Leu	Ile	Glu	Arg	Glu	Ala	Lys	Trp	Lys	Glu	Ile	Tyr	Ser	Trp	Ile	
				690							695			700		
Val	Ser	Asn	Trp	Leu	Thr	Arg	Ile	Asn	Thr	Gln	Phe	Asn	Lys	Arg	Lys	
				705							710			715		
Glu	Gln	Met	Tyr	Gln	Ala	Leu	Gln	Asn	Gln	Val	Asp	Ala	Ile	Lys	Thr	

725					730					735					
Ala	Ile	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Thr	Ser	Asp	Glu	Lys	Asn	Arg
		740					745						750		
Leu	Glu	Ser	Lys	Tyr	Asn	Ile	Asn	Asn	Ile	Glu	Glu	Glu	Leu	Asn	Lys
		755					760					765			
Lys	Val	Ser	Leu	Ala	Met	Lys	Asn	Ile	Glu	Arg	Phe	Met	Thr	Glu	Ser
	770					775					780				
Ser	Ile	Ser	Tyr	Leu	Met	Lys	Leu	Ile	Asn	Glu	Ala	Glu	Val	Gly	Lys
785						790					795				800
Leu	Lys	Glu	Tyr	Asp	Lys	His	Val	Lys	Ser	Asp	Leu	Leu	Asp	Tyr	Ile
				805					810					815	
Leu	Tyr	His	Lys	Leu	Ile	Leu	Gly	Glu	Gln	Thr	Lys	Glu	Leu	Ile	Asp
			820					825					830		
Leu	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Ser	Ser	Ile	Pro	Phe	Glu	Leu	Ser	Ser
		835					840					845			
Tyr	Thr	Asn	Asp	Lys	Ile	Leu	Ile	Ile	Tyr	Phe	Asn	Arg	Leu	Tyr	Lys
	850					855					860				
Lys	Ile	Lys	Asp	Ser	Ser	Ile	Leu	Asp	Met	Arg	Tyr	Glu	Asn	Asn	Lys
865						870					875				880
Phe	Ile	Asp	Ile	Ser	Gly	Tyr	Gly	Ser	Asn	Ile	Ser	Ile	Asn	Gly	Asn
				885					890					895	
Val	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Thr	Asn	Arg	Asn	Gln	Phe	Gly	Ile	Tyr	Ser	Gly
			900					905					910		
Arg	Leu	Ser	Glu	Val	Asn	Ile	Ala	Gln	Asn	Asn	Asp	Ile	Ile	Tyr	Asn
		915					920					925			
Ser	Arg	Tyr	Gln	Asn	Phe	Ser	Ile	Ser	Phe	Trp	Val	Thr	Ile	Pro	Lys
	930					935					940				
His	Tyr	Arg	Pro	Met	Asn	Arg	Asn	Arg	Glu	Tyr	Thr	Ile	Ile	Asn	Cys
945						950					955				960
Met	Gly	Asn	Asn	Asn	Ser	Gly	Trp	Lys	Ile	Ser	Leu	Arg	Thr	Ile	Arg
				965					970					975	

Asp Cys Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Ser Gly Asn Lys Glu
980 985 990

Lys Leu Ile Phe Arg Tyr Glu Glu Leu Ala Ser Ile Ser Asp Tyr Ile
995 1000 1005

Asn Lys Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Gly Asn
1010 1015 1020

Ser Arg Ile Tyr Ile Asn Gly Asn Leu Ile Val Glu Lys Ser Ile
1025 1030 1035

Ser Asn Leu Gly Asp Ile His Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys
1040 1045 1050

Ile Val Gly Cys Asp Asp Glu Thr Tyr Val Gly Ile Arg Tyr Phe
1055 1060 1065

Lys Val Phe Asn Thr Glu Leu Asp Lys Thr Glu Ile Glu Thr Leu
1070 1075 1080

Tyr Ser Asn Glu Pro Asp Pro Ser Ile Leu Lys Asp Tyr Trp Gly
1085 1090 1095

Asn Tyr Leu Leu Tyr Asn Lys Lys Tyr Tyr Leu Phe Asn Leu Leu
1100 1105 1110

Arg Lys Asp Lys Tyr Ile Thr Arg Asn Ser Gly Ile Leu Asn Ile
1115 1120 1125

Asn Gln Gln Arg Gly Val Thr Gly Gly Ile Ser Val Phe Leu Asn
1130 1135 1140

Tyr Lys Leu Tyr Glu Gly Val Glu Val Ile Ile Arg Lys Asn Ala
1145 1150 1155

Pro Ile Asp Ile Ser Asn Thr Asp Asn Phe Val Arg Lys Asn Asp
1160 1165 1170

Leu Ala Tyr Ile Asn Val Val Asp His Gly Val Glu Tyr Arg Leu
1175 1180 1185

Tyr Ala Asp Ile Ser Ile Thr Lys Ser Glu Lys Ile Ile Lys Leu
1190 1195 1200

Ile Arg Thr Ser Asn Pro Asn Asp Ser Leu Gly Gln Ile Ile Val
1205 1210 1215

Met Asp Ser Ile Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn Phe Gln Asn Asn
1220 1225 1230

