

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390364** (13) **A9**

**(12) ИСПРАВЛЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К
ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(15) Информация об исправлении
**Версия исправления: 1 (W1 A1)
исправления в описании**

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
C07K 14/33 (2006.01)

(48) Дата публикации исправления
2024.03.07, Бюллетень №3'2024

(43) Дата публикации заявки
2023.07.26

(22) Дата подачи заявки
2017.05.05

(54) ХИМЕРНЫЕ НЕЙРОТОКСИНЫ

(31) **1607901.4**

(72) Изобретатель:

(32) **2016.05.05**

Лю Сай Ман (GB)

(33) **GB**

(62) **201892386; 2017.05.05**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

ИПСЕН БИОФАРМ ЛИМИТЕД (GB)

(57) Настоящее изобретение относится к химерным нейротоксинам с улучшенными свойствами и к их применению в терапии.

A9

202390364

202390364

A9

ХИМЕРНЫЕ НЕЙРОТОКСИНЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к химерным нейротоксинам с улучшенными свойствами и к их применению в терапии.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ДЛЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Бактерии рода *Clostridia* продуцируют высоко активные и специфические белковые токсины, которые могут отравлять нейроны и другие клетки, к которым их доставляют. Примеры таких токсинов клостридий включают в себя нейротоксины, продуцируемые *C. tetani* (TeNT) и *C. botulinum* (BoNT) серотипов А-Г, а также продуцируемые *C. baratii* и *C. butyricum*.

Среди нейротоксинов клостридий присутствуют некоторые из наиболее активных известных токсинов. В качестве примера, ботулинические нейротоксины имеют медианные значения летальной дозы (LD50) для мышей в диапазоне от 0,5 до 5 нг/кг, в зависимости от серотипа. Как столбнячный, так и ботулинический токсины действуют посредством ингибирования функции пораженных нейронов, конкретно, высвобождения нейротрансмиттеров. В то время как ботулинический токсин действует на нервно-мышечное соединение и ингибирует холинэргический перенос в периферической нервной системе, столбнячный токсин действует в центральной нервной системе.

В природе, нейротоксины клостридий синтезируются в форме одноцепочечного полипептида, который модифицируется пост-трансляционно посредством события протеолитического расщепления с формированием двух полипептидных цепей, соединенных вместе дисульфидной связью. Расщепление происходит в специфическом участке расщепления, часто обозначаемом как участок активации, который локализован между остатками цистеина, обеспечивающими межцепьевую дисульфидную связь. Эта двухцепочечная форма представляет собой активную форму токсина. Две цепи называют тяжелой цепью (Н-цепью), имеющей молекулярную массу приблизительно 100 кДа, и легкой цепью (L-цепью), имеющей молекулярную массу приблизительно 50 кДа. Н-цепь содержит N-концевой компонент для транслокации (домен N_N) и C-концевой

компонент для нацеливания (домен Н_C). Участок расщепления локализован между L-цепью и компонентами домена для транслокации. После связывания домена Н_C с его нейроном-мишенью и интернализации связанного токсина в клетку посредством эндосомы, домен Н_N транслоцирует L-цепь через эндосомальную мембрану и в цитозоль, и L-цепь обеспечивает функцию протеазы (также известной как нецитотоксическая протеаза).

Нецитотоксические протеазы действуют посредством протеолитического расщепления белков внутриклеточного транспорта, известных как белки SNARE (например, SNAP-25, VAMP или синтаксин) -см. Gerald K (2002) «Cell and Molecular Biology» (4th edition) John Wiley & Sons, Inc. Акроним SNARE происходит от термина растворимый рецептор присоединения NSF (Soluble NSF Attachment Receпtor), где NSF обозначает чувствительный к N-этилмалеинимиду фактор (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor). Белки SNARE являются составной частью слияния с внутриклеточной везикулой, и таким образом, секреции молекул посредством транспорта везикул из клетки. Протеазная функция представляет собой активность зависимой от цинка эндопептидазы и имеет высокую субстратную специфичность для белков SNARE. Соответственно, после доставки к желательной клетке-мишени, нецитотоксическая протеаза является способной ингибировать клеточную секрецию из клетки-мишени. Протеазы L-цепи токсинов клостридий представляют собой нецитотоксические протеазы, расщепляющие белки SNARE.

Принимая во внимание повсеместный характер белков SNARE, нейротоксины клостридий, такие как ботулинический токсин, успешно применяли в широком ряде способов терапии.

В качестве примера, авторы настоящего изобретения ссылаются на William J. Lipham, Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin (Slack, Inc., 2004), где описано применение нейротоксинов клостридий, таких как ботулинические нейротоксины (BoNT), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F и BoNT/G, и столбнячный нейротоксин (TeNT), для ингибирования нейронной трансмиссии в ряде терапевтических и косметических или эстетических применений - например, поставляемые на рынок

продукты ботулинического токсина в настоящее время одобрены в качестве лекарственных средств при показаниях, включающих очаговую спастичность, спастичность верхних конечностей, спастичность нижних конечностей, дистонию мышц шеи, блефароспазм, гемифациальный спазм, гипергидроз подмышечных областей, хроническую мигрень, нейрогенную сверхактивность мышцы-сжимателя, межбровные морщины и выраженные морщины в углах глаз. Кроме того, описаны виды терапии нейротоксином клостридий для лечения нейромышечных нарушений (см. US 6872397); для лечения нарушений матки (см. US 2004/0175399); для лечения язв и желудочно-пищеводного рефлюкса (см. US 2004/0086531); для лечения дистонии (см. US 6319505); для лечения повреждений глаз (см. US 2004/0234532); для лечения блефароспазма (см. US 2004/0151740); для лечения страбизма (см. US 2004/0126396); для лечения боли (см. US 6869610, US 6641820, US 6464986 и US 6113915); для лечения фибромиалгии (см. US 6623742, US 2004/0062776); для лечения боли в пояснице (см. US 2004/0037852); для лечения травм мышц (см. US 6423319); для лечения синусовой головной боли (см. US 6838434); для лечения головной боли напряжения (см. US 6776992); для лечения головной боли (см. US 6458365); для уменьшения головной боли при мигрени (см. US 5714469); для лечения сердечно-сосудистых заболеваний (см. US 6767544); для лечения неврологических нарушений, таких как болезнь Паркинсона (см. US 6620415, US 6306403); для лечения нейропсихиатрических нарушений (см. US 2004/0180061, US 2003/0211121); для лечения эндокринных нарушений (см. US 6827931); для лечения нарушений щитовидной железы (см. US 6740321); для лечения нарушения работы потовых желез под влиянием холинэргических веществ (см. US 6683049); для лечения диабета (см. US 6337075, US 6416765); для лечения нарушений поджелудочной железы (см. US 6261572, US 6143306); для лечения злокачественных опухолей, таких как опухоли костной ткани (см. US 6565870, US 6368605, US 6139845, US 2005/0031648); для лечения нарушений уха (см. US 6358926, US 6265379); для лечения вегетативных нарушений, таких как нарушения мышц желудочно-кишечного тракта и дисфункция других гладких мышц (см. US

5437291); для лечения повреждений кожи, ассоциированных с нарушениями пролиферации клеток кожи (см. US 5670484); для контроля нейrogenных воспалительных нарушений (см. US 6063768); для уменьшения потери волос и стимуляции роста волос (см. US 6299893); для лечения опускания углов рта (см. US 6358917); для уменьшения аппетита (см. US 2004/40253274); для стоматологической терапии и процедур (см. US 2004/0115139); для лечения нейромышечных нарушений и состояний (см. US 2002/0010138); для лечения различных нарушений и состояний, и ассоциированной боли (см. US 2004/0013692); для лечения состояний, возникающих в результате повышенной секреции слизи, таких как астма и COPD (см. WO 00/10598); и для лечения не относящихся к нейрональным состояний, таких как воспаление, эндокринные состояния, экзокринные состояния, иммунологические состояния, сердечно-сосудистые состояния, состояния костной ткани (см. WO 01/21213). Полное содержание всех из вышеуказанных публикаций, таким образом, приведено в качестве ссылки.

Предполагают, что использование нецитотоксических протеаз, таких как нейротоксины клостридий (например, BoNTs и TeNT), в терапевтическом и косметическом лечении человека и других млекопитающих распространяется на постоянно расширяющийся диапазон заболеваний и недугов, при которых можно получать преимущество от свойств этих токсинов.

В настоящее время все одобренные лекарственные средства/косметические препараты, содержащие BoNT, содержат природные нейротоксины, очищенный из штаммов клостридий (BoNT/A в случае DYSPORT®, BOTOX® или XEOMIN®, и BoNT/B в случае MYOBLOC®).

Рекомбинантная технология обеспечивает возможность изменения или оптимизации свойств нейротоксинов посредством введения модификации в их последовательность и/или структуру. В частности, получены химерные нейротоксины, в которых домен N_c или субдомен N_{cc} заменен на домен N_c или субдомен N_{cc} из другого нейротоксина.

Rummel et al, 2011 (Exchange of the H_{CC} domain mediating double receptor recognition improves the pharmacodynamic properties of botulinum neurotoxin. FEBS Journal, 278(23), 4506-4515) получили различные активные полноразмерные гибридные нейротоксины, включая химеры AABV, AACС и BVAA (буквы обозначают источник серотипа для каждого из четырех доменов: L, H_N, H_{СN}, H_{CC}). Обнаружено, что химера AABV была более активной, чем BoNT/A в гемидиафрагмальном анализе диафрагмального нерва мышцы, в то время как AACС сохраняла только 10% активности BoNT/A. Химера BVAA сохраняла 85% активности BoNT/A и имела равную активность с BoNT/B.

Wang et al, 2008 (Novel chimeras of botulinum neurotoxins A and E unveil contributions from the binding, translocation, and protease domains to their functional characteristics. Journal of Biological Chemistry, 283(25), 16993-17002) получили химерные нейротоксины AE (LH_N из BoNT/A и H_C из BoNT/E) и EA (LH_N из BoNT/E и H_C из BoNT/A), добавляя линкер в случае химеры AE между доменами LH_N и H_C для увеличения гибкости. Оба являлись способными вызывать паралич в гемидиафрагмальном анализе диафрагмального нерва мышцы, так же как *in vivo*.

Wang et al., 2012a (Longer-acting and highly potent chimaeric inhibitors of excessive exocytosis created with domains from botulinum neurotoxin A and B. Biochemical Journal, 444(1), 59-67) получили химерные нейротоксины AV (LH_N из BoNT/A и H_C из BoNT/B, с линкером для улучшения сворачивания), и VA (LH_N из BoNT/B и H_C из BoNT/A). Химера AV индуцировала у мышей более продолжительный нервномышечный паралич, чем BoNT/A. Химера VA являлась способной уменьшать экзоцитоз из не относящихся к нейрональным клеток.

Wang et al, 2012b (Novel chimeras of botulinum and tetanus neurotoxins yield insights into their distinct sites of neuroparalysis. The FASEB Journal, 26(12), 5035-5048) получили химеры ATx (LH_N из BoNT/A и H_C из TeNT), TxA (LH_N из TeNT и H_C из BoNT/A), ETx (LH_N из BoNT/E и H_C из TeNT) и TxE (LH_N из TeNT и H_C из BoNT/E). Информация, представленная применительно к белковой

последовательности этих химерных нейротоксинов из предшествующей области техники, обобщена в таблице 1 ниже:

Таблица 1 - Домены L_N и H_c химерных нейротоксинов из предшествующей области техники

	Химера	L_N	H_c
Rummel, 2011	AABV	A	B: 871-1304
	AACC	A	C: 871-1296
	BVAA	B	A: 858-1283
Wang, 2008	AE	A: 1-874 (+линкер ELGGGGSEL)	E: 845-1252
	EA	E: 1-844 (+линкер DI)	A: 871-1296
Wang, 2012(a)	AV	A: 1-874 (+линкер ELGGGGSEL)	B: 858-1283
	VA	B: 1-861 (+линкер DI)	A: 871-1296
Wang, 2012(b)	ATx	A: 1-877	Tx: 879-1315
	TxA	Tx: 1-882 (+линкер DI)	A: 871-1296
	ETx	E: 1-844 (+линкер DI)	Tx: 879-1315
	TxE	Tx: 1-882 (+линкер EL)	E: 845-1252

Однако, все еще существует необходимость оптимизированного дизайна химерных нейротоксинов, обеспечивающих улучшенные терапевтические свойства.

Настоящее изобретение решает вышеуказанную проблему посредством предоставления химерных нейротоксинов, как указано в формуле изобретения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте изобретение относится к химерному нейротоксину, содержащему домен L_N из первого нейротоксина, ковалентно связанный с доменом H_c из второго нейротоксина, где первый и второй нейротоксины являются различными, где С-концевой аминокислотный остаток домена L_N соответствует первому аминокислотному остатку спирали Z₁₀, разделяющей домены L_N и H_c в первом нейротоксине, и где N-концевой аминокислотный остаток домена H_c соответствует второму аминокислотному остатку спирали Z₁₀, разделяющей домены L_N и H_c во втором нейротоксине.

Во втором аспекте, изобретение относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный нейротоксин по изобретению.

В третьем аспекте, изобретение относится к вектору, содержащему нуклеотидную последовательность по изобретению.

В четвертом аспекте, изобретение относится к клетке, содержащей нуклеотидную последовательность или вектор по изобретению.

В пятом аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей химерный нейротоксин по изобретению.

В шестом аспекте, изобретение относится к химерному нейротоксину по изобретению для использования в терапии.

В седьмом аспекте, изобретение относится к не терапевтическому использованию химерного нейротоксина по изобретению для лечения эстетического или косметического состояния.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В одном аспекте изобретение относится к химерному нейротоксину, содержащему домен LN_N из первого нейротоксина, ковалентно связанный с доменом N_C домен из второго нейротоксина, где первый и второй нейротоксины являются различными,

где С-концевой аминокислотный остаток домена LN_N соответствует первому аминокислотному остатку спирали Z₁₀, разделяющей домены LN_N и N_C в первом нейротоксине, и

где N-концевой аминокислотный остаток домена N_C соответствует первому аминокислотному остатку спирали Z₁₀, разделяющей домены LN_N и N_C во втором нейротоксине.

Как применяют в настоящем описании, неконкретизированные термины и конкретизированные термины единственного числа могут обозначать один или несколько.

Термин «нейротоксин», как применяют в настоящем описании, обозначает любой полипептид, который проникает в нейрон и ингибирует высвобождение нейротрансмиттеров. Этот процесс включает связывание нейротоксина с низкоаффинным или с высокоаффинным рецептором, интернализацию нейротоксина, транслокацию эндопептидазной части нейротоксина в цитоплазму и ферментную модификацию субстрата нейротоксина. Более конкретно, термин «нейротоксин» включает любой полипептид, продуцируемый бактериями *Clostridium* (нейротоксины клостридий), который

проникает в нейрон и ингибирует высвобождение нейротрансмиттеров, и такие полипептиды, полученные посредством рекомбинантных технологий или химических способов. Двухцепочечная форма является активной формой токсина. Две цепи названы тяжелой цепью (H-цепью), имеющей молекулярную массу приблизительно 100 кДа, и легкой цепью (L-цепью), имеющей молекулярную массу приблизительно 50 кДа. Предпочтительно, первый и второй нейротоксины представляют собой нейротоксины клостридий.

Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/A представлен как SEQ ID NO: 1 (номер доступа в UniProt A5HZZ9). Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/B представлен как SEQ ID NO: 2 (номер доступа в UniProt B1INP5). Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/C представлен как SEQ ID NO: 3 (номер доступа в UniProt P18640). Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/D представлен как SEQ ID NO: 4 (номер доступа в UniProt P19321). Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/E представлен как SEQ ID NO: 5 (номер доступа в UniProt Q00496). Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/F представлен как SEQ ID NO: 6 (номер доступа в UniProt Q57236). Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина BoNT/G представлен как SEQ ID NO: 7 (номер доступа в UniProt Q60393). Один пример аминокислотной последовательности нейротоксина TeNT представлен как SEQ ID NO: 8 (номер доступа в UniProt P04958). Аминокислотные последовательности указанных нейротоксинов показаны в выравнивании из фигуры 1 ниже, вместе с последовательностями других нейротоксинов (т.е. SEQ ID NO:58-91).

Термин «химерный нейротоксин», как применяют в настоящем описании, обозначает нейротоксин, содержащий домен L_N, происходящий из первого нейротоксина, и домен H_c, происходящий из второго нейротоксина, или состоящий из них.

Термин «домен H_c», как применяют в настоящем описании, обозначает функционально отдельную область тяжелой цепи нейротоксина с молекулярной массой приблизительно 50 кДа,

которая обеспечивает связывание нейротоксина с рецептором, локализованным на поверхности клетки-мишени. Домен H_c состоит из двух структурно отдельных субдоменов, «субдомена H_{cN} » (N-концевой части домена H_c) и «субдомена H_{cC} » (C-концевой части домена H_c), каждый из которых имеет молекулярную массу приблизительно 25 кДа.

Термин «домен LH_N », как применяют в настоящем описании, обозначает нейротоксин, который лишен домена H_c и состоит из домена эндопептидазы («L» или «легкой цепи») и домена, ответственного за транслокацию эндопептидазы в цитоплазму (домена H_N тяжелой цепи).

Ссылка в настоящем описании на «первый аминокислотный остаток спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_c в первом нейротоксине», обозначает N-концевой остаток спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_c .

Ссылка в настоящем описании на «второй аминокислотный остаток спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_c во втором нейротоксине», обозначает аминокислотный остаток, следующий за N-концевым остатком спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_c .

«Спираль Z_{10} » представляет собой тип вторичной структуры, обнаруженной в белках и полипептидах, вместе с α -спиралями, β -листами и обратными витками. Аминокислоты в спирали Z_{10} аранжированы в правовращающую спиральную структуру, где каждый полный оборот состоит из трех остатков и десяти атомов, разделяющих внутримолекулярную водородную связь между ними. Каждая аминокислота соответствует повороту спирали на 120° (т.е., спираль имеет три остатка на виток), и продвижению на $2,0 \text{ \AA}$ (= $0,2 \text{ нм}$) по винтовой оси, и имеет 10 атомов в кольце, сформированном посредством образования водородной связи. Наиболее важно, что группа N-H аминокислоты формирует водородную связь с группой C=O аминокислоты, расположенной раньше на три остатка; это повторяющееся водородное связывание $i+3 \rightarrow i$ определяет спираль Z_{10} . Спираль A Z_{10} является стандартной концепцией в молекулярной биологии, с которой знаком специалист в данной области.

Эта спираль Z_{10} соответствует четырем остаткам, которые формируют фактическую спираль, и двум кэпирующим (или временным) остаткам, по одному на каждом конце этих четырех остатков. Термин «спираль Z_{10} , разделяющая домены LH_N и H_C », как применяют в настоящем описании, состоит из этих 6 остатков.

В ходе проведения структурных анализов и выравниваний последовательности, авторы изобретения идентифицировали спираль Z_{10} , разделяющую домены LH_N и H_C в столбнячном и ботулиническом нейротоксинах. Эта спираль Z_{10} окружена α -спиралью на N-конце (т.е. на C-концевой части домена LH_N) и β -тяжем на C-конце (т.е. на N-концевой части домена H_C). Первый (N-концевой) остаток (кэпирующий или временный остаток) спирали Z_{10} также соответствует C-концевому остатку этой α -спирали.

Спираль Z_{10} , разделяющую домены LH_N и H_C , можно, например, определять по множеству доступных кристаллических структур ботулинических нейротоксинов, например, 3BTA (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3BTA>) и 1EPW (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EPW>) для ботулинических нейротоксинов A1 и B1, соответственно.

Инструменты для моделирования и выравнивания *in silico*, которые доступны публично, также можно использовать для определения локализации спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_C в других нейротоксинах, например, серверы для моделирования гомологии LOOPP (Learning, Observing and Outputting Protein Patterns, <http://loopp.org>), PHYRE (Protein Homology/analogy Recognition Engine, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) и Rosetta (<https://www.rosettacommons.org/>), сервер для наложения белков SuperPose (<http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/>), программа для выравнивания Clustal Omega (<http://www.clustal.org/omega/>), и ряд других инструментов/сервисов, перечисленных в интернет-ресурсах для молекулярных и клеточных биологов (<http://molbiol-tools.ca/>). Авторы изобретения обнаружили, в частности, что область около стыка « H_N/H_{CN} » является структурно высоко

консервативной, что делает ее идеальной областью для наложения различных серотипов.

Например, авторы изобретения использовали следующие способы для определения последовательности этой спирали Z_{10} в других нейротоксинах:

1. Инструмент для моделирования структурной гомологии LOOP (<http://loop.org>) использовали для получения прогнозируемой структуры всех серотипов VoNT и TeNT на основании кристаллической структуры VoNT/A1 (3VTA.pdb);

2. Полученные таким образом файлы структуры (pdb) редактировали для включения только N-конца домена H_{CN} и приблизительно 80 остатков до него (составляющие часть домена H_N), таким образом, сохраняя область « H_N/H_{CN} », которая является структурно высоко консервативной;

3. Сервер для наложения белков SuperPose (<http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/>) использовали для наложения каждого серотипа на структуру 3VTA.pdb;

4. Наложённые файлы pdb проверяли для локализации спирали Z_{10} в начале домена H_C VoNT/A1, и затем идентифицировали соответствующие остатки в другом серотипе.

5. Все последовательности серотипа VoNT выравняли с использованием Clustal Omega для проверки того, что соответствующие остатки были правильными.

Примеры доменов LH_N , H_C и спирали Z_{10} , определенных этим способом, представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Домены LH_N , H_C и спирали Z_{10}

Нейротокс ин	Номер доступа	LH_N	H_C	Спираль Z_{10}	SEQ ID NO (спираль Z_{10})
VoNT/A1	A5HZZ9	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷	14
VoNT/A2	X73423	1-872	873-1296	⁸⁷² NIVNTS ⁸⁷⁷	15
VoNT/A3	DQ185900	1-872	873-1292	⁸⁷² NIVNTS ⁸⁷⁷	16
VoNT/A4	EU341307	1-872	873-1296	⁸⁷² NITNAS ⁸⁷⁷	17
VoNT/A5	EU679004	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷	18
VoNT/A6	FJ981696	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷	19
VoNT/A7	JQ954969	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷	20
VoNT/A8	KM233166	1-872	873-1297	⁸⁷² NITNTS ⁸⁷⁷	21

Нейротокс ин	Номер доступа	LH _N	H _C	Спираль Z ₁₀	SEQ ID NO (спираль Z ₁₀)
BoNT/B1	B1INP5	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴	22
BoNT/B2	AB084152	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴	23
BoNT/B3	EF028400	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴	24
BoNT/B4	EF051570	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴	25
BoNT/B5	EF033130	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ DILNNI ⁸⁶⁴	26
BoNT/B6	AB302852	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴	27
BoNT/B7	JQ354985	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴	28
BoNT/B8	JQ964806	1-859	860-1292	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴	29
BoNT/C1	P18640	1-867	868-1291	⁸⁶⁷ NINDSK ⁸⁷²	30
BoNT/CD	AB200360	1-867	868-1280	⁸⁶⁷ SINDSK ⁸⁷²	31
BoNT/DC	AB745660	1-863	864-1276	⁸⁶³ SINDSK ⁸⁶⁸	32
BoNT/D	P19321	1-863	864-1276	⁸⁶³ SINDSK ⁸⁶⁸	33
BoNT/E1	Q00496	1-846	847-1252	⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹	34
BoNT/E2	EF028404	1-846	847-1252	⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹	35
BoNT/E3	EF028403	1-846	847-1252	⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹	36
BoNT/E4	AB088207	1-846	847-1252	⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹	37
BoNT/E5	AB037711	1-846	847-1251	⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹	38
BoNT/E6	AM695759	1-846	847-1252	⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹	39
BoNT/E7	JN695729	1-846	847-1252	⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹	40
BoNT/E8	JN695730	1-846	847-1252	⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹	41
BoNT/E9	JX424534	1-846	847-1251	⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹	42
BoNT/E10	KF861917	1-846	847-1252	⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹	43
BoNT/E11	KF861875	1-846	847-1252	⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹	44
BoNT/E12	KM370319	1-846	847-1254	⁸⁴⁶ RIKSSS ⁸⁵¹	45
BoNT/F1	Q57236	1-865	866-1278	⁸⁶⁵ KIKDNS ⁸⁷⁰	46
BoNT/F2	GU213209	1-865	866-1280	⁸⁶⁵ KIKDSS ⁸⁷⁰	47
BoNT/F3	GU213227	1-865	866-1279	⁸⁶⁵ KIKDSS ⁸⁷⁰	48
BoNT/F4	GU213214	1-865	866-1277	⁸⁶⁵ KIKDNC ⁸⁷⁰	49
BoNT/F5	GU213211	1-862	863-1277	⁸⁶² KIKDSS ⁸⁶⁷	50
BoNT/F6	M92906	1-864	865-1274	⁸⁶⁴ KIKDSS ⁸⁶⁹	51
BoNT/F7	GU213233	1-856	857-1268	⁸⁵⁶ KIKDSS ⁸⁶¹	52
BoNT/G	Q60393	1-864	865-1297	⁸⁶⁴ NISSNA ⁸⁶⁹	53
BoNT/H	KGO15617	1-860	861-1288	⁸⁶⁰ ELKYNC ⁸⁶⁵	54
TeNT	P04958	1-880	881-1315	⁸⁸⁰ ILKKST ⁸⁸⁵	55

С использованием структурного анализа и выравнивания последовательностей, авторы изобретения обнаружили, что β-тяж

после спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_C , является консервативной структурой во всех ботулинических и столбнячных нейротоксинах и начинается на 8^{-м} остатке, когда начинается с первого остатка спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_C (например, на остатке 879 для BoNT/A1).

В соответствии с альтернативным определением, первый аспект изобретения относится к химерному нейротоксину, содержащему домен LH_N из первого нейротоксина, ковалентно связанный с доменом H_C из второго нейротоксина, где первый и второй нейротоксины являются различными,

где С-концевой аминокислотный остаток домена LH_N соответствует восьмому аминокислотному остатку на N-конце от β -тяжа, локализованной в начале (на N-конце) домена H_C в первом нейротоксине, и

где N-концевой аминокислотный остаток домена H_C соответствует седьмому аминокислотному остатку на N-конце от β -тяжа, локализованной в начале (на N-конце) домена H_C второго нейротоксина.

В соответствии с другим определением, первый аспект изобретения относится к химерному нейротоксину, содержащему домен LH_N из первого нейротоксина, ковалентно связанный с доменом H_C из второго нейротоксина, где первый и второй нейротоксины являются различными,

где С-концевой аминокислотный остаток домена LH_N соответствует С-концевому аминокислотному остатку α -спирали, локализованному на конце (на С-конце) домена LH_N в первом нейротоксине, и

где N-концевой аминокислотный остаток домена H_C соответствует аминокислотному остатку непосредственно на С-конце от С-концевого аминокислотного остатка α -спирали, локализованного на конце (на С-конце) домена LH_N во втором нейротоксине.

Обоснованием для способа дизайна химерных нейротоксинов по изобретению являлась попытка убедиться в том, что вторичная структура не является нарушенной, и таким образом,

минимизировать любые изменения в третичной структуре и функции каждого домена.

В некоторых химерных нейротоксинах из предшествующей области техники, необходим линкер между доменами L_N и N_C (см. таблицу 1), предположительно, для обеспечения приемлемых экспрессии и очистки.

Без намерения быть связанными теорией, выдвинули гипотезу, что придание структуры химерным нейротоксинам в форме белков, имеющих третичную структуру, близко имитирующую третичную структуру природных нейротоксинов, может способствовать их растворимости.

Без намерения быть связанными теорией, кроме того, выдвинули гипотезу, что факт отсутствия нарушения четырех центральных аминокислотных остатков из спирали Z₁₀ в химерном нейротоксине обеспечивает оптимальную конформацию химерного нейротоксина, таким образом, позволяя химерному нейротоксину проявлять свои функции в полной мере.

Фактически, авторы изобретения неожиданно обнаружили, что сохранение только первого аминокислотного остатка из спирали Z₁₀ первого нейротоксина и второго аминокислотного остатка из спирали Z₁₀ спереди от второго нейротоксина не только позволяет получение растворимых и функциональных химерных нейротоксинов, но кроме того, приводит к улучшенным свойствам по сравнению с другими химерными нейротоксинами, в частности, к увеличенной активности, увеличенному коэффициенту безопасности и/или более длительной продолжительности действия.

Нежелательные эффекты нейротоксина (вызванные диффузией нейротоксина из участка введения) можно оценивать экспериментально посредством измерения процента потери массы тела в соответствующей модели на животных (например, на мышах, где потерю массы тела детектируют в пределах семи суток после введения). И наоборот, желательные целевые эффекты нейротоксина можно оценивать экспериментально посредством анализа индекса степени отведения пальца (DAS), показателя паралича мышц. Анализ DAS можно проводить посредством инъекции 20 мкл нейротоксина, составленного в желатиновом фосфатном буфере, в

икроножный/камбаловидный комплекс мыши, с последующей оценкой индекса степени отведения пальца с использованием способа Aoki (Aoki KR, Toxicon 39: 1815-1820; 2001). В анализе DAS, мышей кратковременно подвешивают за хвост для вызова характерного ответа испуга, при котором мышь вытягивает свои задние конечности и отводит пальцы задней конечности. После инъекции нейротоксина, различные степени отведения пальца оценивают в баллах по пятибалльной шкале (от 0=норма до 4=максимальное уменьшение отведения пальца и вытягивания задней конечности).

Затем можно выразить коэффициент безопасности нейротоксина как соотношение между количеством нейротоксина, необходимым для падения массы тела мыши на 10% (измеренного как наивысший эффект в пределах первых семи суток после дозирования у мыши), и количеством нейротоксина, необходимым для показателя DAS 2. Таким образом, высокий коэффициент безопасности является желательным и указывает на нейротоксин, который является способным эффективно парализовать намеченную мышцу с небольшими нежелательными неспецифическими эффектами.

Высокий коэффициент безопасности является особенно преимущественным в терапии, поскольку он представляет увеличение терапевтического индекса. Иными словами, это означает, что можно использовать уменьшенные дозы по сравнению с известными лекарственными средствами на основе токсина клостридий, и/или что можно использовать увеличенные дозы без дополнительных эффектов. Возможность использовать более высокие дозы нейротоксина без дополнительных эффектов является особенно преимущественной, поскольку более высокие дозы обычно приводят к более длительной продолжительности действия нейротоксина.

Активность нейротоксина можно выразить как минимальную дозу нейротоксина, которая приводит к данному показателю DAS при введении в икроножный/камбаловидный комплекс мыши, например, к показателю DAS 2 (доза ED₅₀) или к показателю DAS 4. Активность нейротоксина можно также выразить как дозу EC₅₀ в клеточном анализе, измеряющем расщепление SNARE посредством нейротоксина, например, дозу EC₅₀ в клеточном анализе, измеряющем расщепление SNAP-25 посредством химерного нейротоксина BoNT/AB.

Продолжительность действия нейротоксина можно выразить как время, необходимое для восстановления показателя DAS 0 после введения данной дозы нейротоксина, например, минимальной дозы нейротоксина, приводящей к показателю DAS 4, в икроножный/камбаловидный комплекс мышцы.

В одном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин (BoNT) серотипа А, серотипа В, серотипа С, серотипа D, серотипа Е, серотипа F или серотипа G, или столбнячный нейротоксин (TeNT), и второй нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин (BoNT) серотипа А, серотипа В, серотипа С, серотипа D, серотипа Е, серотипа F или серотипа G, или столбнячный нейротоксин (TeNT). В предпочтительном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин (BoNT) серотипа А, серотипа В или серотипа С, и второй нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин (BoNT) серотипа А, серотипа В или серотипа С.

Различные серотипы BoNT можно различать на основании инактивации посредством специфической нейтрализующей антисыворотки, где такая классификация по серотипу коррелирует с процентом идентичности последовательности на уровне аминокислот. Белки BoNT данного серотипа далее разделяют на различные подтипы на основании процента идентичности аминокислотной последовательности.

Предпочтительно, первый и второй нейротоксины представляют собой ботулинические нейротоксины из различных серотипов. В другом варианте осуществления, либо первый, либо второй нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин, и другой нейротоксин представляет собой столбнячный нейротоксин.

При использовании представления «XY», в соответствии с которым X представляет собой домен L_N, и Y представляет собой домен N_c, следующие химерные нейротоксины представляют собой варианты осуществления настоящего изобретения:

AB, AC, AD, AE, AF, AG, AT_x,
 BA, BC, BD, BE, BF, BG, BT_x,
 CA, CB, CD, CE, CF, CG, CT_x,

DA, DB, DC, DE, DF, DG, DTx,
EA, EB, EC, ED, EF, EG, ETx,
FA, FB, FC, FD, FE, FG, FTx,
GA, GB, GC, GD, GE, GF, GTx,
TxA, TxB, TxC, TxD, TxE, TxF, TxG,

где А, В, С, D, E, F, G и Tx представляют собой, соответственно, ботулинический нейротоксин (BoNT) серотипа А, серотипа В, серотипа С, серотипа D, серотипа E, серотипа F, серотипа G, и столбнячный нейротоксин (TeNT).

Кроме того, при использовании такого же представления «XY», как описано выше, следующие химерные нейротоксины представляют собой предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения:

AB, AC,
BA, BC,
CA, CB,

где А, В, С представляют собой, соответственно, ботулинический нейротоксин (BoNT) серотипа А, серотипа В и серотипа С.

В одном варианте осуществления, домен LN_n из первого нейротоксина соответствует:

- аминокислотным остаткам 1-872 из SEQ ID NO: 1, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 1-859 из SEQ ID NO: 2, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 1-867 из SEQ ID NO: 3, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 1-863 из SEQ ID NO: 4, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 1-846 из SEQ ID NO: 5, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 1-865 из SEQ ID NO: 6, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 1-864 из SEQ ID NO: 7, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними, или

- аминокислотным остаткам 1-880 из SEQ ID NO: 8, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними.

и домен N_c из второго нейротоксина соответствует:

- аминокислотным остаткам 873-1296 из SEQ ID NO: 1, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 860-1291 из SEQ ID NO: 2, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 868-1291 из SEQ ID NO: 3, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 864-1276 из SEQ ID NO: 4, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 847-1251 из SEQ ID NO: 5, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 866-1275 из SEQ ID NO: 6, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними,

- аминокислотным остаткам 865-1297 из SEQ ID NO: 7, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними, или

- аминокислотным остаткам 881-1315 из SEQ ID NO: 8, или полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с ними.

«Процент идентичности последовательностей» между двумя или более последовательностями нуклеиновой кислоты или

аминокислотными последовательностями является функцией количества нуклеотидов/аминокислот в идентичных положениях, разделяемых выровненными последовательностями. Таким образом, % идентичности можно рассчитывать как количество идентичных нуклеотидов/аминокислот в каждом положении, деленное на общее количество нуклеотидов/аминокислот в выровненной последовательности, умноженное на 100. При расчетах % идентичности последовательности можно также принимать во внимание количество пропусков, и длину каждого пропуска, которые необходимо вводить для оптимизации выравнивания двух или более последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя или более последовательностями можно проводить с использованием специфических математических алгоритмов, в частности, математического алгоритма глобального выравнивания (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48(3), 443-453, 1972), такого как BLAST, известного специалисту в данной области.

Первый или второй нейротоксин может представлять собой мозаичный нейротоксин. Термин «мозаичный нейротоксин», как используют в этом контексте, относится к природному нейротоксину клостридий, который содержит по меньшей мере один функциональный домен из другого типа нейротоксинов клостридий (например, нейротоксина клостридий другого серотипа), где указанный нейротоксин клостридий обычно не содержит указанный по меньшей мере один функциональный домен. Примерами мозаичных нейротоксинов являются природные BoNT/DC и BoNT/CD. BoNT/DC содержит L-цепь и домен N_D серотипа D и домен N_C серотипа C, в то время как BoNT/CD состоит из L-цепи и домена N_D серотипа C и домена N_C серотипа D.

Первый и второй нейротоксины могут представлять собой модифицированные нейротоксины и их производные, включая, но без ограничения, нейротоксины, описанные ниже. Модифицированный нейротоксин или его производное может содержать одну или несколько аминокислот, модифицированных по сравнению с нативной (немодифицированной) формой нейротоксина, или может содержать один или несколько вставленных аминокислот, которые не

присутствуют в нативной (unмодифицированной) формой токсина. В качестве примера, модифицированный нейротоксин клостридий может иметь модифицированные аминокислотные последовательности в одном или нескольких доменах относительно нативной (немодифицированной) последовательностью нейротоксина клостридий. Такие модификации могут модифицировать функциональные аспекты нейротоксина, например, биологическую активность или персистенцию. Таким образом, в одном варианте осуществления, первый нейротоксин и/или второй нейротоксин представляет собой модифицированный нейротоксин, или модифицированное производное нейротоксина.

Модифицированный нейротоксин сохраняет по меньшей мере одну из функций нейротоксина, выбранных из способности связываться с низкоаффинным или высокоаффинным рецептором нейротоксина на клетке-мишени, транслоцировать эндопептидазную часть нейротоксина (легкую цепь) в цитоплазму клетки и расщеплять белок SNARE. Предпочтительно, модифицированный нейротоксин сохраняет по меньшей мере две из этих функций. Более предпочтительно, модифицированный нейротоксин сохраняет три эти функции.

Модифицированный нейротоксин может иметь одну или несколько модификаций в аминокислотной последовательности тяжелой цепи (такой как модифицированный домен Н_c), где указанная модифицированная тяжелая цепь связывается с клетками нервов-мишеней с более высокой или более низкой аффинностью, чем нативный (немодифицированный) нейротоксин. Такие модификации в домене Н_c могут включать модификацию остатков в участке связывания ганглиозида домена Н_c или в участке связывания белка (SV2 или синаптотатмина), которые изменяют связывание с рецептором ганглиозида и/или рецептором белка в клетке нерва-мишени. Примеры таких модифицированных нейротоксинов описаны в WO 2006/027207 и WO 2006/114308, полное содержание обоих из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки.

Модифицированный нейротоксин может иметь одну или несколько модификаций в аминокислотной последовательности легкой цепи, например, модификации в связывающем субстрат или каталитическом

доме, которые могут изменять или модифицировать специфичность для белка SNARE модифицированной LC. Примеры таких модифицированных нейротоксинов описаны в WO 2010/120766 и US 2011/0318385, полное содержание обоих из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки.

Модифицированный нейротоксин может содержать одну или несколько модификаций, которые увеличивают или уменьшают биологическую активность и/или биологическую персистенцию модифицированного нейротоксина. Например, модифицированный нейротоксин может содержать мотив на основе лейцина или тирозина, где указанный мотив увеличивает или уменьшает биологическую активность и/или биологическую персистенцию модифицированного нейротоксина. Пригодные мотивы на основе лейцина включают xDxxxLL, xExxxLL, xExxxIL и xExxxLM (где x представляет собой любую аминокислоту). Пригодные мотивы на основе тирозина включают Y-x-x-Hy (где Hy представляет собой гидрофобную аминокислоту). Примеры модифицированных нейротоксинов, включающих мотивы на основе лейцина и тирозина, описаны в WO 2002/08268, полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный BoNT/A, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный BoNT/B, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный BoNT/C, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный VoNT/D, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный VoNT/E, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный VoNT/F, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный VoNT/G, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7.

В одном варианте осуществления, первый или второй нейротоксин представляет собой модифицированный TeNT, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления, второй нейротоксин представляет собой VoNT/B. Такой химерный нейротоксин обозначен в настоящем описании как «нейротоксин VoNT/XB».

В предпочтительном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой VoNT/A, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/B. Такой химерный нейротоксин обозначен в настоящем описании как «нейротоксин VoNT/AB». Более предпочтительно, первый нейротоксин представляет собой VoNT/A1, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/B1. Еще более предпочтительно, домен L_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-872 из VoNT/A1, и домен N_c из второго

нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 860-1291 из VoNT/B1. В одном предпочтительном варианте осуществления, домен LN_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-872 из SEQ ID NO: 1, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 860-1291 из SEQ ID NO: 2. Иными словами, предпочтительный химерный нейротоксин по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13 или состоит из нее.

По сравнению с серотипом VoNT/A, природный VoNT/B является намного менее активным, несмотря на сравнительно большую распространенность его рецептора на синаптических везикулах. Это обусловлено уникальной аминокислотной заменой внутри участка связывания токсина в синаптотагмине II человека (Syt II) по сравнению с Syt II грызунов (крысы/мыши) (Peng, L., et al., J Cell Sci, 125(Pt 13):3233-42 (2012); Rummel, A. et al, FEBS J 278:4506-4515 (2011).13,22. В результате замены этого остатка, Syt II человека имеет сильно уменьшенное связывание с природным VoNT/B, так же как с природным VoNT/D-C и /G. Эти обнаружения обеспечивают объяснение для клинических наблюдений, что намного более высокая доза VoNT/B, чем VoNT/A (который связывает другой рецептор) необходима для достижения таких же уровней терапевтических эффектов у пациентов. В предпочтительном варианте осуществления нейротоксина VoNT/XB или VoNT/AB по изобретению, домен H_C из нейротоксина VoNT/B содержит замену, добавление или делецию по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомene H_{CC}, которые оказывают эффект увеличения аффинности связывания нейротоксина VoNT/B для Syt II человека по сравнению с последовательностью природного VoNT/B.

Пригодные замена, добавление или делеция аминокислотного остатка в субдомene H_{CC} VoNT/B описаны в WO2013/180799 и в PCT/US2016/024211, которая еще не опубликована (содержание обоих приведено в настоящем описании в качестве ссылки).

Пригодные замена, добавление или делеция аминокислотного остатка в субдомene H_{CC} VoNT/B включают мутации замены, выбранные из группы, состоящей из: V1118M; Y1183M; E1191M; E1191I; E1191Q; E1191T; S1199Y; S1199F; S1199L; S1201V; E1191C, E1191V, E1191L,

E1191Y, S1199W, S1199E, S1199H, W1178Y, W1178Q, W1178A, W1178S, Y1183C, Y1183P и их комбинаций.

Пригодные замена, добавление или делеция аминокислотного остатка в субдомене H_{CC} VoNT/V дополнительно включают комбинации из двух мутаций замены, выбранные из группы, состоящей из: E1191M и S1199L, E1191M и S1199Y, E1191M и S1199F, E1191Q и S1199L, E1191Q и S1199Y, E1191Q и S1199F, E1191M и S1199W, E1191M и W1178Q, E1191C и S1199W, E1191C и S1199Y, E1191C и W1178Q, E1191Q и S1199W, E1191V и S1199W, E1191V и S1199Y, или E1191V и W1178Q.

Пригодные замена, добавление или делеция аминокислотного остатка в субдомене H_{CC} VoNT/V также включают комбинацию из трех мутаций, представляющих собой E1191M, S1199W и W1178Q.

В предпочтительном варианте осуществления, пригодные замена, добавление или делеция аминокислотного остатка в субдомене H_{CC} VoNT/V включают комбинацию из двух мутаций, представляющих собой E1191M и S1199Y. Иными словами, предпочтительный химерный нейротоксин по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, или состоит из нее.

В другом предпочтительном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой VoNT/C, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/V. Такой химерный нейротоксин обозначен в настоящем описании как «нейротоксин VoNT/CV». Более предпочтительно, первый нейротоксин представляет собой VoNT/C1, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/V1. Еще более предпочтительно, домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-867 из VoNT/C1, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 860-1291 из VoNT/V1. В одном предпочтительном варианте осуществления, домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-867 из SEQ ID NO: 3, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 860-1291 из SEQ ID NO: 2. В предпочтительном варианте осуществления, домен H_C из нейротоксина VoNT/V содержит замену, добавление или делецию по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомене H_{CC} ,

которые оказывают эффект увеличения аффинности связывания нейротоксина VoNT/B для Syt II человека по сравнению с последовательностью природного VoNT/B. Пригодные замена, добавление или делеция аминокислотного остатка в субдомене H_{CC} VoNT/B являются такими, как описано выше.

В предпочтительном варианте осуществления нейротоксина VoNT/XDC (химерного нейротоксина, в котором второй нейротоксин представляет собой мозаичный VoNT/DC) по изобретению, домен H_C из мозаичного нейротоксина VoNT/DC содержит замену, добавление или делецию по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомене H_{CC}, которые оказывают эффект увеличения аффинности связывания мозаичного нейротоксина VoNT/DC для Syt II человека по сравнению с последовательностью природного мозаичного VoNT/DC.