Asp Gly Ser Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe His Ser Asp Asp Leu
1235 1240 1245

Val Ala Ser Ser Trp Tyr Tyr Asn His Ile Arg Arg Asn Thr Ser
1250 1255 1260

Ser Asn Gly Cys Phe Trp Ser Phe Ile Ser Lys Glu His Gly Trp
1265 1270 1275

Lys Glu
1280

<210> 23
<211> 1297
<212> PRT
<213> Clostridium botulinum

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<400> 23

Met Pro Val Asn Ile Lys Xaa Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asn Asn
1 5 10 15

Asp Asp Ile Ile Met Met Glu Pro Phe Asn Asp Pro Gly Pro Gly Thr
20 25 30

Tyr Tyr Lys Ala Phe Arg Ile Ile Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu
35 40 45

Arg Phe Thr Tyr Gly Phe Gln Pro Asp Gln Phe Asn Ala Ser Thr Gly
50 55 60

Val Phe Ser Lys Asp Val Tyr Glu Tyr Tyr Asp Pro Thr Tyr Leu Lys
65 70 75 80

Thr Asp Ala Glu Lys Asp Lys Phe Leu Lys Thr Met Ile Lys Leu Phe
85 90 95

Asn Arg Ile Asn Ser Lys Pro Ser Gly Gln Arg Leu Leu Asp Met Ile
100 105 110

Val Asp Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn Ala Ser Thr Pro Pro Asp Lys

115	120	125
Phe Ala Ala Asn Val Ala Asn Val Ser Ile Asn Lys Lys Ile Ile Gln 130 135 140		
Pro Gly Ala Glu Asp Gln Ile Lys Gly Leu Met Thr Asn Leu Ile Ile 145 150 155 160		
Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Ser Asp Asn Phe Thr Asp Ser Met Ile 165 170 175		
Met Asn Gly His Ser Pro Ile Ser Glu Gly Phe Gly Ala Arg Met Met 180 185 190		
Ile Arg Phe Cys Pro Ser Cys Leu Asn Val Phe Asn Asn Val Gln Glu 195 200 205		
Asn Lys Asp Thr Ser Ile Phe Ser Arg Arg Ala Tyr Phe Ala Asp Pro 210 215 220		
Ala Leu Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr 225 230 235 240		
Gly Ile Lys Ile Ser Asn Leu Pro Ile Thr Pro Asn Thr Lys Glu Phe 245 250 255		
Phe Met Gln His Ser Asp Pro Val Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe 260 265 270		
Gly Gly His Asp Pro Ser Val Ile Ser Pro Ser Thr Asp Met Asn Ile 275 280 285		
Tyr Asn Lys Ala Leu Gln Asn Phe Gln Asp Ile Ala Asn Arg Leu Asn 290 295 300		
Ile Val Ser Ser Ala Gln Gly Ser Gly Ile Asp Ile Ser Leu Tyr Lys 305 310 315 320		
Gln Ile Tyr Lys Asn Lys Tyr Asp Phe Val Glu Asp Pro Asn Gly Lys 325 330 335		
Tyr Ser Val Asp Lys Asp Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ala Leu Met 340 345 350		
Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Leu Ala Gly Glu Tyr Gly Ile Lys Thr 355 360 365		

Arg	Tyr	Ser	Tyr	Phe	Ser	Glu	Tyr	Leu	Pro	Pro	Ile	Lys	Thr	Glu	Lys
370						375					380				
Leu	Leu	Asp	Asn	Thr	Ile	Tyr	Thr	Gln	Asn	Glu	Gly	Phe	Asn	Ile	Ala
385					390					395					400
Ser	Lys	Asn	Leu	Lys	Thr	Glu	Phe	Asn	Gly	Gln	Asn	Lys	Ala	Val	Asn
			405						410					415	
Lys	Glu	Ala	Tyr	Glu	Glu	Ile	Ser	Leu	Glu	His	Leu	Val	Ile	Tyr	Arg
		420					425						430		
Ile	Ala	Met	Cys	Lys	Pro	Val	Met	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gly	Lys	Ser	Glu
	435						440					445			
Gln	Cys	Ile	Ile	Val	Asn	Asn	Glu	Asp	Leu	Phe	Phe	Ile	Ala	Asn	Lys
	450					455					460				
Asp	Ser	Phe	Ser	Lys	Asp	Leu	Ala	Lys	Ala	Glu	Thr	Ile	Ala	Tyr	Asn
465					470					475					480
Thr	Gln	Asn	Asn	Thr	Ile	Glu	Asn	Asn	Phe	Ser	Ile	Asp	Gln	Leu	Ile.
				485					490					495	
Leu	Asp	Asn	Asp	Leu	Ser	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Pro	Asn	Glu	Asn	Thr
			500					505					510		
Glu	Pro	Phe	Thr	Asn	Phe	Asp	Asp	Ile	Asp	Ile	Pro	Val	Tyr	Ile	Lys
		515					520					525			
Gln	Ser	Ala	Leu	Lys	Lys	Ile	Phe	Val	Asp	Gly	Asp	Ser	Leu	Phe	Glu
	530					535					540				
Tyr	Leu	His	Ala	Gln	Thr	Phe	Pro	Ser	Asn	Ile	Glu	Asn	Leu	Gln	Leu
545					550					555					560
Thr	Asn	Ser	Leu	Asn	Asp	Ala	Leu	Arg	Asn	Asn	Asn	Lys	Val	Tyr	Thr
				565					570					575	
Phe	Phe	Ser	Thr	Asn	Leu	Val	Glu	Lys	Ala	Asn	Thr	Val	Val	Gly	Ala
			580					585					590		
Ser	Leu	Phe	Val	Asn	Trp	Val	Lys	Gly	Val	Ile	Asp	Asp	Phe	Thr	Ser
		595					600					605			
Glu	Ser	Thr	Gln	Lys	Ser	Thr	Ile	Asp	Lys	Val	Ser	Asp	Val	Ser	Ile
	610					615					620				