В предпочтительном варианте осуществления нейротоксина VoNT/XG по изобретению, домен H_C из нейротоксина VoNT/G содержит замену, добавление или делецию по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомене H_{CC}, которые оказывают эффект увеличения аффинности связывания нейротоксина VoNT/G для Syt II человека по сравнению с последовательностью природного VoNT/G.

Другие предпочтительные нейротоксины по изобретению являются следующими.

В предпочтительном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой VoNT/A, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/C. Такой химерный нейротоксин обозначен в настоящем описании как «нейротоксин VoNT/AC». Более предпочтительно, первый нейротоксин представляет собой VoNT/A1, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/C1. Еще более предпочтительно, домен L_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-872 из VoNT/A1, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 868-1291 из VoNT/C1. В одном предпочтительном варианте осуществления, домен L_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-872 из SEQ ID NO: 1, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 868-1291 из SEQ ID NO: 3.

В другом предпочтительном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой VoNT/B, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/A. Такой химерный нейротоксин обозначен в настоящем описании как «нейротоксин VoNT/BA». Более предпочтительно, первый нейротоксин представляет собой VoNT/B1, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/A1. Еще более предпочтительно, домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-859 из VoNT/B1, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 873-1296 из VoNT/A1. В одном предпочтительном варианте осуществления, домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-859 из SEQ ID NO: 2, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 873-1293 из SEQ ID NO: 1.

В другом предпочтительном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой VoNT/B, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/C. Такой химерный нейротоксин обозначен в настоящем описании как «нейротоксин VoNT/BC». Более предпочтительно, первый нейротоксин представляет собой VoNT/B1, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/C1. Еще более предпочтительно, домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-859 из VoNT/B1, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 868-1291 из VoNT/C1. В одном предпочтительном варианте осуществления, домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-859 из SEQ ID NO: 2, и домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 868-1291 из SEQ ID NO: 3. Иными словами, предпочтительный химерный нейротоксин по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или состоит из нее.

В другом предпочтительном варианте осуществления, первый нейротоксин представляет собой VoNT/C, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/A. Такой химерный нейротоксин обозначен в настоящем описании как «нейротоксин VoNT/CA». Более предпочтительно, первый нейротоксин представляет собой VoNT/C1, и второй нейротоксин представляет собой VoNT/A1. Еще более предпочтительно, домен LH_N из первого нейротоксина соответствует

аминокислотным остаткам 1-867 из BoNT/C1, и домен Нс из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 873-1296 из BoNT/A1. В одном предпочтительном варианте осуществления, домен LН_Н из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-867 из SEQ ID NO: 3, и домен Нс из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 873-1296 из SEQ ID NO: 1.

Химерные нейротоксины по настоящему изобретению можно получать с использованием рекомбинантных способов. Таким образом, в одном варианте осуществления, химерный нейротоксин по изобретению представляет собой рекомбинантный химерный нейротоксин. Хорошо понятно, что, в соответствии с этим предпочтительным вариантом осуществления, нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный химерный нейротоксин по изобретению, вектор, содержащий указанную нуклеотидную последовательность, и клетку, содержащую указанный вектор, как дополнительно описано ниже, можно, с учетом соответствующих изменений, обозначать как рекомбинантные.

В другом аспекте изобретение относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный нейротоксин по изобретению, например, последовательности ДНК или РНК. В предпочтительном варианте осуществления, нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность ДНК.

Молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению можно получать с использованием любого пригодного способа, известного в данной области. Таким образом, молекулы нуклеиновой кислоты можно получать с использованием способов химического синтеза. Альтернативно, молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению можно получать с использованием способов молекулярной биологии.

Последовательность ДНК по настоящему изобретению, предпочтительно, разрабатывают *in silico*, и затем синтезируют посредством общепринятых способов синтеза ДНК.

Вышеупомянутую информацию о последовательности нуклеиновой кислоты, необязательно, модифицируют для сдвига кодонного состава в соответствии с конечной системой экспрессии в клетке-хозяине (например, *E. coli*), подлежащей использованию.

В другом аспекте изобретение относится к вектору, содержащему нуклеотидную последовательность по изобретению. В одном варианте осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты получают в качестве части ДНК-вектора, содержащего промотор и терминатор. В предпочтительном варианте осуществления, вектор имеет промотор, выбранный из Tac, AraBAD, T7-Lac или T5-Lac.

Вектор может являться пригодным для экспрессии *in vitro* и/или *in vivo* вышеупомянутой последовательности нуклеиновой кислоты. Вектор может представлять собой вектор для временной и/или стабильной экспрессии гена. Вектор может, кроме того, содержать регуляторные элементы и/или селективные маркеры. Указанный вектор может иметь вирусное происхождение, фаговое происхождение или бактериальное происхождение. Например, указанный экспрессирующий вектор может представлять собой вектор pET, pJ401, pGEX или его производное.

В другом аспекте изобретение относится к клетке, содержащей нуклеотидную последовательность или вектор по изобретению. Термин «клетка» в настоящем описании можно использовать взаимозаменяемо с термином «клетка-хозяин» или «линия клеток». Пригодный тип клеток включает прокариотические клетки, например, *E. coli*, и эукариотические клетки, такие как клетки дрожжи, клетки млекопитающих, клетки насекомых и т.д. Предпочтительно, клетка представляет собой *E. coli*.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения химерного нейротоксина по изобретению, включающему стадию культивирования клетки, как описано выше, в условиях, в которых продуцируется химерный нейротоксин. Указанные условия хорошо известны специалисту-практику в данной области, и таким образом, нет необходимости дополнительно подробно объяснять их в настоящем описании. Предпочтительно, указанный способ дополнительно включает стадию выделения химерного нейротоксина из культуры.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей химерный нейротоксин по изобретению. Предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит химерный

нейротоксин вместе по меньшей мере с одним компонентом, выбранным из фармацевтически приемлемых носителя, наполнителя, адъюванта, пропеллента и/или соли.

В другом аспекте изобретение относится к химерному нейротоксину или фармацевтической композиции по изобретению для использования в терапии. Более точно, изобретение относится к использованию химерного нейротоксина или фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании, для изготовления лекарственного средства. Иными словами, изобретение относится к способу для лечения нуждающегося в этом субъекта, включающему стадию введения эффективного количества химерного нейротоксина или фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании, указанному субъекту. Под «эффективным количеством» понимают, что химерный нейротоксин или фармацевтическую композицию вводят в количестве, достаточном для обеспечения эффекта, для которой она предназначена. Как применяют в настоящем описании, термин «субъект» предпочтительно относится к человеку или животному, более предпочтительно, к человеку.

Химерный нейротоксин по изобретению, предпочтительно, является пригодным для использования в лечении состояния, ассоциированного с нежелательной нейрональной активностью, у нуждающегося в этом субъекта, например, состояния, выбранного из группы, состоящей из спастической дисфонии, спастической кривошеи, дистонии мышц гортани, оромандибулярной дисфонии, лингвальной дистонии, цервикальной дистонии, фокальной дистонии рук, блефароспазма, страбизма, гемифациального спазма, нарушения века, церебрального паралича, фокальной спастичности и других нарушений голоса, спастического колита, нейрогенного мочевого пузыря, анизмуса, спастичности конечностей, тиков, треморов, бруксизма, анальной трещины, ахалазии, дисфагии и других нарушений мышечного тонуса, и других нарушений, характеризующихся произвольными движениями групп мышц, слезотечения, гипергидроза, повышенного слюноотделения, избыточной секреции в желудочно-кишечном тракте, нарушений секреции, боли из-за мышечных спазмов, головной боли, мигрени и дерматологических состояний. Более точно, изобретение относится

к использованию химерного нейротоксина или фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании, для изготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения состояния, ассоциированного с нежелательной нейрональной активностью, как описано выше. Иными словами, изобретение относится к способу лечения состояния, ассоциированного с нежелательной нейрональной активностью, как описано выше, у нуждающегося в этом субъекта, где указанный способ содержит стадию введения эффективного количества химерного нейротоксина или фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании, указанному субъекту.

В другом аспекте изобретение относится к нетерапевтическому использованию химерного нейротоксина по изобретению для лечения эстетического или косметического состояния, у нуждающегося в этом субъекта. Иными словами, изобретение относится к способу лечения эстетического или косметического состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающему стадию введения эффективного количества химерного нейротоксина или фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании, указанному субъекту. В соответствии с этим аспектом изобретения, субъект, подлежащий лечению, предпочтительно, не страдает от состояния, ассоциированного с нежелательной нейрональной активностью, как описано выше. Более предпочтительно, указанный субъект представляет собой здорового субъекта, т.е. субъекта, не страдающего никаким заболеванием.

В другом аспекте изобретение относится к набору для использования в терапевтическом или нетерапевтическом (косметическом или эстетическом) способе, или для терапевтического или нетерапевтического (косметического или эстетического) применения, как описано выше, где указанный набор содержит фармацевтическую композицию по изобретению и инструкции для осуществления указанного способа или применения. Более точно, изобретение относится к набору, содержащему фармацевтическую композицию по изобретению и инструкции для терапевтического или косметического введения указанной композиции нуждающемуся в этом субъекту. Как применяют в

настоящем описании, термин «инструкции» относится к публикации, записи, диаграмме, или любой другой среде выражения, которую можно использовать для разъяснения того, как осуществлять способ или применение по изобретению, такие как терапевтическое или косметическое введение указанной композиции нуждающемуся в этом субъекту. Указанные инструкции могут, например, быть прикреплены к контейнеру, содержащему указанную композицию или указанный набор.

Сконструированные химерные нейротоксины по настоящему изобретению можно составлять для перорального, парентерального введения, непрерывной инфузии, ингаляции или местного введения. Композиции, пригодные для инъекции, могут находиться в форме растворов, суспензий или эмульсий, или сухих порошков, которые растворяют или суспендируют в пригодном носителе перед использованием.

В случае химерного нейротоксина, подлежащего местной доставке, химерный нейротоксин можно составлять в форме крема (например, для местного введения), или для подкожной инъекции.

Средства для местной доставки могут включать аэрозоль или другой спрей (например, распылитель). В этом отношении, аэрозольный состав химерного нейротоксина позволяет доставку в легкие и/или другие носовые, и/или бронхиальные, или воздушные пути.

Химерные нейротоксины по изобретению можно вводить пациенту посредством интратекальной или эпидуральной инъекции в позвоночный столб на уровне участка спинного мозга, вовлеченного в иннервацию пораженного органа.

Предпочтительным способом введения является введение посредством лапароскопической и/или локализованной, в частности, внутримышечной, инъекции.

Диапазоны доз для введения химерных нейротоксинов по настоящему изобретению являются такими, чтобы оказывать желательный терапевтический эффект. Следует понимать, что этот необходимый диапазон доз зависит от конкретного типа химерного нейротоксина или композиции, способа введения, типа состава, возраста пациента, характера, степени или тяжести состояния

пациента, противопоказаний, если они существуют, и суждения лечащего врача. Изменения этих уровней дозирования можно уточнять с использованием стандартных эмпирических способов оптимизации.

Жидкие лекарственные формы, как правило, получают с использованием химерного нейротоксина и апирогенного стерильного носителя. Сконструированный токсин клостридий, в зависимости от используемых носителя и концентрации, можно либо растворять, либо суспендировать в носителе. При получении растворов химерный нейротоксин можно растворять в носителе, где раствор делают изотоническим, при необходимости, посредством добавления хлорида натрия и стерилизуют посредством фильтрации через стерильный фильтр с использованием асептических способов перед заполнением и герметичным закрытием подходящих стерильных флаконов или ампул. Альтернативно, если стабильность раствора является соответствующей, раствор в герметично закрытых контейнерах можно стерилизовать посредством автоклавирования. Обеспечивающие преимущество добавки, такие как забуферивающие, солюбилизующие, стабилизирующие средства, консерванты или бактерицидные, суспендирующие или эмульгирующие средства, и/или местные анестетики, можно растворять в носителе.

Сухие порошки, которые растворяют или суспендируют в подходящем носителе перед использованием, можно получать посредством заполнения предварительно простерилизованными ингредиентами стерильного контейнера с использованием асептического способа в стерильном пространстве. Альтернативно, ингредиенты можно растворять в подходящих контейнерах с использованием асептического способа в стерильном пространстве. Затем продукт лиофилизируют, и контейнеры асептически герметизируют.

Парентеральные суспензии, подходящие для внутримышечной, подкожной или внутрикожной инъекции, получают по существу таким же способом, за исключением того, что стерильные компоненты суспендируют в стерильном носителе, вместо растворения, и стерилизацию невозможно осуществлять посредством фильтрации. Компоненты можно изолировать в стерильном состоянии или,

альтернативно, их можно стерилизовать после изоляции, например, посредством гамма-излучения.

При введении в соответствии с настоящим изобретением можно получать преимущество множества способов доставки, включая инкапсуляцию в микрочастицы, вирусные системы доставки или воздействие аэрозоля под высоким давлением.

Это описание не является ограниченным иллюстративными способами и материалами, описанными в настоящем описании, и любые способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в настоящем описании, можно использовать для практического осуществления или тестирования вариантов осуществления этого описания. Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иначе, любые последовательности нуклеиновой кислоты записаны слева направо в ориентации от 5' до 3'; аминокислотные последовательности кислоты записаны слева направо в ориентации от амино-конца до карбокси-конца, соответственно.

Когда представлен диапазон значений, понятно, что каждое промежуточное значение, до десятых единицы нижнего предела, если контекст явно не требует иного, между верхним и нижним пределами этого диапазона, также конкретно описано. Каждый меньший диапазон между любым указанным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любое другое указанное или промежуточное значение в этом указанном диапазоне включены в это описание. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов можно независимо включать или исключать из диапазона, и каждый диапазон, в котором любой, никакой или оба предела включены в меньшие диапазоны, также включены в это описание, с учетом любого конкретно исключенного предела в указанном диапазоне. Когда указанный диапазон включает один или оба из пределов, диапазоны, исключающие любой один или оба из этих включенных пределов, также включены в это описание.

Следует отметить что, как применяют в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения, неконкретизированные и конкретизированные формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не требует иного. Таким

образом, например, ссылка на «нейротоксин клостридий» включает множество таких средств-кандидатов, и ссылка на «нейротоксин клостридий» включает ссылку на один или несколько нейротоксинов клостридий и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и т.д.

Изобретение в настоящее время описано, только в качестве примера, применительно к следующим фигурам и примерам.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1 - Выравнивание последовательностей VoNT/A1-8, /B1-8, /C, /D, /E1-12, /F1-7, /G, /«H» и TeNT с использованием инструмента для выравнивания множества последовательностей CLUSTAL Omega (1.2.1). Локализация предположительной спирали Z_{10} , разделяющей домены LH_N и H_C , показана жирным и подчеркнутым шрифтом.

Фигура 2 - SDS PAGE очищенных рекомбинантных химер 1, 2 и 3A VoNT/AB (SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно). Дорожки помечены «Маркер» (маркер молекулярной массы), «-DTT» (окисленный образец химеры VoNT/AB) и «+DTT» (восстановленный образец химеры VoNT/AB).

Фигура 3 - Расщепление SNAP-25 в нейронах спинного мозга крысы посредством рекомбинантных химер 1, 2 и 3A VoNT/AB (SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно). Культивированные первичные нейроны спинного мозга крысы (SCN) подвергали воздействию различных концентраций рекомбинантных химер 1, 2 или 3A VoNT/AB в течение 24 часов, при 37°C в увлажненной атмосфере с 10% CO₂. Затем клетки лизировали с использованием буфера 1x NuPAGE, дополненного DTT и бензоназой. Образцы переносили в пробирки для микроцентрифугирования, нагревали в течение 5 мин при 90°C в термоблоке и хранили при -20°C до анализа расщепления SNAP-25 посредством вестерн-блоттинга. SNAP-25 детектировали с использованием поликлональных антител, которые детектируют как полноразмерную, так и расщепленные формы SNAP-25 (Sigma #S9684). Антитело против антител кролика с HRP (Sigma #A6154) использовали в качестве вторичного антитела.

Фигура 4 - Анализ индекса степени отведения пальца у мышей. Мышам вводили инъекцию, в комплекс икроножной-камбаловидной мышц одной задней конечности, под кратковременной общей анестезией; ослабление мышц измеряли по шкале 0-4 с использованием индекса степени отведения пальца (DAS). Максимальные значения DAS определяли для каждой дозы и наносили на график в зависимости от дозы, и данные приводили в соответствие с 4-параметрическим логистическим уравнением, определяли значения ED50 и дозы, приводящие к DAS 4 (доза для DAS 4).

Фигура 5 - SDS PAGE очищенных рекомбинантных химер 3В и 3С ВоNT/AB (SEQ ID NO: 12 и 13, соответственно). Дорожки помечены «Маркер» (маркер молекулярной массы), «-DTT» (окисленный образец химеры ВоNT/AB) и «+DTT» (восстановленный образец химеры ВоNT/AB).

Фигура 6 - Расщепление SNAP-25 посредством рекомбинантных химер 3В и 3С ВоNT/A и ВоNT/AB (SEQ ID NO: 1, 12 и 13, соответственно) в периферических нейронах, происходящих из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (PERI.4U - AxioGenesis, Germany). Клетки PERI.4U подвергали воздействию различных концентраций рекомбинантного ВоNT/A, или химер 3В или 3С ВоNT/AB в течение 24 часов, при 37°C в атмосфере увлажненного CO₂, содержащей 5% CO₂. Затем клетки лизировали с использованием буфера 1x NuPAGE, дополненного DTT и бензоназой. Образцы переносили в пробирки для микроцентрифугирования, нагревали в течение 5 мин при 90°C в термоблоке и хранили при -20°C, до анализа расщепления SNAP-25 посредством вестерн-блоттинга. SNAP-25 детектировали с использованием поликлональных антител, которые детектируют как полноразмерную, так и расщепленные формы SNAP-25 (Sigma #S9684). Антитело против антител кролика с HRP (Sigma #A6154) использовали в качестве вторичного антитела.

Фигура 7 - Длительность ослабления мышц с течением времени в анализе индекса степени отведения пальца у мышей. Мышам вводили инъекцию, в комплекс икроножной-камбаловидной мышц одной задней конечности, под кратковременной общей анестезией; ослабление мышц измеряли по шкале 0-4 с использованием индекса

степени отведения пальца (DAS). Животных из группы, подвергнутой инъекции самой низкой дозы, которая индуцировала в течение первых четырех суток после инъекции DAS 4, мониторировали до полного восстановления ослабления мышц до DAS 0 (отсутствие наблюдаемого ослабления мышц).

Фигура 8 - SDS PAGE очищенного рекомбинантного VoNT/BC (SEQ ID NO: 56). Дорожки помечены «Маркер» (маркер молекулярной массы), «-DTT» (окисленный образец химеры VoNT/BC) и «+DTT» (восстановленный образец химеры VoNT/BC).

Фигура 9 - Расщепление VAMP-2 посредством нативных химер VoNT/B, VoNT/BC и неактивного рекомбинантного VoNT/B (SEQ ID NO: 2, 56 и 57, соответственно) в кортикальных нейронах крысы. Клетки подвергали воздействию различных концентраций VoNT в течение 24 часов, при 37°C в атмосфере увлажненного CO₂, содержащей 5% CO₂. Клетки лизировали с использованием буфера 1x NuPAGE, дополненного DTT и бензоназой, и нагревали в течение 5 мин при 90°C перед хранением при -20°C. Образцы анализировали по расщеплению VAMP-2 посредством вестерн-блоттинга с использованием первичного антитела - поликлональных антител кролика против VAMP-2 (Abscam ab3347, 1:1000), и конъюгированного с HRP вторичного антитела против антител кролика (Sigma #A6154).

Фигура 10 - Расщепление пептидного репортера VAMP-2 посредством нативных химер VoNT/B и VoNT/BC (SEQ ID NO: 2 и 56, соответственно) с использованием набора VoTest® (BioSentinel). Различные концентрации VoNT инкубировали при 30°C в течение 18 часов с пептидом VAMP-2 с парой CFP-YFP для FRET в качестве репортера, и соотношение нерасщепленного:расщепленного репортерного субстрата измеряли как потерю интенсивности флуоресценции YFP при 528 нм и прибавление флуоресценции CFP при 485 нм после возбуждения при 440 нм.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры служат для иллюстрации конкретных вариантов осуществления изобретения и не ограничивают объем изобретения, определенный в формуле изобретения, никаким образом.

Пример 1 - Картирование спирали Z₁₀ в нейротоксинах клостридий

Аминокислотные последовательности всех серотипов VoNT и TeNT получали из публичной базы данных (например, www.uniprot.org или <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и затем строили модели в известной кристаллической структуре VoNT/A1 (3VTA.pdb) с использованием www.loopp.org. Это привело к получению прогнозируемой белковой структуры, которую редактировали для сохранения только N-концевой части домена H_{CN} и ~80 остатков перед ней (C-концевой части домена H_N) –этот домен («H_N/H_{CN}») является структурно высоко консервативным, что, таким образом, делает его наилучшей областью для наложения различных серотипов. Каждую отредактированную структуру затем накладывали на 3VTA.pdb с использованием <http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/>, и затем идентифицировали остатки, соответствующие явной спирали Z₁₀ в начале H_C из VoNT/A1 (⁸⁷²NIINTS⁸⁷⁶), и соответствующие остатки в другом серотипе. Это подвергали перекрестной проверке с использованием выравнивания последовательностей всех серотипов VoNT с использованием Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) (Фигура 1).

Посредством идентификации этой области эквивалентности структуры между различными нейротоксинами, стало возможным идентифицировать специфическую точку, в которой C-концевая половина одного нейротоксина может переходить в N-концевую половину другого нейротоксина без прерывания вторичной структуры общей молекулы. Эту точку выбрали в качестве старта спирали Z₁₀.

Результаты представлены в таблице 2 выше.

Пример 2 - Клонирование, экспрессия и очистка химер VoNT/AB

Химерные конструкции VoNT/AB 1, 2, 3A, 3B и 3C (SEQ ID NO: 9–13) конструировали из ДНК, кодирующей молекулу исходного серотипа, и соответствующих олигонуклеотидов с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Затем их клонировали в экспрессирующий вектор pJ401 в присутствии или в отсутствие C-концевой His₁₀-метки и трансформировали в клетки *E. coli* BLR

(DE3) для сверхэкспрессии. Эти клетки выращивали при 37°C и встряхивании при 225 об./мин в 2 л конических колбах с отражателями, содержащих 1 л модифицированной среды Terrific Broth (mTB), дополненной соответствующим антибиотиком. Когда A_{600} достигала $>0,5$, температуру в инкубаторе уменьшали до 16°C, и затем проводили индукцию с использованием 1 mM IPTG через один час в течение 20 час при встряхивании при 225 об./мин, для экспрессии рекомбинантной конструкции VoNT/AB.

Собранные клетки лизировали посредством обработки ультразвуком и осветляли посредством центрифугирования при 4500 об./мин в течение 1 час при 4°C. Затем рекомбинантные химерные молекулы VoNT/AB выделяли в сульфате аммония и очищали стандартными способами быстрой жидкостной хроматографии белка (FPLC). Они включали использование смолы для гидрофобного взаимодействия для связывания и анионообменной смолы для стадии промежуточной очистки. Затем частично очищенные молекулы протеолитически расщепляли эндопротеазой Lys-C для получения активной двухцепочечной формы. Ее дополнительно очищали с использованием второй смолы для гидрофобного взаимодействия для получения конечной химеры VoNT/AB.

Для химерных молекул VoNT/AB с декагистиридиновой меткой (H₁₀) (химеры 1, 2, 3A), стадия связывания включала использование смолы с иммобилизованным никелем вместо смолы для гидрофобного взаимодействия.

Последовательность каждой химеры представлена в таблице 3.

Таблица 3 - химерные конструкции VoNT/AB

Молекула	SEQ ID NO	Последовательность
Химера 1	9	A1:1-871+B1:858-1291 (E1191M/S1199Y)+His ₁₀ -метка
Химера 2	10	A1:1-874+ELGGGGSEL+B1:858-1291 (E1191M/S1199Y)+His ₁₀ -метка
Химера 3A	11	A1:1-872+B1: 860-1291 (E1191M/S1199Y)+His ₁₀ -метка

Молекула	SEQ ID NO	Последовательность
Химера 3В	12	A1:1-872+B1: 860-1291 (E1191M/S1199Y)
Химера 3С	13	A1:1-872+B1: 860-1291

Пример 3 - Сравнение химер ВоNT/AB 1, 2 и 3А

Химеры ВоNT/AB 1, 2 и 3А, имеющие С-концевую His₁₀-метку и двойную мутацию E1191M/S1199Y, очищали, как описано в примере 1 (фиг. 2) и тестировали по функциональной активности.

АНАЛИЗ РАСЩЕПЛЕНИЯ SNAP-25 В НЕЙРОНАХ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ

Первичные культуры нейронов спинного мозга крысы (SCN) получали и выращивали в течение 3 недель, в 96-луночных культуральных планшетах (как описано в: Masuyer *et al.*, 2011, *J. Struct. Biol.* Structure and activity of a functional derivative of Clostridium botulinum neurotoxin B; и в: Chaddock *et al.*, 2002, *Protein Expr. Purif.* Expression and purification of catalytically active, non-toxic endopeptidase derivatives of Clostridium botulinum toxin type A). Серийные разведения ВоNT/AB получали в питательной среде SCN. Среду для выращивания из лунок, подлежащих обработке, собирали и фильтровали (фильтр 0,2 мкм). 125 мкл фильтрованной среды добавляли обратно в каждую тестируемую лунку. Затем 125 мкл разведенного токсина добавляли в планшет (в трех повторах лунок). Обработанные клетки инкубировали при 37°C, 10% CO₂, в течение 24±1 час).

Анализ активности ВоNT с использованием анализа расщепления SNAP-25

После обработки, ВоNT удаляли, и клетки промывали один раз PBS (Gibco, UK). Клетки лизировали в 1x буфере NuPAGE для лизиса (Life Technologies), дополненном 0,1 М дитиотреитола (DTT) и 250 единиц/мл бензоназы (Sigma). Лизат белков разделяли посредством SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозные мембраны. Мембраны анализировали с использованием в качестве зонда первичного антитела, специфического для SNAP-25 (Sigma #S9684), которое узнает нерасщепленный SNAP-25, так же как SNAP-25, расщепленный эндопептидазой ВоNT/A. Использованное вторичное антитело представляло собой конъюгированное с HRP антитело против IgG кролика (Sigma #A6154). Полосы детектировали с использованием

усиленной хемилюминесценции и визуализировали с использованием pXi6 Access (Synoptics, UK). Интенсивность полос определяли с использованием программного обеспечения GeneTools (Syngene, Cambridge, UK), и рассчитывали процент SNAP-25, расщепленного при каждой концентрации BoNT. Данные приводили в соответствие с 4-параметрическим логистическим уравнением, и pEC_{50} рассчитывали с использованием GraphPad Prism версии 6 (GraphPad).

В таблице 4 ниже представлены значения pEC_{50} , определенные для химер 1, 2 и 3А в анализе расщепления SNAP-25 в SCN крысы. Эти результаты показывают, что эти три химеры BoNT/AB сохраняли способность проникать в нейроны спинного мозга крысы и расщеплять свой субстрат-мишень. Однако, химера 3А являлась более активной, чем химеры 1 и 2, в этом анализе (см. также фигуру 3).

Таблица 4

	$pEC_{50} \pm SEM$
Химера 1	12,42 \pm 0,04
Химера 2	12,57 \pm 0,01
Химера 3А	12,89 \pm 0,04

АНАЛИЗ ИНДЕКСА СТЕПЕНИ ОТВЕДЕНИЯ ПАЛЬЦА (DAS)

Способ измерения активности химер 1, 2 и 3А BoNT/AB в анализе DAS основан на распространяющемся на пальцы задней конечности рефлексе ответа на испуг мышей, при кратковременном подвешивании за хвост. Этот рефлекс оценивают в баллах как индекс степени отведения пальца (DAS) и подавляют после введения BoNT в икроножную-камбаловидную мышцы задней лапы. Мышей кратковременно подвешивают за хвост для вызова характерного ответа испуга, при котором животное вытягивает свои задние конечности и отводит пальцы задней конечности. (Aoki et al. 1999, Eur. J. Neurol.; 6 (suppl. 4) S3-S10)

На сутки инъекции, мышей подвергали анестезии в индукционной камере, в которую вводили 3% изофлуран в кислороде. Каждой мышке вводили внутримышечную инъекцию химеры BoNT/AB или

носителя (фосфатного буфера, содержащего 0,2% желатин) в икроножную-камбаловидную мышцу правой задней лапы.

После инъекции нейротоксина, различные степени отведения пальца оценивали в баллах по шкале от нуля до четырех, где 0=норма, и 4=максимальное уменьшение отведения пальца и вытягивания задней конечности. ED50 определяли посредством нелинейного корректирующего анализа с использованием среднего для максимального эффекта при каждой дозе. Используемая математическая модель представляла собой 4-параметрическую логистическую модель.

DAS проводили каждые 2 часа в течение первых суток после дозирования; затем его проводили 3 раза в сутки в течение 4 суток.

На фигуре 4 показаны подобранные кривые для химер 1, 2 и 3А (SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно). Кривая для химеры 3А сдвинута влево, что означает, что при более низких дозах химеры 3А достигали сходного ответа DAS по сравнению с химерами 1 и 2, таким образом, показывая, что химера 3А является более активной, чем другие, в анализе DAS у мышей; см. также таблицу ниже (таблицу 5), в которой представлены значения для рассчитанных ED50 и дозы, приводящей к DAS 4 (наивысшему баллу), для каждой химеры.

В таблице 5 ниже представлены ED₅₀ и дозы для DAS 4, определенные для рекомбинантного BoNT/A1 (rBoNT/A1) и химер 1, 2 и 3А в анализе DAS у мышей. Эти результаты показывают, что из этих трех химер, химера 3А имеет наивысшую активность *in vivo* в индукции мышечной слабости. Исследования, показанные на фигуре 4 и в таблице 5, проводили на мышах, полученных из Charles River laboratories.

Таблица 5

	ED ₅₀ (пг/мышь)	Доза для DAS 4 (пг/мышь)
rBoNT/A1	1	5
Химера 1	23	200
Химера 2	89	>300
Химера 3А	18	133

Пример 4 - Сравнение химер 3В, 3С BoNT/АВ и BoNT/А1

Не содержащие метки химеры 3В и 3С VoNT/AB, соответственно, в присутствии и в отсутствие двойной мутации E1191M/S1199Y (SEQ ID NO: 12 и 13) очищали, как описано в примере 1 (фиг. 5), и тестировали по функциональной активности с использованием рекомбинантного VoNT/A1 (SEQ ID NO: 1) в качестве эталона.

АНАЛИЗ РАСЩЕПЛЕНИЯ SNAP-25 В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Криоконсервированные клетки PERI.4U закупили из AxioGenesis (Cologne, Germany). Размораживание и посев клеток проводили, как рекомендовано производителем. Кратко, криоампулы, содержащие клетки, размораживали в водяной бане при 37°C в течение 2 минут. После осторожного ресуспендирования клетки переносили в 50 мл пробирку. Криоампулы промывали с использованием 1 мл среды для размораживания Peri.4U®, поставляемой производителем, и среду переносили по каплям в суспензию клеток в 50 мл пробирке, перед добавлением дополнительных 2 мл среды для размораживания Peri.4U® по каплям в 50 мл пробирку. Затем клетки подсчитывали с использованием гемоцитометра. После этого, дополнительные 6 мл среды для размораживания Peri.4U® добавляли в суспензию клеток. Осадок клеток получали посредством центрифугирования при 260 x g (например, 1100 об./мин) в течение 6 минут при комнатной температуре. Затем клетки ресуспендировали в полной культуральной среде Peri.4U®, поставляемой производителем. Клетки рассеивали с плотностью 50000–150000 клеток на см² в культуральные планшеты, покрытые поли-L-орнитином и ламинином. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере увлажненного CO₂, и среду полностью меняли каждые 2–3 суток в ходе культивирования.

Для обработки токсином, получали серийные разведения VoNTs в культуральной среде Peri.4U®. Среду из лунок, подлежащих обработке, собирали и фильтровали (0,2 мкм фильтр). 125 мкл фильтрованной среды добавляли обратно в каждую лунку. Затем в планшет добавляли 125 мкл разведенного токсина (в трех повторах лунок). Обработанные клетки инкубировали при 37°C, 10% CO₂, в течение 48±1 час).

Анализ активности VoNT с использованием анализа расщепления SNAP-25

После обработки, VoNT удаляли, и клетки промывали один раз PBS (Gibco, UK). Клетки лизировали в 1x буфере NuPAGE для лизиса (Life Technologies), дополненном 0,1 М дитиотреитола (DTT) и 250 единиц/мл бензоназы (Sigma). Лизат белков разделяли посредством SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозные мембраны. Мембраны анализировали с использованием в качестве зонда первичного антитела, специфического для SNAP-25 (Sigma #S9684), которое узнает нерасщепленный SNAP-25, так же как SNAP-25, расщепленный эндопептидазой VoNT/A. Использованное вторичное антитело представляло собой конъюгированное с HRP антитело против IgG кролика (Sigma #A6154). Полосы детектировали с использованием усиленной хемилюминесценции и визуализировали с использованием pXi6 Access (Synoptics, UK). Интенсивность полос определяли с использованием программного обеспечения GeneTools (Syngene, Cambridge, UK), и рассчитывали процент SNAP-25, расщепленного при каждой концентрации VoNT. Данные приводили в соответствие с 4-параметрическим логистическим уравнением, и pEC_{50} рассчитывали с использованием GraphPad Prism версии 6 (GraphPad).

На фигуре 6 показано, что химеры 3B и 3C имеют более высокую активность, чем rVoNT/A1, в расщеплении SNAP-25 в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека, однако, для первой из них это значимо больше. Это можно объяснить двойной мутацией, которая увеличивает аффинность химеры 3B для рецептора белка синаптотатмина II человека, присутствующего на этих клетках (фиг. 6, таблица 6).

Таблица 6

	$pEC_{50} \pm SEM$
rVoNT/A1	10,21±0,05
Химера 3B	12,38±0,06
Химера 3C	10,72±0,08

Способ измерения активности VoNT в анализе DAS основан на распространяющемся на пальцы задней конечности рефлексе ответа на испуг мышей, при кратковременном подвешивании за хвост. Этот рефлекс оценивают в баллах как индекс степени отведения пальца (DAS) и подавляют после введения VoNT в икроножную-камбаловидную мышцы задней лапы. Мышей кратковременно подвешивают за хвост для вызова характерного ответа испуга, при котором животное вытягивает свои задние конечности и отводит пальцы задней конечности. (Aoki et al. 1999, Eur. J. Neurol.; 6 (suppl. 4) S3-S10)

На сутки инъекции, мышей подвергали анестезии в индукционной камере, в которую вводили 3% изофлуран в кислороде. Каждой мышце вводили внутримышечную инъекцию химеры VoNT или носителя (фосфатного буфера, содержащего 0,2% желатин) в икроножную-камбаловидную мышцы правой задней лапы.

После инъекции нейротоксина, различные степени отведения пальца оценивали в баллах по шкале от нуля до четырех, где 0=норма, и 4=максимальное уменьшение отведения пальца и вытягивания задней конечности. ED50 определяли посредством нелинейного корректирующего анализа с использованием среднего для максимального эффекта при каждой дозе. Используемая математическая модель представляла собой 4-параметрическую логистическую модель.

DAS проводили каждые 2 часа в течение первых суток после дозирования; затем его проводили 3 раза в сутки в течение 4 суток для всех доз. Животных из групп, подвергнутых инъекции носителя и самой низкой дозы, которая индуцировала в течение первых четырех суток после инъекции DAS 4, мониторировали затем до полного восстановления ослабления мышц до DAS 0 (отсутствие наблюдаемого ослабления мышц).

Для расчета коэффициента безопасности всех животных взвешивали за сутки до инъекции токсина (D0) и затем один раз в сутки на протяжении исследования. Среднюю массу тела, ее стандартное отклонение и стандартную ошибку среднего рассчитывали ежесуточно для каждой группы дозирования. Для

получения коэффициента безопасности для VoNT ($-10\% \Delta BW / ED_{50}$), дозу, при которой в любое время на протяжении исследования средняя масса тела в группе дозирования была ниже на 10%, чем средняя массы тела на D0 для той же самой группы дозирования, делили на ED_{50} для исследованного VoNT. Летальную дозу определяли как дозу, при которой одно или несколько животных в этой группе дозирования умирали.

На фигуре 7 показана длительность ослабления мышц с течением времени в анализе индекса степени отведения пальца у мышей для rVoNT/A1, химеры 3B и химеры 3C (SEQ ID NO: 1, 12 и 13), показывающая, что химера имеет более продолжительную длительность действия.

В таблице 7 ниже представлены дозы ED_{50} и DAS 4, определенные для rVoNT/A1 и химер 3B и 3C в анализе DAS у мышей. В таблице представлена также общая длительность действия дозы DAS 4 до полного восстановления ослабления мышц до DAS 0 (отсутствие наблюдаемого ослабления мышц). Кроме того, в таблице показана летальная доза и коэффициент безопасности ($-10\% \Delta BW / ED_{50}$) для мышей, как определено в тексте выше. По сравнению с rVoNT/A1, химеры 3B и 3C имеют более продолжительную длительность действия, лучший коэффициент безопасности и более высокую летальную дозу. Исследования, показанные на фигуре 7 и в таблице 7, проводили на мышах, полученных из Janvier laboratories.

Таблица 7

	Доза ED_{50} (DAS 2) (пг/мышь)	Доза DAS 4 (пг/мышь)	Общая длительность действия (сутки) для самой низкой дозы DAS 4	Летальная доза для мышей (пг)	Коэффициент безопасности ($-10\% \Delta BW / ED_{50}$)
rVoNT/A1	0,9	2,3	29	18	4,5
Химера 3B	8,0	89	42	200	14,1
Химера 3C	5,0	26	42	8,9	7,4

Пример 5 - Экспрессия и очистка химеры VoNT/BC и подтверждение функциональной активности

Химеру 4 VoNT/BC (SEQ ID NO: 56) клонировали, экспрессировали и очищали, как описано в примере 2, за исключением использования другого штамма клеток (BL21) для экспрессии и протеолитического расщепления с использованием трипсина вместо эндопротеазы Lys-C (Фигура 8).

Таблица 8 - химерная конструкция VoNT/BC

Молекула	SEQ ID NO	Последовательность
Химера 4	56	B1:1-859+C1:868-1291

Эту химеру тестировали по функциональной активности в анализе расщепления VAMP-2.

АНАЛИЗ РАСЩЕПЛЕНИЯ VAMP-2 В КОРТИКАЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ КРЫС

Кортикальные нейроны крыс получали и поддерживали в покрытых поли-L-орнитинном (PLO) 96-луночных планшетах при плотности 20000 клеток/лунку в 125 мкл среды Neurobasal, содержащей 2% добавку B27, 0,5 mM GlutaMAX, 1% фетальную бычью сыворотку (FBS) и 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина, при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Дополнительные 125 мкл среды Neurobasal, содержащей 2% B27, 0,5 mM GlutaMAX, добавляли на DIV 4. Клетки поддерживали посредством замены половины среды каждые 3-4 суток. На DIV 11, 1,5 мкМ цитозин-β-D-арабинофуранозид (AraC) добавляли в среду для предотвращения пролиферации не относящихся к нейрональным клеток. Кортикальные нейроны на DIV 19-21 обрабатывали с использованием диапазона концентраций VoNT (30 фМ - 3 нМ) в течение 24 часов при 37°C.

Анализ активности VoNT с использованием анализа расщепления VAMP-2

Клетки быстро промывали средой для анализа (Neurobasal без фенола красного, 2% B27, 0,5 mM GlutaMAX, 10 мкМ TFB-TBOA ((3S)-3-[[3-[[4-(трифторметил)бензоил]амино]фенил]метокси]-L-аспарагиновая кислота), до лизиса в 100 мкл буфера для лизиса (буфер для образцов NuPage LDS, 1mM DTT и 1:500 бенсоназы) и нагревали при 90°C в течение 5 минут. 15 мкл лизатов разделяли в 12% Bis-Tris гелях при 200 В в течение 50 минут с использованием буфера MES. Белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны

посредством Transblot Turbo (Biorad) с использованием программы для низкой MW. Мембраны блокировали с использованием 5% обезжиренного молока в PBST и затем анализировали с использованием в качестве зонда первичного антитела кролика против VAMP-2 (Abcam ab3347, 1:1000), и затем конъюгированного с HRP вторичного антитела против IgG кролика HRP (Sigma #A6154). Мембраны проявляли с использованием хемилюминесцентного субстрата SuperSignal West Dura и визуализировали с использованием системы Syngene PXi. Денситометрию полос анализировали с использованием программного обеспечения GeneTools (Syngene), и определяли процент VAMP-2, расщепленного при каждой концентрации VoNT, относительно контрольных лунок. Данные приводили в соответствие с 4-параметрическим логистическим уравнением, и pEC_{50} рассчитывали с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad).

На фигуре 9 показано, что химера 4 является способной связываться с нейронами спинного мозга крысы, осуществлять транслокацию в цитоплазму и специфически расщеплять свой субстрат VAMP-2. В качестве отправной точки, эта химера является явно функциональной по сравнению с неактивной рекомбинантной молекулой VoNT/B1 (имеющей двойную мутацию в E231Q и H234Y, а также обозначенной в настоящем описании как VoNT/B1(0)) (SEQ ID NO: 57) и является почти настолько же активной, как нативная молекула VoNT/B1 (SEQ ID NO: 2) (Таблица 9). Это можно объяснить высокой аффинностью связывания VoNT/B с синаптотакмином и различными ганглиозидами, присутствующими на поверхности клеток крысы, в то время как для связывающего домена С в химере 4 известно только связывание с более низкой аффинностью с ганглиозидами. Это поддерживают данные анализа протеазной активности легкой цепи, как показано далее ниже.

Таблица 9

	$pEC_{50} \pm SEM$ (анализ расщепления VAMP-2 в кортикальных клетках крысы)
нативный VoNT/B1	10,60 \pm 0,06
Химера 4	9,36 \pm 0,15

ВоNT/B1 (0)	неактивный
<u>АНАЛИЗ ПРОТЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ</u>	
Активность легкой цепи	серотипа В оценивали с использованием бесклеточного анализа VoTest® (BioSentinel A1009) в соответствии с инструкциями производителя. Например, ВоNT разводили до 1,39 нМ в реакционном буфере VoTest (50 мМ HEPES-NaOH, 5 мМ NaCl, 10 мкМ ZnCl ₂ , 0,1% Tween-20, 0,1 мг/мл BSA, pH 7,1) и восстанавливали с использованием 5 мМ DTT в течение 30 минут при комнатной температуре. Пептидный репортер VAMP-2 (CFP-VAMP-2 (33-94)-YFP в 50 мМ HEPES-NaOH, 10 мМ NaCl, 15% глицерине) в конечной концентрации 200 нМ комбиниrowали с диапазоном концентраций ВоNT (500 фМ - 1,25 нМ, конечная) в черных планшетах Maxisorp (Nunc) в конечном объеме смеси для анализа 100 мкл/лунку. Планшеты герметично закрывали и инкубировали при 30°C в течение 18 часов вдали от света. Потерю флуоресценции при FRET от CFP до YFP при 528 нм и прибавление флуоресценции GFP при 485 нм после возбуждения при 440 нм измеряли с использованием считывателя для планшетов BioTek Synergy HT. Соотношение излучения флуоресценции для нерасщепленного:расщепленного репортерного субстрата при каждой концентрации ВоNT приводили в соответствие с 4-параметрическим логистическим уравнением, и pEC ₅₀ рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Анализ протеазной активности легкой цепи подтверждает, что легкая цепь химеры 4 является настолько же активной, как легкая цепь нативного ВоNT/B1 (см. фигуру 10 и таблицу 10), и таким образом, что, как объяснено выше, результаты анализа расщепления VAMP-2 можно объяснить тем фактом, что ВоNT/В имеет более высокую аффинность к синаптотатгмину и различным ганглиозидам, присутствующим на поверхности клеток крысы, по сравнению со связывающим доменом С в химере 4, который связывается только с ганглиозидами.