Ile	Ile	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala	Leu	Asn	Val	Gly	Asn	Glu	Thr	Ala	
625					630					635					640	
Lys	Glu	Asn	Phe	Lys	Asn	Ala	Phe	Glu	Ile	Gly	Gly	Ala	Ala	Ile	Leu	
				645					650					655		
Met	Glu	Phe	Ile	Pro	Glu	Leu	Ile	Val	Pro	Ile	Val	Gly	Phe	Phe	Thr	
			660					665					670			
Leu	Glu	Ser	Tyr	Val	Gly	Asn	Lys	Gly	His	Ile	Ile	Met	Thr	Ile	Ser	
		675					680					685				
Asn	Ala	Leu	Lys	Lys	Arg	Asp	Gln	Lys	Trp	Thr	Asp	Met	Tyr	Gly	Leu	
	690					695					700					
Ile	Val	Ser	Gln	Trp	Leu	Ser	Thr	Val	Asn	Thr	Gln	Phe	Tyr	Thr	Ile	
705					710					715					720	
Lys	Glu	Arg	Met	Tyr	Asn	Ala	Leu	Asn	Asn	Gln	Ser	Gln	Ala	Ile	Glu	
				725					730					735		
Lys	Ile	Ile	Glu	Asp	Gln	Tyr	Asn	Arg	Tyr	Ser	Glu	Glu	Asp	Lys	Met	
			740					745					750			
Asn	Ile	Asn	Ile	Asp	Phe	Asn	Asp	Ile	Asp	Phe	Lys	Leu	Asn	Gln	Ser	
		755					760					765				
Ile	Asn	Leu	Ala	Ile	Asn	Asn	Ile	Asp	Asp	Phe	Ile	Asn	Gln	Cys	Ser	
	770					775					780					
Ile	Ser	Tyr	Leu	Met	Asn	Arg	Met	Ile	Pro	Leu	Ala	Val	Lys	Lys	Leu	
785					790					795					800	
Lys	Asp	Phe	Asp	Asp	Asn	Leu	Lys	Arg	Asp	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ile	Asp	
			805						810					815		
Thr	Asn	Glu	Leu	Tyr	Leu	Leu	Asp	Glu	Val	Asn	Ile	Leu	Lys	Ser	Lys	
			820					825					830			
Val	Asn	Arg	His	Leu	Lys	Asp	Ser	Ile	Pro	Phe	Asp	Leu	Ser	Leu	Tyr	
		835					840					845				
Thr	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Ile	Gln	Val	Phe	Asn	Asn	Tyr	Ile	Ser	Asn	
	850					855					860					
Ile	Ser	Ser	Asn	Ala	Ile	Leu	Ser	Leu	Ser	Tyr	Arg	Gly	Gly	Arg	Leu	
865					870					875					880	

Ile Asp Ser Ser Gly Tyr Gly Ala Thr Met Asn Val Gly Ser Asp Val
885 890 895

Ile Phe Asn Asp Ile Gly Asn Gly Gln Phe Lys Leu Asn Asn Ser Glu
900 905 910

Asn Ser Asn Ile Thr Ala His Gln Ser Lys Phe Val Val Tyr Asp Ser
915 920 925

Met Phe Asp Asn Phe Ser Ile Asn Phe Trp Val Arg Thr Pro Lys Tyr
930 935 940

Asn Asn Asn Asp Ile Gln Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Tyr Thr Ile Ile
945 950 955 960

Ser Cys Ile Lys Asn Asp Ser Gly Trp Lys Val Ser Ile Lys Gly Asn
965 970 975

Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile Asp Val Asn Ala Lys Ser Lys Ser Ile
980 985 990