Таблица 10

pEC₅₀±SEM

(анализ расщепления пептида VAMP-2 *in*

vitro)

нативный ВоNT/B1	10,62±0,01
Химера 4	10,46±0,01
ВоNT/B1 (0)	NA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный нейротоксин, содержащий домен L_N из первого нейротоксина, ковалентно связанный с доменом H_c из второго нейротоксина,

где С-концевой аминокислотный остаток указанного домена L_N соответствует С-концевому аминокислотному остатку α-спирали, расположенному на С-конце домена L_N в указанном первом нейротоксине, и

где N-концевой аминокислотный остаток указанного домена H_c соответствует аминокислотному остатку непосредственно на С-конце от С-концевого аминокислотного остатка α-спирали, расположенного на С-конце домена L_N в указанном втором нейротоксине,

где указанные первый и второй нейротоксины являются разными, и (i) указанный первый нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин (BoNT) серотипа А, серотипа В, серотипа С, серотипа D, серотипа Е, серотипа F или серотипа G или столбнячный нейротоксин (TeNT); и (ii) указанный второй нейротоксин представляет собой BoNT серотипа А, серотипа В, серотипа С, серотипа D, серотипа Е, серотипа F или серотипа G или TeNT.

2. Химерный нейротоксин по п.1,

где указанный первый нейротоксин представляет собой:

BoNT/A, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1;

серотип BoNT/B, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 2;

серотип BoNT/C1, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 3;

серотип BoNT/D, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 4;

серотип BoNT/E, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 5;

серотип BoNT/F, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 6;

серотип BoNT/G, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 7; или

TeNT, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 8;

и, где

указанный второй нейротоксин представляет собой:

VoNT/A, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1;

серотип VoNT/B, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 2;

серотип VoNT/C1, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 3;

серотип VoNT/D, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 4;

серотип VoNT/E, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 5;

серотип VoNT/F, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 6;

серотип VoNT/G, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 7; или

TeNT, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 8.

3. Химерный нейротоксин по п.1 или 2, где указанный домен L_N первого нейротоксина соответствует:

- аминокислотным остаткам 1-872 из VoNT/A серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 1;

- аминокислотным остаткам 1-859 из VoNT/B серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 2;

- аминокислотным остаткам 1-867 из VoNT/C1 серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 3;

- аминокислотным остаткам 1-863 из VoNT/D серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 4;

- аминокислотным остаткам 1-846 из VoNT/E серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 5;

- аминокислотным остаткам 1-865 из VoNT/F серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 6;

- аминокислотным остаткам 1-864 из VoNT/G серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 7; или

- аминокислотным остаткам 1-880 из TeNT который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 8;

и, где указанный домен H_c второго нейротоксина соответствует:

- аминокислотным остаткам 873-1296 из VoNT/A серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 1;

- аминокислотным остаткам 860-1291 из VoNT/B серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 2;

- аминокислотным остаткам 868-1291 из VoNT/C1 серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 3;

- аминокислотным остаткам 864-1276 из VoNT/D серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 4;

- аминокислотным остаткам 847-1252 из VoNT/E серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 5;

- аминокислотным остаткам 866-1287 из VoNT/F серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 6;

- аминокислотным остаткам 865-1297 из VoNT/G серотипа, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 7; или

- аминокислотным остаткам 881-1315 из TeNT, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 8.

4. Химерный нейротоксин по любому из п.п.1-3, где указанный домен L_{H_N} из первого нейротоксина соответствует:

- аминокислотным остаткам 1-872 из VoNT/A1 последовательности SEQ ID NO: 1,

- аминокислотным остаткам 1-859 из VoNT/B1 последовательности SEQ ID NO:2,

- аминокислотным остаткам 1-867 из VoNT/C1 последовательности SEQ ID NO:3,

- аминокислотным остаткам 1-863 из VoNT/D последовательности SEQ ID NO:4,

- аминокислотным остаткам 1-846 из VoNT/E1 последовательности SEQ ID NO:5,

- аминокислотным остаткам 1-865 из VoNT/F1 последовательности SEQ ID NO:6,

- аминокислотным остаткам 1-864 из VoNT/G последовательности SEQ ID NO:7, или

- аминокислотным остаткам 1-880 из TeNT последовательности SEQ ID NO:8,

и где указанный домен H_c из второго нейротоксина соответствует:

- аминокислотным остаткам 873-1296 из BoNT/A1 последовательности SEQ ID NO:1,

- аминокислотным остаткам 860-1291 из BoNT/B1 последовательности SEQ ID NO:2,

- аминокислотным остаткам 868-1291 из BoNT/C1 последовательности SEQ ID NO:3,

- аминокислотным остаткам 864-1276 из BoNT/D последовательности SEQ ID NO:4,

- аминокислотным остаткам 847-1251 из BoNT/E1 последовательности SEQ ID NO:5,

- аминокислотным остаткам 866-1275 из BoNT/F1 последовательности SEQ ID NO:6,

- аминокислотным остаткам 865-1297 из BoNT/G последовательности SEQ ID NO:7, или

- аминокислотным остаткам 881-1315 из TeNT последовательности SEQ ID NO:8.

5. Химерный нейротоксин по любому из п.п.1-4, где указанный первый нейротоксин представляет собой BoNT/A, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:1, и где указанный второй нейротоксин представляет собой BoNT/B который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:2.

6. Химерный нейротоксин по п.5, где указанный первый нейротоксин представляет собой BoNT/A1, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:1 и, где указанный второй нейротоксин представляет собой BoNT/B1, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:2.

7. Химерный нейротоксин по п.6, где указанный домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-872 из BoNT/A1 последовательности SEQ ID NO:1 и, где указанный домен

H_c из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 860–1291 из VoNT/B1 последовательности SEQ ID NO:2.

8. Химерный нейротоксин по п.5, 6 или 7, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

9. Химерный нейротоксин по п.5, 6, 7 или 8, где указанный домен H_c из нейротоксина VoNT/B, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:2 содержит замену, добавление или делецию по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомene H_{cc}, которые оказывают эффект увеличения аффинности связывания нейротоксина VoNT/B для рецептора S_{yt} II человека по сравнению с последовательностью природного VoNT/B.

10. Химерный нейротоксин по п.9, где указанные замена, добавление или делеция по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомene H_{cc} включают мутацию замены, выбранную из группы, состоящей из: V1118M; Y1183M; E1191M; E1191I; E1191Q; E1191T; S1199Y; S1199F; S1199L; S1201V; E1191C, E1191V, E1191L, E1191Y, S1199W, S1199E, S1199H, W1178Y, W1178Q, W1178A, W1178S, Y1183C, Y1183P и их комбинаций.

11. Химерная молекула по п.9, где указанные замена, добавление или делеция по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомene H_{cc} включают две мутации замены, выбранные из группы, состоящей из: E1191M и S1199L, E1191M и S1199Y, E1191M и S1199F, E1191Q и S1199L, E1191Q и S1199Y, E1191Q и S1199F, E1191M и S1199W, E1191M и W1178Q, E1191C и S1199W, E1191C и S1199Y, E1191C и W1178Q, E1191Q и S1199W, E1191V и S1199W, E1191V и S1199Y, или E1191V и W1178Q.

12. Химерный нейротоксин по п.11, где указанные две мутации замены представляют собой E1191M и S1199Y.

13. Химерная молекула по п.9, где указанные замена, добавление или делеция по меньшей мере одного аминокислотного остатка в субдомene H_{cc} включают три мутации замены, представляющие собой E1191M, S1199W и W1178Q.

14. Химерный нейротоксин по пп.9, 10, 11 или 12, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11 или 12.

15. Химерный нейротоксин по любому из п.п.1-4, где указанный первый нейротоксин представляет собой VoNT/B, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:2, и где указанный второй нейротоксин представляет собой VoNT/C, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:3.

16. Химерный нейротоксин по п.15, где указанный первый нейротоксин представляет собой VoNT/B1, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:2, и где указанный второй нейротоксин представляет собой VoNT/C1, который имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:3.

17. Химерный нейротоксин по п.16, где указанный домен LH_N из первого нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 1-859 из VoNT/B1 последовательности SEQ ID NO:2, и где указанный домен H_C из второго нейротоксина соответствует аминокислотным остаткам 868-1291 из VoNT/C1 последовательности SEQ ID NO:3.

18. Химерный нейротоксин по пп.15, 16 или 17, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56.

19. Нуклеотидная последовательность, кодирующая химерный нейротоксин по любому из пп. 1-18.

20. Вектор для получения химерного нейротоксина или для лечения состояния, связанного с нежелательной нейронной активностью, содержащий нуклеотидную последовательность по п.19.

21. Клетка для получения химерного нейротоксина, содержащая нуклеотидную последовательность по п.19 или вектор по п.20.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая химерный нейротоксин по любому из пп. 1-18.

23. Набор для лечения состояния, связанного с нежелательной нейронной активностью, содержащий фармацевтическую композицию по п.22 и инструкции для терапевтического или косметического введения указанной композиции нуждающемуся в этом субъекту.

24. Способ получения химерного нейротоксина по любому из пп.1-18, включающий стадию культивирования клетки по п.21, в

условиях, в которых продуцируется указанный химерный нейротоксин.

25. Применение химерного нейротоксина по любому из пп. 1-18 в терапии.

26. Применение химерного нейротоксина по п.25, для лечения состояния, ассоциированного с нежелательной нейрональной активностью.

27. Применение химерного нейротоксина по п.26, для лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из спастической дисфонии, спастической кривошеи, дистонии мышц гортани, оромандибулярной дисфонии, лингвальной дистонии, цервикальной дистонии, фокальной дистонии рук, блефароспазма, страбизма, гемифациального спазма, нарушения века, церебрального паралича, фокальной спастичности и других нарушений голоса, спастического колита, нейрогенного мочевого пузыря, анизмуса, спастичности конечностей, тиков, треморов, бруксизма, анальной трещины, ахалазии, дисфагии и других нарушений мышечного тонуса, и других нарушений, характеризующихся непроизвольными движениями групп мышц, слезотечения, гипергидроза, повышенного слюноотделения, избыточной секреции в желудочно-кишечном тракте, нарушений секреции, боли из-за мышечных спазмов, головной боли, мигрени и дерматологических состояний.

28. Применение фармацевтической композиции по п.22 в терапии.

29. Применение фармацевтической композиции по п.28, для лечения состояния, ассоциированного с нежелательной нейрональной активностью.

30. Применение фармацевтической композиции по п.29, для лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из спастической дисфонии, спастической кривошеи, дистонии мышц гортани, оромандибулярной дисфонии, лингвальной дистонии, цервикальной дистонии, фокальной дистонии рук, блефароспазма, страбизма, гемифациального спазма, нарушения века, церебрального паралича, фокальной спастичности и других нарушений голоса, спастического колита, нейрогенного мочевого пузыря, анизмуса, спастичности конечностей, тиков, треморов, бруксизма, анальной

трещины, ахалазии, дисфагии и других нарушений мышечного тонуса, и других нарушений, характеризующихся непроизвольными движениями групп мышц, слезотечения, гипергидроза, повышенного слюноотделения, избыточной секреции в желудочно-кишечном тракте, нарушений секреции, боли из-за мышечных спазмов, головной боли, мигрени и дерматологических состояний.

31. Нетерапевтическое применение химерного нейротоксина по любому из пп. 1-18 для лечения эстетического или косметического состояния.

32. Нетерапевтическое применение фармацевтической композиции по п.22, для лечения эстетического или косметического состояния.

По доверенности

D_P19321	--MTWPKDFNYSDFVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSD-TNPS	57
DC_AB745660	--MTWPKDFNYSDFVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSD-TNPS	57
C1_P18640	--MPITINNFNYSDFVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRN-SNPN	57
CD_AB200360	--MPITINNFNYSDFVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRI GNWVIPDRFSRD-SNPN	57
G_Q60393	--MPVNIKXFNYNDP INNDKI IMMEPPFARGTGRYYKAFKIDRIWIVPERFTYG-FQPD	57
B4_EF051570	--MPVTINNFNYNDPIDNDNI IMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWI IPERYTFG-YKPE	57
B8_JQ964806	--MPVTINNFNYNDPIDNNNI IMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWI IPERYTFG-YKPE	57
B7_JQ354985	--MPVTINNFNYNDPIDNNNI IMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWI IPERYTFG-YKPE	57
B6_AB302852	--MPVTINNFNYNDPIDNNNI IMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWI IPERYTFG-YKPE	57
B2_AB084152	--MPVTINNFNYNDPIDNNNI IMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWI IPERYTFG-YKPE	57
B3_EF028400	--MPVTINNFNYNDPIDNDNI IMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWI IPERYTFG-YKPE	57
B1_B1INP5	--MPVTINNFNYNDPIDNNNI IMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWI IPERYTFG-YKPE	57
B5_EF033130	--MPVTINNFNYNDPIDNNNI IMMEPPFARGMGRYYKAFKITDRIWI IPERYTFG-YKPE	57
A4_EU341307	--MPLVNQQINYYDPVNGVDIAYIKI PNAGQ-MQPVKAFKIHKNVWVIPERDI FTNPEEV	57
A7_JQ954969	--MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKI PNAGQ-MQPVKAFKIHKNWVIPERDI FTNPEEG	57
A6_FJ981696	--MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKI PNAGQ-MQPVKAFKIHKNWVIPERDTFTNPEEG	57
A1_A5HZZ9	--MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKI PNAGQ-MQPVKAFKIHKNWVIPERDTFTNPEEG	57
A5_EU679004	--MLFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKI PNAGQ-MQPVKAFKIHKNWVIPERDTFTNPEEG	57
A3_DQ185900	--MPFVNKPFNYRDPGNGVDIAYIKI PNAGQ-MQPVKAFKIHGVWVIPERDTFTNPEEG	57
A2_X73423	--MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKI PNAGQ-MQPVKAFKIHKNWVIPERDTFTNPEEG	57
A8_KM233166	--MPFVNKQFNYKDTVNGIDIAYIKI PNAGQ-MQPVKAFKIHKNWVIPERDTFTNPKEG	57
H_KGO15617	--MPVVINSFNYDDPVNDNTIIYIRPPYYETSNTYFKAFQIMDNVWI IPERYRLG-IDPS	57
E9_JX424534	---MPKINSFNYNDPVNDNTILYIKPG---GCQQFYKSFNIMKNIWI IPERNVIG-TIPQ	53
E12_KM370319	MLYMPKINSFNYNDPVNDRTILYIKPG---GCQQFYKSFNIMKNIWI IPERNVIG-TIPQ	56
E11_KF861875	---MPKINSFNYNDPVNDKTILYIKPG---GCQQFYKSFNIMKNIWI IPERNVIG-TIPQ	53
E10_KF861917	---MPKINSFNYNDPVNDKTILYIKPG---GCQQFYKSFNIMKNIWI IPERNVIG-TIPQ	53
E7_JN695729	---MPKINSFNYNDPVNDKTILYIKPG---GCQQFYKSFNIMKNIWI IPERNVIG-TIPQ	53
E8_JN695730	---MPKINSFNYNDPVNDKTILYIKPG---GCQQFYKSFNIMKNIWI IPERNVIG-TIPQ	53
E5_AB037711	---MPKINSFNYNDPVNDRTILYIKPG---GCQEFYKSFNIMKNIWI IPERNVIG-TTPQ	53
E6_AM695759	---MPTINSFNYNDPVNDRTILYIKPG---GCQEFYKSFNIMKNIWI IPERNVIG-TTPQ	53
E4_AB088207	---MPTINSFNYNDPVNNRTILYIKPG---GCQQFYKSFNIMKNIWI IPERNVIG-TIPQ	53
E3_EF028403	---MPKINSFNYNDPVNDRTILYIKPG---GCQEFYKSFNIMKNIWI IPERNVIG-TTPQ	53
E1_Q00496	---MPKINSFNYNDPVNDRTILYIKPG---GCQEFYKSFNIMKNIWI IPERNVIG-TTPQ	53
E2_EF028404	---MPKINSFNYNDPVNDRTILYIKPG---GCQEFYKSFNIMKNIWI IPERNVIG-TTPQ	53
F7_GU213233	--MPVINNFNYNDP INNTTILYMKMPYYEDSNKYYYKAFIEMDNVWI IPERNIIG-KKPS	57
F5_GU213211	--MPVEINSFNYDDLVDNDTILYIRPPYYERSNTYFKAFNIMENVWI IPERYRLG-IEAS	57
F1_Q57236	--MPVVINSFNYNDPVNDTILYMQIPYEEKSKKYYYKAFIEMRNWVI IPERNTIG-TDPS	57
F4_GU213214	--MPVVINSFNYDDPVNDTILYMQIPYEEKSKKYYYKAFIEMRNWVIMPERNTIG-TNPS	57
F2_GU213209	--MPVVINSFNYNDPVNDETILYMQKPYEERSRKYYYKAFIEMPNVWIMPERDTIG-TKPD	57
F3_GU213227	--MPVVINSFNYNDPVNDETILYMQKPYEERSRKYYYKAFIEMPNVWIMPERDTIG-TKPD	57
F6_M92906	--MPVAINSFNYNDPVNDTILYMQIPYEEKSKKYYYKAFIEMRNWVI IPERNTIG-TNPS	57
T_P04958	--MPITINNFNYSDFVNDNTI IMMEPPYCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPERYEFG-TKPE	57

: :.* * :. * : *:* * :*::*:*

ФИГ.1

D_P19321	LSKPPR-PT-SKYQSYDPSYLSTDEQKDTFLKGIKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSP	115
DC_AB745660	LSKPPR-PT-SKYQSYDPSYLSTDEQKDTFLKGIKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSP	115
C1_P18640	LNKPPR-VT-SPKSGYYDPNYLSTDSKDTFLKEIKLFKRINSREIGEELIYRLSTDIP	115
CD_AB200360	LNKPPR-VT-SPKSGYYDPNYLSTDSKDTFLKEIKLFKRINSREIGEELIYRLATDIP	115
G_Q60393	QFNASTGVFSKDVYEYDPTYLKTDAEKDKFLKTMIKLFNRINSKPSGQRLLDMIVDAIP	117
B4_EF051570	DFNKSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIP	117
B8_JQ964806	DFNKSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIP	117
B7_JQ354985	DFNKSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIP	117
B6_AB302852	DFNKSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIP	117
B2_AB084152	DFNKSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIP	117
B3_EF028400	DFNKSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIP	117
B1_B1INP5	DFNKSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIP	117
B5_EF033130	DFNKSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIP	117
A4_EU341307	DLNPPPEAK-QVPISYYDSAYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLSIVRGIP	116
A7_JQ954969	DLNPPPEAK-QVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLSIVRGIP	116
A6_FJ981696	DLNPPPEAK-QVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLSIVRGIP	116
A1_A5HZZ9	DLNPPPEAK-QVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLSIVRGIP	116
A5_EU679004	DLNPPPEAK-QVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTELGRMLLSIVRGIP	116
A3_DQ185900	DLNPPPEAK-QVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFDRIYSTGLGRMLLSFIVKGIP	116
A2_X73423	DLNPPPEAK-QVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLSIVRGIP	116
A8_KM233166	DLNPPPEAK-QVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLSIVRGIP	116
H_KGO15617	LFNPPVSLK-AGSDGYFDPNYLSTNTEKNKYLQIMIKLFKRINSKPAQI LLEEIKNAIP	116
E9_JX424534	NFLPPTSLK-NGDSSYYDPNYLQNDQEKDRFLKIVTKVFN RINDNLSGRILLEELSKANP	112
E12_KM370319	DFQPPTSLK-NGDSSYYDPNYLQSNEEKDRFLKIVTKIFNRINDNLSGGILLEELSKANP	115
E11_KF861875	DFLPPTSLK-NGDSSYYDPNYLQSNEEKDRFLKIVTKIFNRINDNLSGGILLEELSKANP	112
E10_KF861917	DFLPPTSLK-NGDSSYYDPNYLQSNEEKDRFLKIVTKIFNRINDNLSGGILLEELSKANP	112
E7_JN695729	DFLPPTSLK-NGDSSYYDPNYLQSNEEKDRFLKIVTKIFNRINDNLSGRILLEELSKANP	112
E8_JN695730	DFLPPTSLK-NGDSSYYDPNYLQSNEEKDRFLKIVTKIFNRINDNLSGRILLEELSKANP	112
E5_AB037711	DFHPPTSLK-NGDSSYYDPNYLQSDQEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANP	112
E6_AM695759	DFHPPTSLK-NGDSSYYDPNYLQSYEEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANP	112
E4_AB088207	DFLPPTSLK-NGDSSYYDPNYLQSDQEKDKFLKIVTKIFNRINDNLSGRILLEELSKANP	112
E3_EF028403	DFHPPTSLK-NGDSSYYDPNYLQSDQEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANP	112
E1_Q00496	DFHPPTSLK-NGDSSYYDPNYLQSDQEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANP	112
E2_EF028404	DFHPPTSLK-NGDSSYYDPNYLQSDQEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANP	112
F7_GU213233	DFYPPISLD-SGSSAYDPNYLTTDAEKDRFLKTVIKLFNRINSNPAGQVLLQEI KNGKP	116
F5_GU213211	KFDPPDSLK-AGSDGYFDPNYLSTNTEKNRYLQIMIKLFKRINSNEAGKILLNQIKDAIP	116
F1_Q57236	DFDPPASLE-NGSSAYDPNYLTTDAEKDRYLKTTIKLFKRINSNPAGEVLLQEI SYAKP	116
F4_GU213214	DFDPPASLK-NGSSAYDPNYLTTDAEKDRYLKTTIKLFKRINSNPAGEVLLQEI SYAKP	116
F2_GU213209	EFQVPDSLK-NGSSAYDPNYLTTDAEKDRYLKTMIKLFNRINSNPTGKVLLQEEVSNARP	116
F3_GU213227	DFQVPDSLK-NGSSAYDPNYLTTDAEKDRYLKTMIKLFNRINSNPTGKVLLQEEVSNARP	116
F6_M92906	DFDPPASLK-NGSSAYDPNYLTTDAEKDRYLKTTIKLFKRINSNPAGVLLQEI SYAKP	116
T_P04958	DFNPPSSLI-EGASEYYDPNYLRDSDKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKI INAI P	116

: ** . .*: :* : *:* ** . * *: :

D_P19321	FMGDSSTPEDTDFDFTRHTTNIAVEKFENGSWKVTNIIITPSVLI FGPLPNI LDYTASLTQ	175
DC_AB745660	FMGDSSTPEDTDFDFTRHTTNIAVEKFENGSWKVTNIIITPSVLI FGPLPNI LDYTASLTQ	175
C1_P18640	FPGNNNTPINTFDFDVFDFNSVDVKTRQGNNWVKTGSINPSVITGPRENIIDPETSTFKL	175
CD_AB200360	FPGNNNTPINTFDFDVFDFNSVDVKTRQGNNWVKTGSINPSVITGPRENIIDPETSTFKL	175
G_Q60393	YLGNASTPPDKFAANVANVSINKKI IQPGAEDQIKGLMTNLIIFGPGPVLSDNFTDSMIM	177
B4_EF051570	YLGDRRVPLEEFNTNIASVTVNKLI SNPGEVEQKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGI	177
B8_JQ964806	YLGDRRVPLEEFNTNIASVTVNKLI SNPGEVEQKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGI	177
B7_JQ354985	YLGDRRVPLEEFNTNIASVTVNKLI SNPGEVEQKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGI	177
B6_AB302852	YLGDRRVPLEEFNTNIASVTVNKLI SNPGEVEQKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGI	177
B2_AB084152	YLGDRRVPLEEFNTNIASVTVNKLI SNPGEVEQKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGI	177
B3_EF028400	YLGDRRVPLEEFNTNIASVTVNKLI SNPGEVEQKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGI	177
B1_B1INP5	YLGDRRVPLEEFNTNIASVTVNKLI SNPGEVEQKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGI	177
B5_EF033130	YLGDRRVPLEEFNTNIASVTVNKLI SNPGEVEQKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGI	177
A4_EU341307	FWGGGKIDTE--LKVIDTNCINIIQLDD----SYRSEELNLAIIGPSANIIESQCSSF-	169
A7_JQ954969	FWGGSTIDTE--LKVIDTNCINVIQPDG----SYRSEELNLVIGPSADIIQFECKSFG-	169
A6_FJ981696	FWGGSTIDTE--LKVIDTNCINVIQPDG----SYRSEELNLVIGPSADIIQFECKSFG-	169
A1_A5HZZ9	FWGGSTIDTE--LKVIDTNCINVIQPDG----SYRSEELNLVIGPSADIIQFECKSFG-	169
A5_EU679004	FWGGSTIDTE--LKVIDTNCINVIQPDG----SYRSEELNLVIGPSADIIQFECKSFG-	169
A3_DQ185900	FWGGSTIDTE--LKVIDTNCINVIQPDG----SYRSEELNLVITGPSADIIQFECKSFG-	169
A2_X73423	FWGGSTIDTE--LKVIDTNCINVIQPDG----SYRSEELNLVIGPSADIIQFECKSFG-	169
A8_KM233166	FWGGSTIDTE--LKVIDTNCINVIQPDG----SYRSEELNLVIGPSADIIQFECKSFG-	169
H_KGO15617	YLGNSYTQEEQFTTNNRTVSNFNKLANG----NIVQQMANLI IWGPGPDLTTNKTGGIY	172
E9_JX424534	YLGNDNTRDDDFIIN-DGSAVPIQFSNG----SQSILLPTVIIMGAEPDLFETNSSNISL	167
E12_KM370319	YLGNDNTPDGDFIIN-DASAVPIQFSNG----SQSILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISL	170
E11_KF861875	YLGNDNTPNMQFHIG-DASAVEIKFSNG----SQSILLPTVIIMGAEPDLFETNSSNISL	167
E10_KF861917	YLGNDNTPNMQFHIG-DASAVEIKFSNG----SQSILLPTVIIMGAEPDLFETNSSNISL	167
E7_JN695729	YLGNDNTPDNQFHIG-DASAVEIKFSNG----NQSILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISL	167
E8_JN695730	YLGNDNTPDNQFHIG-DASAVEIKFSNG----NQSILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISL	167
E5_AB037711	YLGNDNTPDNQFHIG-DASAVEIKFSNG----SQDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISL	167
E6_AM695759	YLGNDNTPDNQFHIG-DASAVEIKFSNG----SQDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISL	167
E4_AB088207	YLGNDNTPDGDFIIN-DASAVPIQFSNG----SQSILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISL	167
E3_EF028403	YLGNDNTPDNQFHIG-DASAVEIKFSNG----SQHILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISL	167
E1_Q00496	YLGNDNTPDNQFHIG-DASAVEIKFSNG----SQDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISL	167
E2_EF028404	YLGNDNTPDNQFHIG-DASAVEIKFSNG----IQDILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISL	167
F7_GU213233	YLGNDHTAVNEFCANNRSTSVNIKESNG----TTDSMLLNVLILGPGPNILECSTFPVRI	172
F5_GU213211	YLGNSYTAEDQFTTNNRTISFNVRLANG----TIEQEMANLI IWGPGPDLTTNRTGGTTY	172
F1_Q57236	YLGNEHTPINEFHPVTRTTSVNIKSSTN----VKSSII LNLVLGAGPDI FENSSYPVRK	172
F4_GU213214	YLGNDHTPINEFHPVTRTTSVNIKSSTN----VESSII LNLVLGAGPNI FENSSYPVRK	172
F2_GU213209	YLGDDDTLINEFFPVNVTTSVNIKFTD----VESSII SNLLVLGAGPDI FKAYCTPLVR	172
F3_GU213227	YLGDDDTLINEFFPVNVTTSVNIKFTD----VESSII SNLLVLGAGPDI FKAYCTPLVR	172
F6_M92906	YLGNDHTPIDFSPVTRTTSVNIKSTN----VESSMLLNVLILGAGPDI FESCCYPVRK	172
T_P04958	YLGNSYSLLDKFDTNSNSVSNLLEQDPSGATTKSAMLTNLIIFGPGPVLNKNEVRGIVL	176

: * . . : * :

D_P19321	----GQQSNPSFEGFGTLSILKVAPEFLLTFSDVTSNQSSAVLGKSIFCMDPVIALMH	231
DC_AB745660	----GQQSNPSFEGFGTLSILKVAPEFLLTFSDVTSNQSSAVLGKSIFCMDPVIALMH	231
C1_P18640	----TNNTFAAQEGFGALSIIISIPRFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMH	231
CD_AB200360	----TNNTFAAQEGFGALSIIISIPRFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMH	231
G_Q60393	----NGHSPISEGFGARMMIRFCPSCLNVFNQENKDTSI FSRRAYFADPALI LMHEL	232
B4_EF051570	----QNHFASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALI LMHEL	232
B8_JQ964806	----QNHFASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALI LMHEL	232
B7_JQ354985	----QNHFASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALI LMHEL	232
B6_AB302852	----QNHFASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALI LMHEL	232
B2_AB084152	----QNHFASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALI LMHEL	232
B3_EF028400	----QNHFASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALI LMHEL	232
B1_B1INP5	----QNHFASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALI LMHEL	232
B5_EF033130	----QNHFASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALI LMHEL	232
A4_EU341307	----DDVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTVGFEESELEVDTNPLLGAGKFAQDPAVALAHEL	225
A7_JQ954969	----HDVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTVGFEESELEVDTNPLLGAGKFAIDPAVTLAHEL	225
A6_FJ981696	----HEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTVGFEESELEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHEL	225
A1_A5HZZ9	----HEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTVGFEESELEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHEL	225
A5_EU679004	----HDVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTVGFEESELEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHEL	225
A3_DQ185900	----HDVFNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTVGFEESELEVDTNPLLGAGTFATDPAVTLAHEL	225
A2_X73423	----HDVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTVGFEESELEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHEL	225
A8_KM233166	----HDVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTVGFEESELEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHEL	225
H_KGO15617	SPYQSMEATPYKDGFGS IMTVEFSPEYATAFNDISIAS---H-SPSLFIKDPALILMH	228
E9_JX424534	I----NNYSPSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFNDN-----SMNEFIQDPALTLIHEL	214
E12_KM370319	I----NNYRPSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFNDN-----SMNEFIQDPALTLMH	217
E11_KF861875	K----NNYMPSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFNDN-----SMNEFIQDPALTLMH	214
E10_KF861917	K----NNYMPSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFNDN-----SMNEFIQDPALTLMH	214
E7_JN695729	R----NNYMPSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFNDN-----SMNEFIQDPALTLMH	214
E8_JN695730	R----NNYMPSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFNDN-----SMNEFIQDPALTLMH	214
E5_AB037711	R----NNYMPSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFNDN-----SMNEFIQDPALTLMH	214
E6_AM695759	R----NNYMPSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFKDN-----SMNEFIQDPALTLMH	214
E4_AB088207	R----NNYMPSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFKDN-----SMNEFIQDPALTLMH	214
E3_EF028403	R----NNYMPSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFNDN-----SINEFIQDPALTLMH	214
E1_Q00496	R----NNYMPSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFNDN-----SMNEFIQDPALTLMH	214
E2_EF028404	R----NNYMPSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFNDN-----SMNEFIQDPALTLMH	214
F7_GU213233	FPN-NIAYDPSEKGFSGIQLMSFSTEYEFYAFND-----NTDLFIADPAISLAHEL	221
F5_GU213211	TPAQSLAIPYKEGFGS IMTIEFSPEYATAFNDISLTS---H-APSLFIKDPALILMH	228
F1_Q57236	LMDSGGVYDPSNDGFGS INIVTFSPEYEYTFNDISGGY---NSSTESFIADPAISLAHEL	229
F4_GU213214	LMNSGEVYDPSNDGFGS INIVTFSPEYEYTFNDISGGH---NSSTESFIADPAISLAHEL	229
F2_GU213209	FNKSDKLIEPSNHGFGS INILTFSPYEYHIFNDISGGN---HNSTESFIADPAISLAHEL	229
F3_GU213227	FNKSDKLIEPSNHGFGS INILTFSPYEYHIFNDISGGD---HNSTESFIADPAISLAHEL	229
F6_M92906	LIDPDVVYDPSNYGFGS INIVTFSPEYEYTFNDISGGH---NSSTESFIADPAISLAHEL	229
T_P04958	RVD-NKNYFPCRDFGFSIMQMAFCPEYVPTFDNVIENTSLTIGKSKYFQDPALLMH	235

: : .. :.: : ** : * ***

D_P19321	THSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGGFFSQDGNVQFEELYTFGGLDVEIIPQIERSQLRE	291
DC_AB745660	THSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGGFFSQDGNVQFEELYTFGGSDVEIIPQIERLQLRE	291
C1_P18640	NHAMHNLYGIAIPNDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEE	291
CD_AB200360	NHAMHNLYGIAIPNDQRISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEE	291
G_Q60393	IHVLHGLYGIKISN-LPITPN-TKEFFMQHSDPVQAEELYTFGGHDPVSIISPSTDMNIYN	290
B4_EF051570	IHVLHGLYGIKVDD-LPIVPN-EKKFFMQSTDITQAEELYTFGGQDPSIISPSTDKSIYD	290
B8_JQ964806	IHVLHGLYGIKVDD-LPIVPN-GKKFFMQSTDITQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYD	290
B7_JQ354985	IHVLHGLYGIKVDD-LPIVPN-EKKFFMQSTDITQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYD	290
B6_AB302852	IHVLHGLYGIKVDD-LPIVPN-EKKFFMQSTDITQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYD	290
B2_AB084152	IHVLHGLYGIKVDD-LPIVPN-EKKFFMQSTDITQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYD	290
B3_EF028400	IHVLHGLYGIKVDD-LPIVPN-EKKFFMQSTDITQAEELYTFGGQDPRIITPSTDKSIYD	290
B1_B1INP5	IHVLHGLYGIKVDD-LPIVPN-EKKFFMQSTDITQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYD	290
B5_EF033130	IHVLHGLYGIKVND-LPIVPN-EKKFFMQSTDITQAEELYTFGGQDPSIISPSTDKSIYD	290
A4_EU341307	IHAHRLYGIAINT-NRVFKVNTNAYYEMAGLEVSLEELITFGGNDAKFIDSLQKKEFSL	284
A7_JQ954969	IHAGHRLYGIAINP-NRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRL	284
A6_FJ981696	IHAGHRLYGIAINP-NRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRL	284
A1_A5HZZ9	IHAGHRLYGIAINP-NRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRL	284
A5_EU679004	IHAGHRLYGIAINP-NRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGEHDAKFIDSLQENEFRL	284
A3_DQ185900	IHAHRLYGIAINP-NRVLKVKTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGNDTNFIDSLWQKKFSR	284
A2_X73423	IHAHRLYGIAINP-NRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRL	284
A8_KM233166	IHAHRLYGIAINP-NRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHNAKFIDSLQENEFRL	284
H_KGO15617	IHVLHGLYGTYTE-YKITPNVVQ-SYMKVTKPITSAEFLTFGGRDRNIVPQSIQSQLYN	286
E9_JX424534	IHSLHGLYGAKGIT-TKYTITQQQNPLITNIRGINIEEFLTFGGNNLNIITSSQLNDIYT	273
E12_KM370319	IHSLHGLYGAKGIT-TKYTITQQQNPLITNIRGINIEEFLTFGGNDLNIITSSQFNDIYT	276
E11_KF861875	IHSLHGLYGAKGIT-TKYTITQQQNPLITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITNAQSNDIYT	273
E10_KF861917	IHSLHGLYGAKGIT-TKYTITQQQNPLITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITNAQSNDIYT	273
E7_JN695729	IHSLHGLYGAKRIT-TKYTITQQQNPLITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQYNDIYT	273
E8_JN695730	IHSLHGLYGAKRIT-TKYTITQQQNPLITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQYNDIYT	273
E5_AB037711	IHSLHGLYGAKGIT-TKYTITQQQNPLITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQSNDIYT	273
E6_AM695759	IHSLHGLYGAKGIT-TQYTITQQQNPLITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQYNDIYT	273
E4_AB088207	IHSLHGLYGAKGIT-TKYTITQKQNPLITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQSNDIYT	273
E3_EF028403	IHSLHGLYGAKGIT-TTCIITQQQNPLITNRKGINIEEFLTFGGNDLNIITVAQYNDIYT	273
E1_Q00496	IHSLHGLYGAKGIT-TKYTITQKQNPLITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQSNDIYT	273
E2_EF028404	IHSLHGLYGAKGIT-TKYTITQKQNPLITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQSNDIYT	273
F7_GU213233	IHVLHGLYGAKGVT-NKKVIEVDQALMAAEKDIIKIEEFLTFGGQDLNIITNSTNQKIYD	280
F5_GU213211	IHVLHGLYGTYYTTG-FKIKPN-ITEPYMEVTKPITSGEFLTFGGNDVNKIPQLIQSQLRS	286
F1_Q57236	IHALHGLYGARGVT-YKETIKVKQAPLMIAEKPIRLEEFALTFGGQDLNIITSAMKEKIYN	288
F4_GU213214	IHALHGLYGARGVT-YKETIKVKQAPLMIAEKPIRLEEFALTFGGQDLNIITSAMKEKIYN	288
F2_GU213209	IHALHGLYGAKAVT-HKESLVAERGPLMIAEKPIRLEEFALTFGGEDLNIIPSAMKEKIYN	288
F3_GU213227	IHALHGLYGAKAVT-HKETIEVKRGPMLIAEKPIRLEEFALTFGGEDLNIIPSAMKEKIYN	288
F6_M92906	IHALHGLYGARGVT-YETIEVKQAPLMIAEKPIRLEEFALTFGGQDLNIITSAMKEKIYN	288
T_P04958	IHVLHGLYGMQVSS-HEIIPS-KQEIYMQHTYPIAEEFLTFGGQDANLISIDIKNDLYE	293

* * *** * : : ** : :

D_P19321	KALGHYKDIAKRLNNINKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDNMTGNFVVNIDKFNSLY	351
DC_AB745660	KALGHYKDIAKRLNNINKTIPSSWSSNIDKYKKIFSEKYNFDKDNMTGNFVVNIDKFNSLY	351
C1_P18640	KALDYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKLIIRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELY	351
CD_AB200360	KALDYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKLIIRKYRFVVESSGEVAVDRNKFVVELY	351
G_Q06393	KALQNFQDIANRLNIVS-SAQGS-GIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKDFDKLY	348
B4_EF051570	KVLQNFQDIANRLNIVS-SAQGS-GIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKDFDKLY	349
B8_JQ964806	KVLQNFQDIANRLNIVS-SAQGS-GIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKDFDKLY	349
B7_JQ354985	KVLQNFQDIANRLNIVS-SAQGS-GIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKDFDKLY	349
B6_AB302852	KVLQNFQDIANRLNIVS-SAQGS-GIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKDFDKLY	349
B2_AB084152	KVLQNFQDIANRLNIVS-SAQGS-GIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKDFDKLY	349
B3_EF028400	KVLQNFQDIANRLNIVS-SAQGS-GIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKDFDKLY	349
B1_B1INP5	KVLQNFQDIANRLNIVS-SAQGS-GIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKDFDKLY	349
B5_EF033130	KVLQNFQDIANRLNIVS-SAQGS-GIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKDFDKLY	349
A4_EU341307	YYNKFKDIASSTLNKAKS-IVGT-TASLQYMKNVFEKEYLLSEDTGKFLVDRKDFDELY	342
A7_JQ954969	YYNKFKDIASSTLNKAKS-IVGT-TASLQYMKNVFEKEYLLSEDTGKFLVDRKDFDELY	342
A6_FJ981696	YYNKFKDIASSTLNKAKS-IVGT-TASLQYMKNVFEKEYLLSEDTGKFLVDRKDFDELY	342
A1_A5HZZ9	YYNKFKDIASSTLNKAKS-IVGT-TASLQYMKNVFEKEYLLSEDTGKFLVDRKDFDELY	342
A5_EU679004	YYNKFKDIASSTLNKAKS-IVGT-TASLQYMKNVFEKEYLLSEDTGKFLVDRKDFDELY	342
A3_DQ185900	DAYDNLQNIARILNEAKT-IVGT-TTPLQYMKNIFIRKYFLSEASGKISVNKAFAFEFY	342
A2_X73423	YYNKFKDIASSTLNKAKS-IVGT-TASLQYMKNVFEKEYLLSEDTGKFLVDRKDFDELY	342
A8_KM233166	YYNKFKDIASSTLNKAKS-IVGT-TASLQYMKNVFEKEYLLSEDTGKFLVDRKDFDELY	342
H_KGO15617	KVLSDYKRIASRLNKVNT-AT-A-LINIDEFKNLYEWKYQFAKDSNGVYSVDLNKFEQLY	343
E9_JX424534	NLLDDYKKIASKLSKVQV-SN-P-Q--LNPYKDVFEKEYGLDKNASGIYSVNINKFNDIF	328
E12_KM370319	NLLDDYKKIASKLSQVRV-SN-P-Q--LNPYKDVFEKEYGLDKDASGIYSVNINKFNDIF	331
E11_KF861875	NLLDDYKKIASKLSQVQV-SN-P-Q--LNPYKDVFEKEYGLDKDANGIYSVNINKFNDIF	328
E10_KF861917	NLLADYKKIASKLSQVQV-SN-P-Q--LNPYKDI FQEKYGLDKNASGIYSVNINKFDDIF	328
E7_JN695729	NLLADYKKIASKLSKVQV-SN-P-Q--LNPYKDI FQEKYGLDKNASGIYSVNINKFDDIF	328
E8_JN695730	NLLADYKKIASKLSKVQV-SN-P-Q--LNPYKDI FQEKYGLDKNASGIYSVNINKFDDIF	328
E5_AB037711	NLLADYKKIASKLSKVQV-SN-P-L--LNPYKDVFEKEYGLDKDASGIYSVNINKFNDIF	328
E6_AM695759	NLLADYKKIASKLSKVQV-SN-P-L--LNPYKDVFEKEYGLDKDASGIYSVNINKFNDIF	328
E4_AB088207	NLLADYKKIASKLSKVQV-SN-P-L--LNPYKDVFEKEYGLDKDASGIYSVNINKFNDIF	328
E3_EF028403	NLLNDYRKIASKLSKVQV-SN-P-Q--LNPYKDI FQEKYGLDKDASGIYSVNINKFDDIL	328
E1_Q00496	NLLADYKKIASKLSKVQV-SN-P-L--LNPYKDVFEKEYGLDKDASGIYSVNINKFNDIF	328
E2_EF028404	NLLADYKKIASKLSKVQV-SN-P-L--LNPYKDVFEKEYGLDKDASGIYSVNINKFNDIF	328
F7_GU213233	NLLSNYTAIASRLSQVNI-NN-S-ALNTTYKNNFFQWKYGLDQDSNGNYTVNISKFNAIY	337
F5_GU213211	KVLDDYEKIASRLNKVNR-AT-A-EINIDKFKYSYQLKYQFVKDSNGVYSVDLDFKFNKLY	343
F1_Q57236	NLLANYEKIATRLSRVNS-AP-P-EYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIY	345
F4_GU213214	NLLANYEKIATRLSRVNS-AP-P-EYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIY	345
F2_GU213209	NLLANYEKIATRLREVNT-AP-P-GYDINEYKDYFQWKYGLDRNADGSYTVNENKFNEIY	345
F3_GU213227	NLLANYEKIATRLREVNT-AP-P-GYDINEYKDYFQWKYGLDRNADGSYTVNENKFNEIY	345
F6_M92906	NLLANYEKIATRLSEVNS-AP-P-EYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIY	345
T_P04958	KTLDNDYKAIANKLSQVTSC-NDP-NIDIDSYKQIYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFQILY	351

.. * * ** : : * :: * :