Phe Phe Glu Tyr Ser Ile Lys Asp Asn Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys
995 1000 1005

Trp Phe Ser Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asn Ala Asn
1010 1015 1020

Ile Tyr Ile Asn Gly Ser Leu Lys Lys Ser Glu Lys Ile Leu Asn
1025 1030 1035

Leu Asp Arg Ile Asn Ser Ser Asn Asp Ile Asp Phe Lys Leu Ile
1040 1045 1050

Asn Cys Thr Asp Thr Thr Lys Phe Val Trp Ile Lys Asp Phe Asn
1055 1060 1065

Ile Phe Gly Arg Glu Leu Asn Ala Thr Glu Val Ser Ser Leu Tyr
1070 1075 1080

Trp Ile Gln Ser Ser Thr Asn Thr Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn
1085 1090 1095

Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Gln Tyr Tyr Leu Phe Asn Gln Gly Met
1100 1105 1110

Gln Asn Ile Tyr Ile Lys Tyr Phe Ser Lys Ala Ser Met Gly Glu

1115	1120	1125
Thr Ala Pro Arg Thr Asn Phe Asn Asn Ala Ala Ile Asn Tyr Gln 1130 1135 1140		
Asn Leu Tyr Leu Gly Leu Arg Phe Ile Ile Lys Lys Ala Ser Asn 1145 1150 1155		
Ser Arg Asn Ile Asn Asn Asp Asn Ile Val Arg Glu Gly Asp Tyr 1160 1165 1170		
Ile Tyr Leu Asn Ile Asp Asn Ile Ser Asp Glu Ser Tyr Arg Val 1175 1180 1185		
Tyr Val Leu Val Asn Ser Lys Glu Ile Gln Thr Gln Leu Phe Leu 1190 1195 1200		
Ala Pro Ile Asn Asp Asp Pro Thr Phe Tyr Asp Val Leu Gln Ile 1205 1210 1215		
Lys Lys Tyr Tyr Glu Lys Thr Thr Tyr Asn Cys Gln Ile Leu Cys 1220 1225 1230		
Glu Lys Asp Thr Lys Thr Phe Gly Leu Phe Gly Ile Gly Lys Phe 1235 1240 1245		
Val Lys Asp Tyr Gly Tyr Val Trp Asp Thr Tyr Asp Asn Tyr Phe 1250 1255 1260		
Cys Ile Ser Gln Trp Tyr Leu Arg Arg Ile Ser Glu Asn Ile Asn 1265 1270 1275		
Lys Leu Arg Leu Gly Cys Asn Trp Gln Phe Ile Pro Val Asp Glu 1280 1285 1290		
Gly Trp Thr Glu 1295		

<210> 24
 <211> 1315
 <212> PRT
 <213> Clostridium tetani

<400> 24

Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Val Asn Asn
1 5 10 15

Asp Thr Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Tyr Cys Lys Gly Leu Asp Ile

20					25					30					
Tyr	Tyr	Lys	Ala	Phe	Lys	Ile	Thr	Asp	Arg	Ile	Trp	Ile	Val	Pro	Glu
		35					40					45			
Arg	Tyr	Glu	Phe	Gly	Thr	Lys	Pro	Glu	Asp	Phe	Asn	Pro	Pro	Ser	Ser
	50					55					60				
Leu	Ile	Glu	Gly	Ala	Ser	Glu	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Asn	Tyr	Leu	Arg	Thr
65						70					75				80
Asp	Ser	Asp	Lys	Asp	Arg	Phe	Leu	Gln	Thr	Met	Val	Lys	Leu	Phe	Asn
				85					90					95	
Arg	Ile	Lys	Asn	Asn	Val	Ala	Gly	Glu	Ala	Leu	Leu	Asp	Lys	Ile	Ile
			100					105						110	
Asn	Ala	Ile	Pro	Tyr	Leu	Gly	Asn	Ser	Tyr	Ser	Leu	Leu	Asp	Lys	Phe
		115					120						125		
Asp	Thr	Asn	Ser	Asn	Ser	Val	Ser	Phe	Asn	Leu	Leu	Glu	Gln	Asp	Pro
	130					135						140			
Ser	Gly	Ala	Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Met	Leu	Thr	Asn	Leu	Ile	Ile	Phe
145						150					155				160
Gly	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Asn	Lys	Asn	Glu	Val	Arg	Gly	Ile	Val	Leu
				165					170					175	
Arg	Val	Asp	Asn	Lys	Asn	Tyr	Phe	Pro	Cys	Arg	Asp	Gly	Phe	Gly	Ser
			180					185					190		
Ile	Met	Gln	Met	Ala	Phe	Cys	Pro	Glu	Tyr	Val	Pro	Thr	Phe	Asp	Asn
		195					200					205			
Val	Ile	Glu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr	Ile	Gly	Lys	Ser	Lys	Tyr	Phe
	210					215					220				
Gln	Asp	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu	Met	His	Glu	Leu	Ile	His	Val	Leu	His
225						230					235				240
Gly	Leu	Tyr	Gly	Met	Gln	Val	Ser	Ser	His	Glu	Ile	Ile	Pro	Ser	Lys
				245					250					255	
Gln	Glu	Ile	Tyr	Met	Gln	His	Thr	Tyr	Pro	Ile	Ser	Ala	Glu	Glu	Leu
			260					265					270		