D_P19321	SDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPV--FANILDDNIYTIIRDGFNLTNKGFNIE	410
DC_AB745660	SDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSKHYLPV--FANILDDNIYTIINGFNLTTKGFNIE	410
C1_P18640	NELTQIFTEFNKYAKIYNVQNRKIYLSNVYTPV--TANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNVLF	410
CD_AB200360	KELTQIFTEFNKYAKIYNVQNRKIYLSNVYTPV--TANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNVLF	410
G_Q60393	KALMFGFTEINLAGEYGIKTRYSYFSEYLPPIKTEKLLDNTIYTONNEGFNIASKNLKTEF	408
B4_EF051570	KSLMFGFTEINIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIIEEGFNISDKNMGKEY	409
B8_JQ964806	KSLMFGFTEINIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDDEIYTIIEEGFNISDKNMGKEY	409
B7_JQ354985	KSLMFGFTEINIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIIEEGFNISDKDMEKEY	409
B6_AB302852	KSLMFGFTEINIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIIEEGFNISDKNMEKEY	409
B2_AB084152	KSLMFGFTEINIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIIEEGFNISDKNMEKEY	409
B3_EF028400	KSLMFGFTEINIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIIEEGFNISDKNMEKEY	409
B1_B1INP5	KSLMFGFTEINIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIIEEGFNISDKDMEKEY	409
B5_EF033130	KSLMFGFTEINIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIIEEGFNISDKNMEKEY	409
A4_EU341307	KLLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVF--KINIVPDVNYTIHDGFNLRNTNLAANF	401
A7_JQ954969	KMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVF--KMNIVPEVNYTIYDGFNLRNTNLAANF	401
A6_FJ981696	KMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVF--KINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANF	401
A1_A5HZZ9	KMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVF--KINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANF	401
A5_EU679004	KMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVF--KINIVPEVNYTIYDGFNLRNTNLAANF	401
A3_DQ185900	RVLTRGFTELEFVNPFKVINRKYLNFDKAVF--RINIVPDENYTIINEGFNLEGAN----S	397
A2_X73423	KMLTEIYTEDNFVNFVKVINRKYLNFDKAVF--RINIVPDENYTIKDGFNKGANLSTNF	401
A8_KM233166	KMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVF--KINIVPDENYTIKDGFNKNTNLAANF	401
H_KGO15617	KKIY--SFTEFNLAYEFKIKTRGLGYLAENFGPFYLPNLLDDSIYTEVDGFNIG--ALSINY	400
E9_JX424534	KKLY--SFTEFDLATKFQVKCRETYIGQ--YKYFKLSNLLNDSIYNISEGYNIN--TLNVNF	384
E12_KM370319	KKLY--SFTEFDLATKFQVKCRETYIGQ--YKYFQLSNLLNDSIYNISEGYNIN--NLKVNF	387
E11_KF861875	KKLY--SFTEFDLATKFQVKCRKTYIGH--HKYFRLSDDLNDSIYNISDGYNIN--TLKVNF	384
E10_KF861917	KKLY--SFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQ--YKYFKLSNLLNNSIYNISEGYNIN--TLKVNF	384
E7_JN695729	KKLY--SFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQ--YKYFKLSNLLNNSIYNISEGYNIN--TLKVNF	384
E8_JN695730	KKLY--SFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQ--YKYFKLSNLLNNSIYNISEGYNIN--TLKVNF	384
E5_AB037711	KKLY--SFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQ--YKYFKLSNLLNDSIYNISEGYNIN--NLKVNF	384
E6_AM695759	KKLY--SFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQ--YKYFKLSNLLNNSIYNISEGYNIN--TLKVNF	384
E4_AB088207	KKLY--SFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQ--YKYFKLSNLLNDSIYNISEGYNIN--NLKVNF	384
E3_EF028403	KKLY--SFTEFDLATKFQVKCRETYIGQ--YKYFKLSNLLNDSIYNISEGYNIN--NLKVNF	384
E1_Q00496	KKLY--SFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQ--YKYFKLSNLLNDSIYNISEGYNIN--NLKVNF	384
E2_EF028404	KKLY--SFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQ--YKYFKLSNLLNDSIYNISEGYNIN--NLKVNF	384
F7_GU213233	KKLF--SFTECDLAQKFQVKNRSNYLFH--FKPFRLDLLDDNIYSISEGFNIG--SLRVNN	393
F5_GU213211	DKIY--SFTEFNLAHEFKIKTRNSYLAKNFGPFYLPNLLDNSIYNEADGFNIG--DLSVNY	400
F1_Q57236	KKLY--SFTEIDLANKFKVKCRNTYFIK--YGFLKVPNLLDDDIYTVSEGFNIG--NLAVNN	401
F4_GU213214	KKLY--SFTEIDLANKFKVKCRNTYFIK--YGFLKVPNLLDDDIYTVSEGFNIG--NLAVNN	401
F2_GU213209	KKLY--SFTEIDLANKFKVKCRNTYFIK--YGFVKVPDLLDDDIYTVSEGFNIG--NLAVNN	401
F3_GU213227	KKLY--SFTEIDLANKFKVKCRNTYFIK--YGFVKVPDLLDDDIYTVSEGFNIG--NLAVNN	401
F6_M92906	KKLY--SFTEIDLANKFKVKCRNTYFIK--YEFKVPNLLDDDIYTVSEGFNIG--NLAVNN	401
T_P04958	NSIMYGFTEIELGKKFNKTRLSYFSMNHPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESKDLKSEY	411

: * : : * * : . . : . * : * : *

D_P19321	SGQNIERNPAL-QKLSS-ESVVDLFTKVCRLRLTKN-----SRDDSTCIKV	453
DC_AB745660	SGQNIERNPAL-QKLSS-ESVVDLFTKVCRLRLTRN-----SRDDSTCIQV	453
C1_P18640	MGQNLSRNPAL-RKVNP-ENMLYLFTKFKCHKAI DGR-----SLYNKTLDCRELLV	458
CD_AB200360	MGQNLSRNPAL-RKVNP-ENMLYLFTKFKCHKAI DGR-----SLYNKTLDCRELLV	458
G_Q60393	NGQNKAVNKEAYEEI SL-EHLVIYRIAMCKPVMYKN-----TGKSEQCIIV	453
B4_EF051570	RGQNKAINKQAYEEI SK-EHLVAVYKI QMCKSVK-----VPGICIDV	449
B8_JQ964806	RGQNKAINKQAYEEI SK-EHLVAVYKI QMCKSVR-----APGICIDV	449
B7_JQ354985	RGQNKAINKQAYEEI SK-EHLVAVYKI QMCKSVK-----APGICIDV	449
B6_AB302852	RGQNKAINKQAYEEI SK-EHLVAVYKI QMCKSVR-----APGICIDV	449
B2_AB084152	RGQNKAINKQAYEEI SK-EHLVAVYKI QMCKSVR-----APGICIDV	449
B3_EF028400	RGQNKAINKQAYEEI SK-EHLVAVYKI QMCKSVR-----APGICIDV	449
B1_B1INP5	RGQNKAINKQAYEEI SK-EHLVAVYKI QMCKSVK-----APGICIDV	449
B5_EF033130	RGQNKAINKQAYEEI SK-EHLVAVYKI QMCKSVK-----APGICIDV	449
A4_EU341307	NGQNI EINNKNFDKLNFTGLFEFYKLLCVRGI IITSKTKSLD---EGYNKALNELCIKV	457
A7_JQ954969	NGQNT EINNMFNFTKLNFTGLFEFYKLLCVRGI IITSKTKSLD---EGYNKALNDLCIKV	457
A6_FJ981696	NGQNT EINNMFNFAKLKNFTGLFEFYKLLCVRGI IITSKTKSLD---KGYNKALNDLCIKV	457
A1_A5HZZ9	NGQNT EINNMFNFTKLNFTGLFEFYKLLCVRGI IITSKTKSLD---KGYNKALNDLCIKV	457
A5_EU679004	NGQNT EINNMFNFTKLNFTGLFEFYKLLCVRGI IITSKTKSLD---EGYNKALNDLCIKV	457
A3_DQ185900	NGQNT EINSRNFTRLKNFTGLFEFYKLLCVRGI IIPFKTKSLD---EGYNKALNYLCIKV	453
A2_X73423	NGQNT EINSRNFTRLKNFTGLFEFYKLLCVRGI IIPFKTKSLD---EGYNKALNDLCIKV	457
A8_KM233166	NGQNT EINSRNFTKLNFTGLFEFYKLLCVRGI IIPFKTKSLD---EGYNKALNDLCIKV	457
H_KGO15617	QQQNI GSDINSIKKLGQ-QGVVSRVRLCSNS-----NT-----KNSLCITV	441
E9_JX424534	RGQNP LN PRI ITPITD-RGLVKKI I RFCKNI -----VS----VKGIRK--SICIEV	429
E12_KM370319	RGQNP LN PRI ITPITG-RGLVKKI I RFCKNI -----VS----VKGIRK--SICIEV	432
E11_KF861875	RGQNT NLN PRI ITPITG-RGVVRKI I RFCTNI -----FS----PKGIRK--SICIEV	429
E10_KF861917	RGQNT NLN PRI ITPITG-RGLVKKI I RFCKNI -----VF----SKGITK--SICIEI	429
E7_JN695729	RGQNT NLN PRI ITPITG-RGLVKKI I RFCKNI -----VF----SKGITK--SICIEI	429
E8_JN695730	RGQNT NLN PRI ITPITG-RGLVKKI I RFCKNI -----VF----SKGITK--SICIEI	429
E5_AB037711	RGQNP LN PRI ITPITG-RGLVKKI I RFCKNI -----VS----VKGIRK--SICIEI	429
E6_AM695759	RGQNT NLN PRI ITPITG-RGLVKKI I RFCKNI -----VF----SKGIRK--SICIEI	429
E4_AB088207	RGQNP LN PRI ITPITG-RGLVKKI I RFCKNI -----VS----VKGIRK--SICIEI	429
E3_EF028403	RGQNP LN PRI ITPITG-RGLVKKI I RFCKNI -----VS----VKGIRK--SICIEI	429
E1_Q00496	RGQNP LN PRI ITPITG-RGLVKKI I RFCKNI -----VS----VKGIRK--SICIEI	429
E2_EF028404	RGQNP LN PRI ITPITG-RGLVKKI I RFCKNI -----VS----VKGIRK--SICIEI	429
F7_GU213233	NGQNI LN SRIVGPI PD-NGLVERFVGLCKSI -----VS----KKGTKN--SLCIKV	438
F5_GU213211	KGQVI GSDIDS IKKLEG-QGVVSRVRLCLNS-----SF----KKNTKK--PLCITV	445
F1_Q57236	RGQNI KLNPKI IDSIPD-KGLVEKIVKFCKSV-----IP----RKGTKAPPRLCIRV	448
F4_GU213214	RGQNI LN PKI IDSIPD-KGLVEKIVKLCKSI -----IP----RKGTKAPPRLCIRV	448
F2_GU213209	RGQNI LN PKI IDSIPD-KGLVEKIIKFCKSI -----IP----RKGTKQSPSLCIRV	448
F3_GU213227	RGQNI LN PKI IDSIPD-KGLVEKIIKFCKSI -----IP----RKGTKQSPSLCIRV	448
F6_M92906	RGQSI KLNPKI IDSIPD-KGLVEKIVKFCKSV-----IP----RKGTKAPPRLCIRV	448
T_P04958	KGQNM RVNTNAFRNVDG-SGLVSKLIGLCKKI I PPTNIRENLYNRTASLTDLGELCIKI	470

** : : : . * : :

D_P19321	KNNRLPYVADKDSISQE-IFENKIITDETNVQNYSDKF---SLDESILDGQVPINPEIVD	509
DC_AB745660	KNNTLPYVADKDSISQE-IFESQIITDETNVENYSDNF---SLDESILDAKVPTNPEAVD	509
C1_P18640	KNTDLPFIGDISDVKTD-IFLRKDKINEETEVIYYPDNV---SVDQVILSKNTS-EHGQLD	513
CD_AB200360	KNTDLPFIGDISDIKTD-IFLSKTDINEETEVIDYDPDNV---SVDQVILSKNTS-EHGQLD	513
G_Q60393	NNEDLFFIANKDSFSKD-LAKAETIAYNTQNNYIENNF---SIDQLILDNDLSSGID-L-	507
B4_EF051570	DNENLFFIADKNSFSDD-LSKNERVEYNTQNNYIGNDF---PINELILDTDLISKIE-L-	503
B8_JQ964806	DNEDLFFIADKNSFSDD-LSKNERIEYNTQSNYIENDF---SINELILDTDLISKIE-L-	503
B7_JQ354985	DNEDLFFIADKNSFSDD-LSKNERIEYNTKNIYIENYF---SINELILDTDLISGIE-L-	503
B6_AB302852	DNEDLFFIADKNSFSDD-LSKNERIEYDTQSNYIENRS---SIDELILDTNLISKIE-L-	503
B2_AB084152	DNEDLFFIADKNSFSDD-LSKNERIEYDTQSNYIENRS---SIDELILDTNLISKIE-L-	503
B3_EF028400	DNEDLFFIADKNSFSDD-LSKNERIEYDTQSNYIENRS---SIDELILDTNLISKIE-L-	503
B1_B1INP5	DNEDLFFIADKNSFSDD-LSKNERIEYNTQSNYIENDF---PINELILDTDLISKIE-L-	503
B5_EF033130	DNEDLFFIADKNSFSDD-LSKNERIAYNTQNNYIENDF---SINELILDTDLISKIE-L-	503
A4_EU341307	NNWDLFFSPSEDNFTND-LDKVEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENT-	515
A7_JQ954969	NNWDLFFSPSEDNFTND-LNKGEEITSDTNIEAAEENISSDLIQQYYLTFNFDNEPENI-	515
A6_FJ981696	NNWDLFFSPSEDNFTND-LNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENI-	515
A1_A5HZZ9	NNWDLFFSPSEDNFTND-LNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENI-	515
A5_EU679004	NNWDLFFSPSEDNFTND-LNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENI-	515
A3_DQ185900	NNWDLFFSPSEDNFTND-LDKVEEITADTNIEAAEENISSDLIQQYYLTFDFDNEPENI-	511
A2_X73423	NNWDLFFSPSEDNFTND-LDKVEEITADTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFDFDNEPENI-	515
A8_KM233166	NNWDLFFSPSEDNFTND-LDKVEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFDFDNEPENI-	515
H_KGO15617	NNRDLEFFIASQESYAGENTINTYKEIDDTTTLDPSEFEDILD----KVILNFNEQVIPQ-M-	495
E9_JX424534	NNGDLEFFVASEKSYNNDNSINIPKEIDDTVTLNNNYENDLD----QVILNFNSESAPG-L-	483
E12_KM370319	NNGELFFVASENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLD----QVILNFNSESAPG-L-	486
E11_KF861875	NNGELFFVASENSYNDDNINTSKEIDDTVTSNNNYENDLD----QVILNFNSESAPG-L-	483
E10_KF861917	NNGELFFVASENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLD----QVILNFNSESAPG-L-	483
E7_JN695729	NNGELFFVASENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLD----QVILNFNSESAPG-L-	483
E8_JN695730	NNGELFFVASENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLD----QVILNFNSESAPG-L-	483
E5_AB037711	NNGELFFVASENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLD----QVILNFNSESAPG-L-	483
E6_AM695759	NNGELFFVASENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLD----QVILNFNSESAPG-L-	483
E4_AB088207	NNGELFFVASENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLD----QVILNFNSESAPG-L-	483
E3_EF028403	NNGELFFVASENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLD----QVILNFNSESAPG-L-	483
E1_Q00496	NNGELFFVASENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLD----QVILNFNSESAPG-L-	483
E2_EF028404	NNGELFFVASENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLD----QVILNFNSESAPG-L-	483
F7_GU213233	NNRDLEFFVASESSYNENGINSPKEIDDTTITNNNYKKNLD----EVILDYNSDAIPN-L-	492
F5_GU213211	NNGDLEFFIASSEDSYGEDTINTPKEIDDTTTLVPSFKNILD----KVILDFNKQVTPQ-I-	499
F1_Q57236	NNRELEFFVASESSYNENDINTPKEIDDTTNLNNNYRNNLD----EVILDYNSETIPQ-I-	502
F4_GU213214	NNRELEFFVASESSYNENDINTPKEIDDTTNLNNNYRNNLD----EVILDYNSETIPQ-I-	502
F2_GU213209	NNRELEFFVASESSYNESDINTPKEIDDTTNLNNNYRNNLD----EVILDYNSETIPQ-I-	502
F3_GU213227	NNRELEFFVASESSYNESDINTPKEIDDTTNLNNNYRNNLD----EVILDYNSETIPQ-I-	502
F6_M92906	NNSELFFVASESSYNENDINTPKEIDDTTNLNNNYRNNLD----EVILDYNSQTIPO-I-	502
T_P04958	KNEDLTFIAEKNSFSEE-PFQDEIVSYNTKNKPLNFNY---SLDKIIVDYNLQSKIT-L-	524

. * * : . . . : : . : : .

D_P19321	PLLPNVNMEPL-----NLPGEEI-VFYDDITKYVD-YLNSYYYLESQKLSNNVENITLT	561
DC_AB745660	PLLPNVNMEPL-----NVPGEEE-VFYDDITKDVD-YLNSYYYLEAQKLSNNVENITLT	561
C1_P18640	LLYPSIDSESE-----ILPGENQ-VFYDNRTQNVD-YLNSYYYLESQKLSDNVEDFTFT	565
CD_AB200360	LLYPIIEGESQ-----VLPGENQ-VFYDNRTQNVD-YLNSYYYLESQKLSDNVEDFTFT	565
G_Q60393	---PNENTEFTNFDDIDIPVYIK--QSALKKIFVD-GDSLFEYLHAQTFFPSNIENLQLT	561
B4_EF051570	---PSENTESLTDNF-VDVPVYEK--QPAIKKVFVD-ENTIFQYLYSQTFFPLNIRDISLT	556
B8_JQ964806	---PSENTESLTDNF-VDVPVYEK--QPAIKKIFVD-ENTIFQYLYSQTFFPLDIRDISLT	556
B7_JQ354985	---PSENTESLTDNF-VDVPVYEK--QPAIKKIFVD-ENTIFQYLYSQTFFPLDIRDISLT	556
B6_AB302852	---PSENTESLTDNF-VDVPVYEK--QPAIKKFFVD-ENTIFQYLYSQTFFPLDIRDISLT	556
B2_AB084152	---PSENTESLTDNF-VDVPVYEK--QPAIKKIFVD-ENTIFQYLYSQTFFPLDIRDISLT	556
B3_EF028400	---PSENTESLTDNF-VDVPVYEK--QPAIKKIFVD-ENTIFQYLYSQTFFPLDIRDISLT	556
B1_B1INP5	---PSENTESLTDNF-VDVPVYEK--QPAIKKIFVD-ENTIFQYLYSQTFFPLDIRDISLT	556
B5_EF033130	---PSENTESLTDNF-VYVPVYK--QPAIKKIFVD-ENTIFQYLYSQTFFPLDIRDISLT	556
A4_EU341307	---SIENLSSD-IIG-QLEPMPNIERFPNGKKEYELN-KYTMFHYLRAQEFKHSNSRIILT	569
A7_JQ954969	---SIENLSSD-IIG-QLELMPNIERFPNGKKEYELD-KYTMFHYLRAQEFYEGNSRIVLI	569
A6_FJ981696	---SIENLSSD-IIG-QLELMPNIERFPNGKKEYELD-KYTMFHYLSAQEFEHGKSRIIDL	569
A1_A5HZZ9	---SIENLSSD-IIG-QLELMPNIERFPNGKKEYELD-KYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALT	569
A5_EU679004	---SIENLSSD-IIG-QLELMPNIERFPNGKKEYELD-KYTMFHYLRAQEFEHGKSRIVLT	569
A3_DQ185900	---SIENLSSD-IIG-QLEPMPNIERFPNGKKEYELD-KYTMFHYLRAQEFEHGDSRIILT	565
A2_X73423	---SIENLSSD-IIG-QLEPMPNIERFPNGKKEYELD-KYTMFHYLRAQEFEHGDSRIILT	569
A8_KM233166	---SIENLSSD-IIG-QLEPMPNIERFPNGKKEYELD-KYTMFHYLRAQEFEHSKSRIALT	569
H_KGO15617	---PNRNVSTD-IQKDNYPKYDSNGTSDIEQYDVS-ELNVFFYLDAQKVPPEGENNVNLT	551
E9_JX424534	---SDEKLNLT-IQDDAYIPKYDSNGTSDIEQYDVS-ELNVFFYLDAQKVPPEGENNVNLT	538
E12_KM370319	---SDEKLNLT-IQDDAYIPKYDSNGTSDIEQYDVS-ELNVFFYLDAQKVPPEGENNVNLT	541
E11_KF861875	---SDEKLNLT-IQDDAYIPKYDSNGTSDIEQYDVS-ELNVFFYLDAQKVPPEGENVDF	538
E10_KF861917	---SDEKLNLT-IQNDAYIPKYDSNGTSDIEQYDVS-ELNVFFYLDAQKVPPEGENNVNLT	538
E7_JN695729	---SDEKLNLT-IQNDAYIPKYDSNGTSDIEQYDVS-ELNVFFYLDAQKVPPEGENNVNLT	538
E8_JN695730	---SDEKLNLT-IQNDAYIPKYDSNGTSYIEQYDVS-ELNVFFYLDAQKVPPEGENNVNLT	538
E5_AB037711	---SDEKLNLT-IQNDAYIPKYDSNGTSDIEQYDVS-ELNVFFYLDAQKVPPEGENNVNLT	538
E6_AM695759	---SDEKLNLT-IQNDAYIPKYDSNGTSDIEQYDVS-ELNVFFYLDAQKVPPEGENNI	538
E4_AB088207	---SDEKLNLT-IQNDAYIPKYDSNGTSDIEQYDVS-ELNVFFYLDAQKVPPEGENNVNLT	538
E3_EF028403	---SDEKLNLT-IQNDAYIPKYDSNGTSDIEQYDVS-ELNVFFYLDAQKVPPEGENNVNLT	538
E1_Q00496	---SDEKLNLT-IQNDAYIPKYDSNGTSDIEQYDVS-ELNVFFYLDAQKVPPEGENNVNLT	538
E2_EF028404	---SDEKLNLT-IQNDAYIPKYDSNGTSDIEQYDVS-ELNVFFYLDAQKVPPEGENNVNLT	538
F7_GU213233	---SSRLNLT-AQNDYVVPKYDSNGTSEIKEYTVD-KLNVFFYLHAQKAPAGESAISLT	547
F5_GU213211	---PNRRIRTD-IQEDNYIPEYDSNGTSEIEEYVVD-DLNFFYLHAQKVPGETNISLT	554
F1_Q57236	---SNQTLNLT-VQDDSYVPRYDSNGTSEIEEHNVD-DLNVFFYLHAQKVPGETNISLT	557
F4_GU213214	---SSQTLNLT-VQDDSYVPRYDSNGTSEIEEHNVD-DLNFFYLHAQKVPGETNISLT	557
F2_GU213209	---SNRTLNLT-VQDNSYVPRYDSNGTSEIEEYDVV-DFNVFFYLHAQKVPGETNISLT	557
F3_GU213227	---SNRTLNLT-VQDNSYVPRYDSNGTSEIEEYDVV-DFNVFFYLHAQKVPGETNISLT	557
F6_M92906	---SNRTLNLT-VQDNSYVPRYDSNGTSEIEEYDVV-DFNVFFYLHAQKVPGETNISLT	557
T_P04958	---PNDRTTPVTKGIP-YAPEYKSNAASTIEIHND-DNTIYQYLYAQKSPTTLQRITMT	579