Phe Thr Phe Gly Gly Gln Asp Ala Asn Leu Ile Ser Ile Asp Ile Lys
 275 280 285
 Asn Asp Leu Tyr Glu Lys Thr Leu Asn Asp Tyr Lys Ala Ile Ala Asn
 290 295 300
 Lys Leu Ser Gln Val Thr Ser Cys Asn Asp Pro Asn Ile Asp Ile Asp
 305 310 315 320
 Ser Tyr Lys Gln Ile Tyr Gln Gln Lys Tyr Gln Phe Asp Lys Asp Ser
 325 330 335
 Asn Gly Gln Tyr Ile Val Asn Glu Asp Lys Phe Gln Ile Leu Tyr Asn
 340 345 350
 Ser Ile Met Tyr Gly Phe Thr Glu Ile Glu Leu Gly Lys Lys Phe Asn
 355 360 365
 Ile Lys Thr Arg Leu Ser Tyr Phe Ser Met Asn His Asp Pro Val Lys
 370 375 380
 Ile Pro Asn Leu Leu Asp Asp Thr Ile Tyr Asn Asp Thr Glu Gly Phe
 385 390 395 400
 Asn Ile Glu Ser Lys Asp Leu Lys Ser Glu Tyr Lys Gly Gln Asn Met
 405 410 415
 Arg Val Asn Thr Asn Ala Phe Arg Asn Val Asp Gly Ser Gly Leu Val
 420 425 430
 Ser Lys Leu Ile Gly Leu Cys Lys Lys Ile Ile Pro Pro Thr Asn Ile
 435 440 445
 Arg Glu Asn Leu Tyr Asn Arg Thr Ala Ser Leu Thr Asp Leu Gly Gly
 450 455 460
 Glu Leu Cys Ile Lys Ile Lys Asn Glu Asp Leu Thr Phe Ile Ala Glu
 465 470 475 480
 Lys Asn Ser Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gln Asp Glu Ile Val Ser Tyr
 485 490 495
 Asn Thr Lys Asn Lys Pro Leu Asn Phe Asn Tyr Ser Leu Asp Lys Ile
 500 505 510
 Ile Val Asp Tyr Asn Leu Gln Ser Lys Ile Thr Leu Pro Asn Asp Arg
 515 520 525

Thr	Thr	Pro	Val	Thr	Lys	Gly	Ile	Pro	Tyr	Ala	Pro	Glu	Tyr	Lys	Ser
530						535					540				
Asn	Ala	Ala	Ser	Thr	Ile	Glu	Ile	His	Asn	Ile	Asp	Asp	Asn	Thr	Ile
545					550					555					560
Tyr	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Ser	Pro	Thr	Thr	Leu	Gln	Arg	Ile
				565					570					575	
Thr	Met	Thr	Asn	Ser	Val	Asp	Asp	Ala	Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Lys	Ile
			580					585					590		
Tyr	Ser	Tyr	Phe	Pro	Ser	Val	Ile	Ser	Lys	Val	Asn	Gln	Gly	Ala	Gln
		595					600					605			
Gly	Ile	Leu	Phe	Leu	Gln	Trp	Val	Arg	Asp	Ile	Ile	Asp	Asp	Phe	Thr
	610					615					620				
Asn	Glu	Ser	Ser	Gln	Lys	Thr	Thr	Ile	Asp	Lys	Ile	Ser	Asp	Val	Ser
625					630					635					640
Thr	Ile	Val	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala	Leu	Asn	Ile	Val	Lys	Gln	Gly
				645					650					655	
Tyr	Glu	Gly	Asn	Phe	Ile	Gly	Ala	Leu	Glu	Thr	Thr	Gly	Val	Val	Leu
			660					665					670		
Leu	Leu	Glu	Tyr	Ile	Pro	Glu	Ile	Thr	Leu	Pro	Val	Ile	Ala	Ala	Leu
		675					680					685			
Ser	Ile	Ala	Glu	Ser	Ser	Thr	Gln	Lys	Glu	Lys	Ile	Ile	Lys	Thr	Ile
	690					695					700				
Asp	Asn	Phe	Leu	Glu	Lys	Arg	Tyr	Glu	Lys	Trp	Ile	Glu	Val	Tyr	Lys
705					710					715					720
Leu	Val	Lys	Ala	Lys	Trp	Leu	Gly	Thr	Val	Asn	Thr	Gln	Phe	Gln	Lys
				725					730					735	
Arg	Ser	Tyr	Gln	Met	Tyr	Arg	Ser	Leu	Glu	Tyr	Gln	Val	Asp	Ala	Ile
			740					745					750		
Lys	Lys	Ile	Ile	Asp	Tyr	Glu	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Ser	Gly	Pro	Asp	Lys
		755					760					765			
Glu	Gln	Ile	Ala	Asp	Glu	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Asn	Lys	Leu	Glu	Glu
	770					775						780			

Lys Ala Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Ile Phe Met Arg Glu Ser
785 790 795 800

Ser Arg Ser Phe Leu Val Asn Gln Met Ile Asn Glu Ala Lys Lys Gln
805 810 815

Leu Leu Glu Phe Asp Thr Gln Ser Lys Asn Ile Leu Met Gln Tyr Ile
820 825 830

Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu
835 840 845

Ser Lys Ile Asn Lys Val Phe Ser Thr Pro Ile Pro Phe Ser Tyr Ser
850 855 860

Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile
865 870 875 880

Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile
885 890 895

Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala
900 905 910

Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn
915 920 925

Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn
930 935 940

Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys
945 950 955 960

Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr Gly Thr Asn Glu Tyr Ser Ile
965 970 975

Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser
980 985 990

Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile Trp Thr Leu Lys Asp Ser Ala
995 1000 1005

Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg Asp Leu Pro Asp Lys Phe
1010 1015 1020

Asn Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe Ile Thr Ile Thr Asn

1025	1030	1035
Asp Arg Leu Ser Ser Ala 1040	Asn Leu Tyr Ile Asn 1045	Gly Val Leu Met 1050
Gly Ser Ala Glu Ile Thr 1055	Gly Leu Gly Ala Ile 1060	Arg Glu Asp Asn 1065
Asn Ile Thr Leu Lys Leu 1070	Asp Arg Cys Asn Asn 1075	Asn Asn Gln Tyr 1080
Val Ser Ile Asp Lys Phe 1085	Arg Ile Phe Cys Lys 1090	Ala Leu Asn Pro 1095
Lys Glu Ile Glu Lys Leu 1100	Tyr Thr Ser Tyr Leu 1105	Ser Ile Thr Phe 1110
Leu Arg Asp Phe Trp Gly 1115	Asn Pro Leu Arg Tyr 1120	Asp Thr Glu Tyr 1125
Tyr Leu Ile Pro Val Ala 1130	Ser Ser Ser Lys Asp 1135	Val Gln Leu Lys 1140
Asn Ile Thr Asp Tyr Met 1145	Tyr Leu Thr Asn Ala 1150	Pro Ser Tyr Thr 1155
Asn Gly Lys Leu Asn Ile 1160	Tyr Tyr Arg Arg Leu 1165	Tyr Asn Gly Leu 1170
Lys Phe Ile Ile Lys Arg 1175	Tyr Thr Pro Asn Asn 1180	Glu Ile Asp Ser 1185
Phe Val Lys Ser Gly Asp 1190	Phe Ile Lys Leu Tyr 1195	Val Ser Tyr Asn 1200
Asn Asn Glu His Ile Val 1205	Gly Tyr Pro Lys Asp 1210	Gly Asn Ala Phe 1215
Asn Asn Leu Asp Arg Ile 1220	Leu Arg Val Gly Tyr 1225	Asn Ala Pro Gly 1230
Ile Pro Leu Tyr Lys Lys 1235	Met Glu Ala Val Lys 1240	Leu Arg Asp Leu 1245
Lys Thr Tyr Ser Val Gln 1250	Leu Lys Leu Tyr Asp 1255	Asp Lys Asn Ala 1260

Ser Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile Gly Asn Asp
1265 1270 1275

Pro Asn Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His
1280 1285 1290

Leu Lys Asp Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr
1295 1300 1305

Asp Glu Gly Trp Thr Asn Asp
1310 1315

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> искусственный

<220>

<223> пептидная последовательность

<400> 25

Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met
1 5 10 15

Leu

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

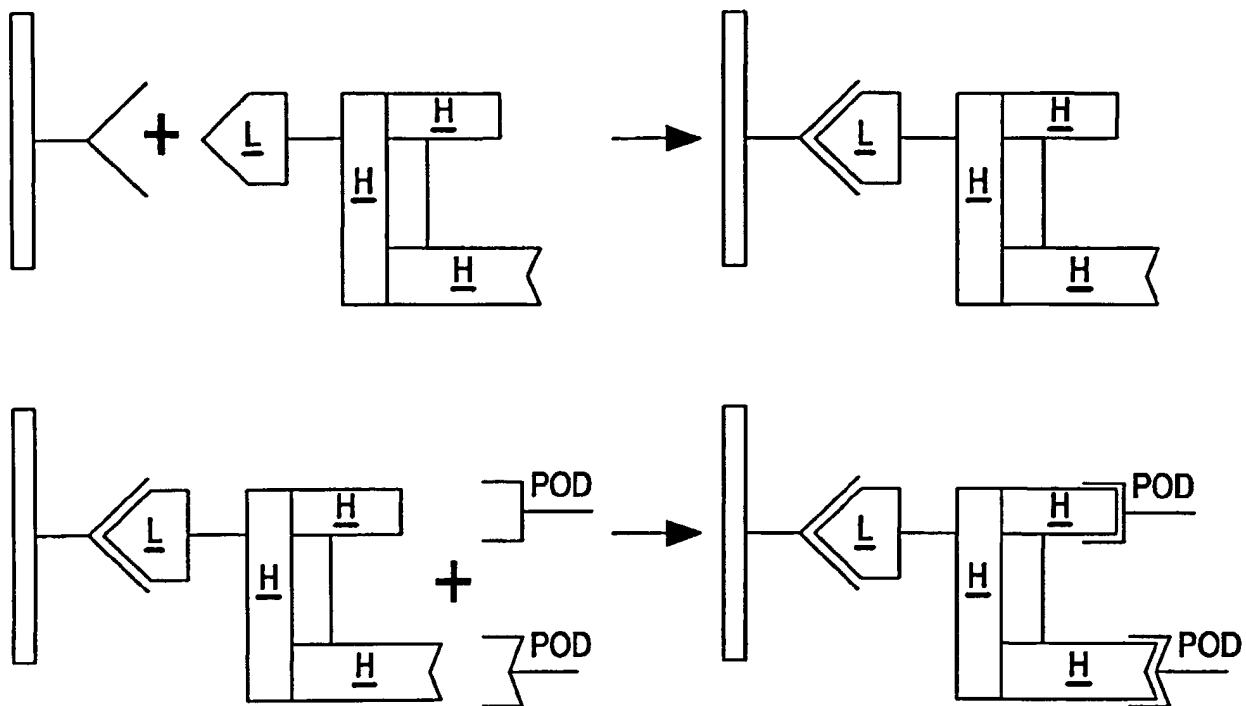
<213> искусственный

<220>

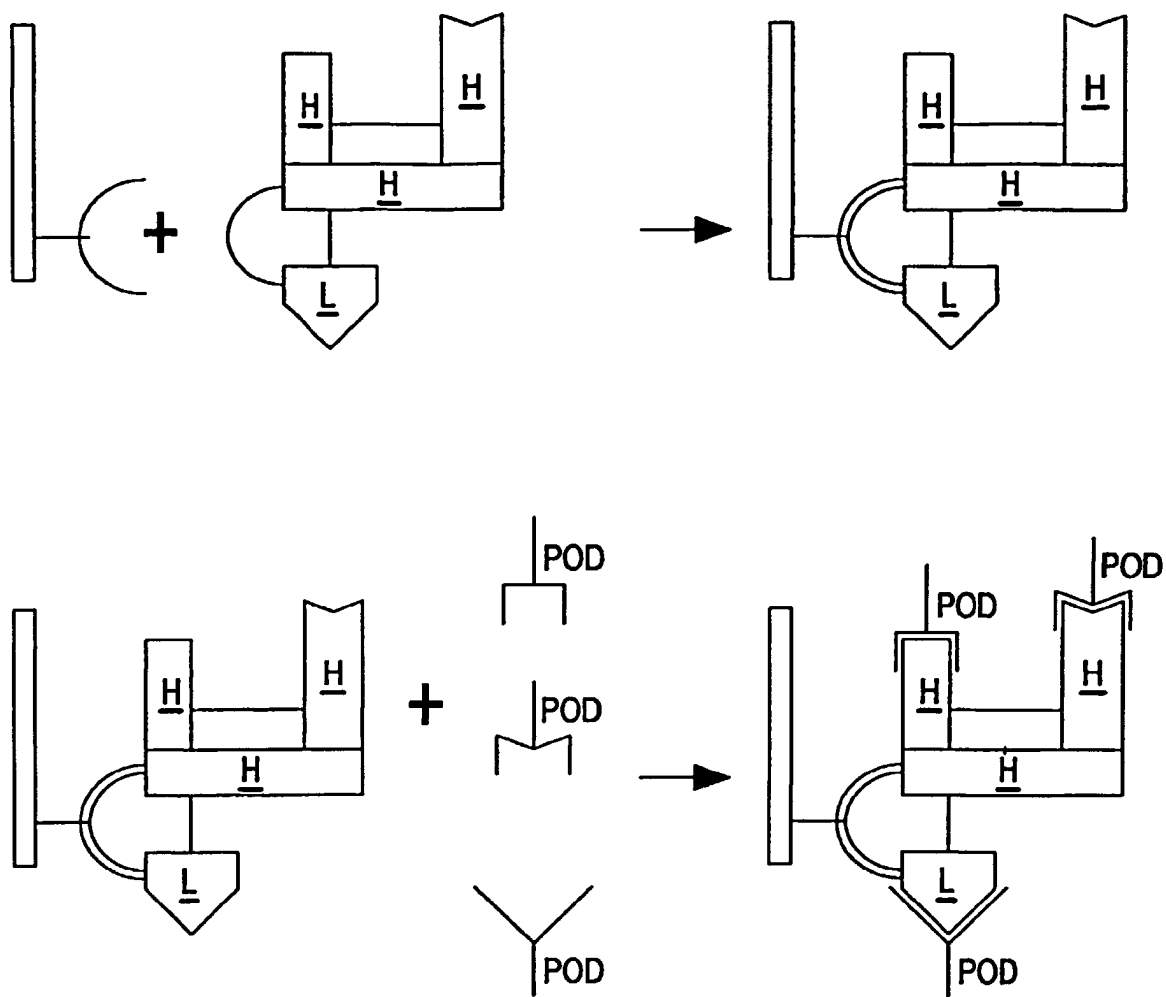
<223> пептидная последовательность

<400> 26

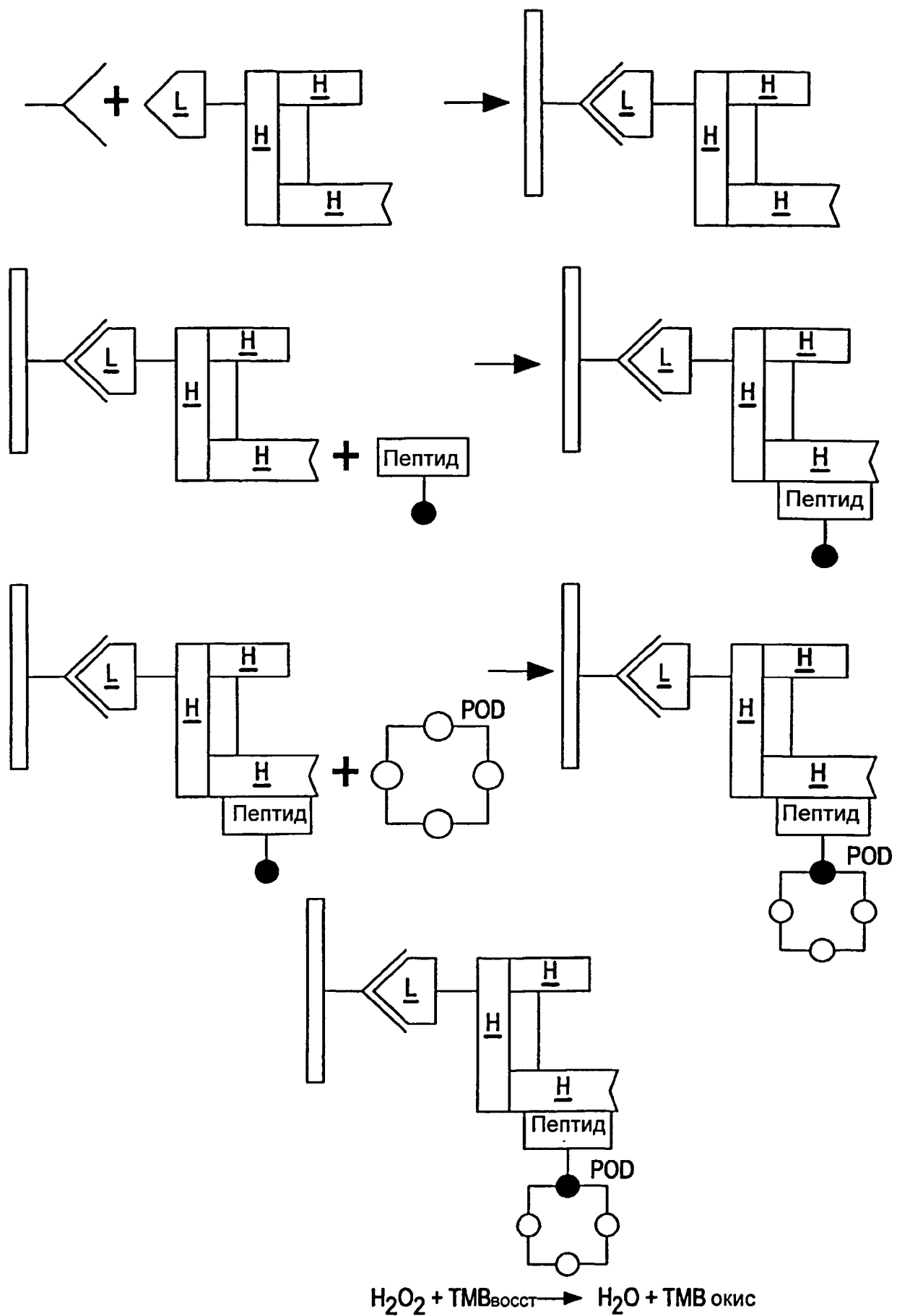
Arg Ala Thr Lys Met Leu
1 5



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