. : ** :*

D_P19321	TSVEEALGYSNKIYTFLLPSLA-EKVNKGVQAGLFLNWANEVVEDEFTTNIMKKDTLTKISD	620
DC_AB745660	TSVEEALGYSNKIYTFLLPSLA-EKVNKGVQAGLFLNWANEVVEDEFTTNIMKKDTLTKISD	620
C1_P18640	RSIEEALDNSAKVYTYFPTLA-NKVNAGVQGGFLMLWANDVVEDEFTTNILRKDTLTKISD	624
CD_AB200360	TSIEEALDNSGKVYTYFPKLA-DKVNITGVQGGFLMLWANDVVEDEFTTNILRKDTLTKISD	624
G_Q60393	NSLNDALRNNNKVYTFSSSTNLVEKANTVVGASLFLVNWVKGVIDDEFTSESTQKSTIDKVSD	621
B4_EF051570	SSFDDALLVSSKVVYFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVDDFVIEANKSSTMDKIAD	616
B8_JQ964806	SSFDDALLFSNKVYSSSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVDDFVIEANKSNTMDKIAD	616
B7_JQ354985	SSFDDALLFSNKVYSSSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIIDDVIEANKSSTMDKIAD	616
B6_AB302852	SSFDDALLFSNKVYSSSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVDDFVIEANKSNTMDKLIAD	616
B2_AB084152	SSFDDALLFSNKVYSSSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVDDFVIEANKSSTMDKIAD	616
B3_EF028400	SSFDDALLFSNKVYSSSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVDDFVIEANKSSTMDKIAD	616
B1_B1INP5	SSFDDALLFSNKVYSSSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVNDFVIEANKSNTMDKIAD	616
B5_EF033130	SSFDDALLFSNKVYSSSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVDDFVIEANKSSTMDKIAD	616
A4_EU341307	NSAKEALLKPNIVYTFSSSKYIKAINKAVEAVTFVNWIEENLVYDFTDETNEVSTMDKIAD	629
A7_JQ954969	NSVNEALLNPSVYTFSSSDYVKKANEATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTMDKIAD	629
A6_FJ981696	NSVNEALLNPSHVYTFSSSDYVKKVKNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIAD	629
A1_A5HZZ9	NSVNEALLNPSRVYTFSSSDYVKKVKNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIAD	629
A5_EU679004	NSVNEALLNPSVYTFSSSDYVRKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIAD	629
A3_DQ185900	NSAEEALLKPNVAYTFSSSKYVKKINKAVEAVIFLSWAEELVYDFTDETNEVTTMDKIAD	625
A2_X73423	NSAEEALLKPNVAYTFSSSKYVKKINKAVEAFMLFNWAEELVYDFTDETNEVTTMDKIAD	629
A8_KM233166	NSVNEALLNPSRVYTFSSSDYVKKVKNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIAD	629
H_KGO15617	SSFDTGLLEGSKVYTFSSSDFINNINKPVQALLFIEWVKQVIRDFTEATKTSTVDKIKD	611
E9_JX424534	SSIDTALLEQSKIYTFSSSEFINNVNKPVAALFVSWIQQVLVDFTTEATQKSTVDKIAD	598
E12_KM370319	SSIDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVAALFVSWIQQVLVDFTTEATQKSTVDKIAD	601
E11_KF861875	SSIDTALLEQPKIYTFSSSKFISNLNKTMQAALFVSWIQQVLVDFTTEATQKSTVDKIAD	598
E10_KF861917	SSIDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIAD	598
E7_JN695729	SSIDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIAD	598
E8_JN695730	SSIDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIAD	598
E5_AB037711	SSIDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIAD	598
E6_AM695759	SSIDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIAD	598
E4_AB088207	SSIDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIAD	598
E3_EF028403	SSIDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIAD	598
E1_Q00496	SSIDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIAD	598
E2_EF028404	SSIDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVAALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIAD	598
F7_GU213233	SSVNTALLDASKVYTFSSSDFINTVNKPVAALFISWIQQVINDFTTEATQKSTIDKIAD	607
F5_GU213211	SSIDTALSEESKVYTFSSSEFIDTINEPVNAALFIDWISKVIRDFTEATQKSTVDKIAD	614
F1_Q57236	SSIDTALSEESQVYTFSSSEFINTINKPVHAALFISWINQVIRDFTEATQKSTFDKIAD	617
F4_GU213214	SSIDTALSEESKVYTFSSSEFIDTINKPVNAALFIDWISKVIRDFTEATQKSTVDKIAD	617
F2_GU213209	SSIDTALLEESKVYTFSSSEFIDTINKPVNAALFIDWISKVIRDFTEATQKSTVDKIAD	617
F3_GU213227	SSIDTALLEESKVYTFSSSEFIDTINKPVNAALFIDWINKVIRDFTEATQKSTVDKIAD	617
F6_M92906	SSIDTALLEESKD-IFSSSEFIDTINKPVNAALFIDWISKVIRDFTEATQKSTVDKIAD	616
T_P04958	NSVDDALINSTKIYSYFPSVI-SKVNQGAQGILFLQWVRDIIDDEFTNESSQKTTIDKISD	638

* . . * : : * . * * : : * * . : . * * * : *

D_P19321	VSVIIPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLLGFPPEFTIPALGVFTFYSSIQ---	677
DC_AB745660	VSAIIPYIGPALNIGNSALRGNFKQAFATAGVAFLLGFPPEFTIPALGVFTFYSSIQ---	677
C1_P18640	VSAIIPYIGPALNINSVRRGNFTEAFVAVTGVVILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQ---	681
CD_AB200360	VSAIIPYIGPALNINSVRRGNFTEAFVAVTGVVILLEAFQEFPIPALGAFVIYSKVQ---	681
G_Q60393	VSIIIPYIGPALNVGNETAKENFKNAFEIIGGAAIIMEFIPELIVPIVGFFTLESYVG---	678
B4_EF051570	ISLIVPYIGLALNVGDETAKNFESAFEIAGSSILLEFIPELLIPVVGVFLLLESYID---	673
B8_JQ964806	ISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGSSILLEFIPELLIPVVGAFLLLESYID---	673
B7_JQ354985	ISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLLESYID---	673
B6_AB302852	ISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLLESYID---	673
B2_AB084152	ISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLLESYID---	673
B3_EF028400	ISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLLESYID---	673
B1_B1INP5	ISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLLESYID---	673
B5_EF033130	ISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLLESYID---	673
A4_EU341307	ITIVIPYIGPALNIGNMIYKGEFVEAII FSGAVILLEIVPEIALPVLGTFALVSVS---	686
A7_JQ954969	ITIIIPYIGPALNIGNMVYKKKFEEALIFSGAVILLEFVPEIVLPIVLTGTFALVSYTS---	686
A6_FJ981696	ITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIA---	686
A1_A5HZZ9	ITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIA---	686
A5_EU679004	ITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIA---	686
A3_DQ185900	ITIIIPYIGPALNIGNMVSKGEFVEAII FTVGVVALLEFIPEYSLPVFGTFAIVSYIA---	682
A2_X73423	ITIIIPYIGPALNIGNMLSKGEFVEAII FTVGVVAMLEFIPEYALPVFGTFAIVSYIA---	686
A8_KM233166	ITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIA---	686
H_KGO15617	ISLVVPYIGLALNIGDEIYKQHFAEAVELVGAGLLEFSPEFLIPTLLIFTIKGYLTGSI	671
E9_JX424534	ISIVVPYIGLALNIGNESQKGNFKDALELLGAGILLEFVPELLIPTILVFTIKSFLG-SS	657
E12_KM370319	ISIVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFVPELLIPTILVFTIKSFLG-SS	660
E11_KF861875	ISIVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFPELLIPIILVFTIKSFLG-SS	657
E10_KF861917	ISIVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFPELLIPTILVFTIKSFLG-SS	657
E7_JN695729	ISIVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFPELLIPTILVFTIKSFLG-SS	657
E8_JN695730	ISIVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFPELLIPTILVFTIKSFLG-SS	657
E5_AB037711	ISIVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFVPELLIPTILVFTIKSFLG-SS	657
E6_AM695759	ISIVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFPELLIPTILVFTIKSFLG-SS	657
E4_AB088207	ISIVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFPELLIPTILVFTIKSFLG-SS	657
E3_EF028403	ISIVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFPELLIPTILVFTIKSFLG-SS	657
E1_Q00496	ISIVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFPELLIPTILVFTIKSFLG-SS	657
E2_EF028404	ISIVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFPELLIPTILVFTIKSFLG-SS	657
F7_GU213233	ISLVVPYVGLALNIGNEVQKGNFKEAIELLGAGILLEFVPELLIPTILVFTIKSFIN-SD	666
F5_GU213211	ISLIVPYVGLALNIVNETEKNFKEAFELLGAGILLEFVPELAI PVILVFTIKSYID-SY	673
F1_Q57236	ISLVVPYVGLALNIGNEVQKENFKEAFELLGAGILLEFVPELLIPTILVFTIKSFIG-SS	676
F4_GU213214	ISLIVPYVGLALNIGNDARKGNFKEAFELLGAAI LLEVPELLIPVILVFTIKSFID-SS	676
F2_GU213209	ISLIVPYVGLALNIVIEAEKGNFEEAFELLGAGILLEFVPELTIPVILVFTIKSYID-SY	676
F3_GU213227	ISLIVPYVGLALNIVIEAEKGNFEEAFELLGAGILLEFVPELTIPVILVFTIKSYID-SY	676
F6_M92906	ISLIVPYVGLALNIIIEAEKGNFEEAFELLGVILGILFVPELTIPVILVFTIKSYID-SY	675
T_P04958	VSTIVPYIGPALNIVKQGYEGNFIGALETTGVVLLLEYIPEITLPEVIAALSIAESST---	695
	:: ::**:* ***: . . * * . * ::* * :* . : :	

D_P19321	-EREKIIKTIENCLEQRVKRWKDSYQWMVSNWLSRITTOFNHINYQMYDSL SYQADA IKA	736
DC_AB745660	-EREKIIKTIENCLEQRVKRWKDSYQWMVSNWLSRITTOFNHISYQMYDSL SYQADA IKA	736
C1_P18640	-ERNEI IKTIDNACLEQRIKRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNHISYQMYDSL NYQAGAIKA	740
CD_AB200360	-ERNEI IKTIDNACLEQRIKRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNHISYQMYDSL NYQADA IKA	740
G_Q60393	-NKGHIIMTISNALKKRDQKWTDMYGLIVSQWLSTVNTQFYTIKERMYNALNNQSQAIEK	737
B4_EF051570	-NKNKIIKTIIDNALT KRVEK WIDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEE	732
B8_JQ964806	-NKNKIIKTIIDNALT KRDEK WIDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEE	732
B7_JQ354985	-NKNKIIKTIIDNALT KRVEK WIDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEE	732
B6_AB302852	-NKNKIIKTIIDNALT KRDEK WIDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEE	732
B2_AB084152	-NKNKIIKTIIDNALT KRDEK WIDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEE	732
B3_EF028400	-NKNKIIKTIIDNALT KRDEK WIDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEE	732
B1_B1INP5	-NKNKIIKTIIDNALT KRNEK WSDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEE	732
B5_EF033130	-NKNKIIETINSALT KRDEK WIDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEE	732
A4_EU341307	-NKVLT VQ TIDNALS KRNEK WDEVYKYIVTNWLAI VNTQINLIREKMKKALENQA EATKA	745
A7_JQ954969	-NKVLT VRTIDNALS KRNEK WEEVYKYIVTNWLAKVNTQINLIRKKMKEALENQA EATKA	745
A6_FJ981696	-NKVLT VQ TINNALS KRNEK WDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIREKMKKALENQA EATKA	745
A1_A5HZZ9	-NKVLT VQ TIDNALS KRNEK WDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQA EATKA	745
A5_EU679004	-NKVLT VQ TIDNALS KRNEK WGEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQA EATKA	745
A3_DQ185900	-NKVLT VQ TINNALS KRNEK WDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIREKMKKALENQA EATRA	741
A2_X73423	-NKVLT VQ TINNALS KRNEK WDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIREKMKKALENQA EATKA	745
A8_KM233166	-NKVLT VQ TIDNALS KRNEK WDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLVRKKMKEALENQA EATKA	745
H_KGO15617	RDRDKI IKTLDNALNVRDQKWKEL YRWVVS KWLT TINTQFNKRKEQMYKALKNQATAIKK	731
E9_JX424534	DNKNKVIKAINNAL KERDEK WKEVYSFIVSNWITKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNALKT	717
E12_KM370319	DNKNKIIKAINNAL KERDEK WKEVYSFIVSNWITKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNAIKT	720
E11_KF861875	DNKNKVIKAINNAL KERDENWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNAIKT	717
E10_KF861917	DNKNKVIKAINNAL KERDEK WKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNALKT	717
E7_JN695729	DNKNKVIKAINNAL KERDEK WKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNAIKT	717
E8_JN695730	DNKNKVIKAINNAL KERDEK WKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNALKT	717
E5_AB037711	DNKNKVIKAINNAL KERDEK WKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNALKT	717
E6_AM695759	DNKNKVIKAINNAL KERDEK WKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNALKT	717
E4_AB088207	DNKNKVIKAINNAL KERDEK WKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNALKA	717
E3_EF028403	DNKNKVIKAINNAL KERDEK WKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNAIKT	717
E1_Q00496	DNKNKVIKAINNAL KERDEK WKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNAIKT	717
E2_EF028404	DNKNKVIKAINNAL KERDEK WKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNAIKT	717
F7_GU213233	DSKNKIIKAINNAL RERELK WKEVYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDGIKK	726
F5_GU213211	ENKNKIIKAINNS LIEREA KWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDAIKT	733
F1_Q57236	ENKNKIIKAINNS LMERETK WKEIYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDAIKT	736
F4_GU213214	KNEDKIIKAINNS LIEREA KWKEVYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDAIKT	736
F2_GU213209	ENKNKAIKAINNS LIEREA KWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDAIKT	736
F3_GU213227	ENKNKAIKAINNS LIEREA KWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDAIKT	736
F6_M92906	ENKNKAIKAINNS LIEREA KWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDAIKT	735
T_P04958	-QKEKIIKTIDNFLEKRYEKWIEVYKLVKAKWLGTVNTQFQKRSYQMYRSLEYQVDAIKK	754

.. : :... * * .* : * * : ** : * :*. * . .

D_P19321	VIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNIIILV--GEVDRLKAKVNESFENTMPFNIFSYTNNSSL	853
DC_AB745660	VIDELNKFDLKTTELINLIDSHNIIILV--GEVDRLKAKVNESFENTI PFNIFSYTNNSSL	853
C1_P18640	VIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNIIILV--GEVDKLLKAKVNNSFQNTI PFNIFSYTNNSSL	857
CD_AB200360	VIDELNKFDLKTTELINLIDSHNIIILV--GEVDRLKAKINESFENTI PFNIFSYTNNSSL	857
G_Q60393	AVKKLLKDFDNLKRDLLLEYIDTNELYL--LDEVNIIKSKVNRHLKDSI PFDLISLYTKDTIL	854
B4_EF051570	AVKKLLDFDNTLKKNNLLNYIDENKLYL--IGSVEDEKSKVDKYLKTI I PFDLSTYTNNEIL	849
B8_JQ964806	AVEKLLDFDNTLKKNNLLNYIDENKLYL--IGSAEYEKSKVDKHLKTI I PFDLISMYTNNTIL	849
B7_JQ354985	AIEKLLDFDNALKKNNLLNYIDENKLYL--IGSVEEEKSKVDKPFKTI I PFDLISMYTNNTIL	849
B6_AB302852	AVEKLLDFDNTLKKNNLLNYIDENKLYL--IGSAEYEKSKVDKHLKTI I PFDLISMYTNNTIL	849
B2_AB084152	AVEKLLDFDNTLKKNNLLNYIDENKLYL--IGSAEYEKSKVDKHLKTI I PFDLISMYTNNTIL	849
B3_EF028400	AVEKLLDFDNTLKKNNLLNYIDENKLYL--IGSAEYEKSKVDKHLKTI I PFDLISMYTNNTIL	849
B1_B1INP5	AVEKLLDFDNTLKKNNLLNYIDENKLYL--IGSAEYEKSKVNYKYLKTI I PFDLISYTNNDTIL	849
B5_EF033130	AVEKLLDFDNTLRKNLLNYIDENKLYL--IGSAEYEKSKVDKYLKTSI PFDLSTYTNNTIL	849
A4_EU341307	AVKRLKDFDASVRDVLLKYYIDNRGTLIGQ--VNRLKDKVNNTLSADI PFQLSKYVDNKKL	862
A7_JQ954969	GVKQLKDFDTSLRDSLLKYYIDNRGTLIGQ--VDRLKDKVNNTLSTDI PFQLSKYADNQR	862
A6_FJ981696	AVKRLKDFDASVRDVLLKYYIDNRGTLIGQ--VDRLKDKVNNTLSTDI PFQLSKYVDNQRL	862
A1_A5HZZ9	GVKRLEDFDASLKDALLKYYIDNRGTLIGQ--VDRLKDKVNNTLSTDI PFQLSKYVDNQRL	862
A5_EU679004	GVKRLEDFDASLKDALLKYYIDNRGTLIGQ--VDRLKDKVNNTLSTDI PFQLSKYVDNQRL	862
A3_DQ185900	AVKRLKDFDASVRDVLLKYYIDNRGTLILQ--VDRLKDEVNNTLSADI PFQLSKYVNDKKL	858
A2_X73423	AVKRLKDFDASVRDVLLKYYIDNRGTLVLQ--VDRLKDEVNNTLSADI PFQLSKYVDNKKL	862
A8_KM233166	AVKRLKDFDASVREVLLKYYIDNRGTLILQ--VDRLKDKVNNTLSADI PFQLSKYVDNKKL	862
H_KGO15617	TIQKLSYDDLVRRYLLGYIRNHSSILGNS--VEELNSKVNHLNNGI PFELSSYTNDSLL	850
E9_JX424534	KINKLREYDENVKTYLLDYITKHGSILGES--QQELNSMIDTLNNSI PFKLSSYTDKIL	836
E12_KM370319	KINKLREYDENVKTYLLNYIIQHGSTLGES--QQELNSMVIDTLNNSI PFKLSSYTDKIL	839
E11_KF861875	KINKLKEYDENVKTYLLDYIIKHGSILGES--QQELNSMVIDTLNNSI PFKLSSYTDKIL	836
E10_KF861917	KINKLREYDENVKTYLLDYIIKHGSILGES--QQELNSMVIDTLNNSI PFKLSSYTDKIL	836
E7_JN695729	KINKLREYDENVKTYLLNYIIQHGSILGES--QQELNSMVIDTLNNSI PFKLSSYTDKIL	836
E8_JN695730	KINKLREYDENVKTYLLDYIIKHGSILGES--QQELNSMVIDTLNNSI PFKLSSYTDKIL	836
E5_AB037711	KINKLREYDENVKTYLLDYIIQHGSILGES--QQELNSMVIDTLNNSI PFKLSSYTDKIL	836
E6_AM695759	KINKLREYDENVKTYLLDYIIKHGSILGES--QQELNSMVIDTLNNSI PFKLSSYTDKIL	836
E4_AB088207	KINKLREYDENVKTYLLDYIIKHGSILGES--QQELNSMVIDTLNNSI PFKLSSYTDKIL	836
E3_EF028403	KINKLREYDENVKTYLLNYIIQHGSILGES--QQELNSMVIDTLNNSI PFKLSSYTDKIL	836
E1_Q00496	KINKLREYDENVKTYLLNYIIQHGSILGES--QQELNSMVIDTLNNSI PFKLSSYTDKIL	836
E2_EF028404	KINKLREYDENVKTYLLNYIIQHGSILGES--QQELNSMVIDTLNNSI PFKLSSYTDKIL	836
F7_GU213233	KINKLSEYDKRVNQYLLNYILENSSTLGTSSVQELNLSNTLNNSI PFELSEYTNDKIL	846
F5_GU213211	EVGKLEKEYDKRVKRHLLEYIFDYRLILGEQ--GGELIDLVTSTLNTSI PFELSSYTNDKIL	852
F1_Q57236	KVSKLREYDEGVKEYLLDYISEHRSILGNS--VQELNDLVTSTLNSI PFELSSYTNDKIL	855
F4_GU213214	KVSELREYDEGVKEYLLDYILKNGSILGDH--VQELNDLVTSTLNSI PFELSSYTNDKIL	855
F2_GU213209	EVGKLEKEYDKHVKSDDLNYILYHKLILGEQ--TKELIDLVTSTLNSI PFELSSYTNDKIL	855
F3_GU213227	EVGKLEKEYDKHVKSDDLNYILYHKLILGDQ--TKELIDLVTSTLNSI PFELSSYTNDKIL	855
F6_M92906	KVGKLEKEYDKHVKSDDLNYILYHKLILGEQ--TNELSDLVTSTLNSI PFELSSYTNDKIL	854
T_P04958	AKKQLLEFDTQSKNIMQYIKANSKFIGITELKKLESKINKVFSTPI PFSYSKNLDC--W	870

. * . : * : : . : * . .

D_P19321	KDIINEYFNSINDSKILSLQNK---NALVDTSGYNAEVRVGDNVQL-NTIYTNDFKLSSS	910
DC_AB745660	KDMINEYFNSINDSKILSLQNK--NTLMDTSGYNAEVRVEGNVQL-NPIFFPFDKLGSS	910
C1_P18640	KDIINEYFNININDSKILSLQNRK--NTLVDTSGYNAEVSSEGDVQL-NPIFFPFDKLGSS	914
CD_AB200360	KDIINEYFNSINDSKILSLQNK---NALVDTSGYNAEVRLEGDVQV-NTIYTNDFKLSSS	914
G_Q60393	IQVFNNYISNISSNAILSLSYRG--GRLIDSSGYGATMNVGSDVI F-NDIGNGQFKLNNS	911
B4_EF051570	IKIFNKYNS <u>EILNNI</u> ILNLRYPD---NNLIDLSGYGAKVEVYDGVKL-ND--KNQFKLTSS	904
B8_JQ964806	IKMVNKYNS <u>EILNNI</u> ILNLRYPD--NNLIDLSGYGANVEVYDGVEL-ND--KNQFKLTSS	904
B7_JQ354985	IEMVNKYNS <u>EILNNI</u> ILNLRYPD--NNLIDSSGYGAKVEVYNGVEL-ND--KNQFKLTSS	904
B6_AB302852	IEIFNKYNS <u>EILNNI</u> ILNLRYPD--NNLIDLSGYGANVEVYDGVEL-ND--KNQFKLTSS	904
B2_AB084152	IEIFNKYNS <u>EILNNI</u> ILNLRYPD--NNLIDLSGYGANVEVYDGVEL-ND--KNQFKLTSS	904
B3_EF028400	IEIFNKYNS <u>EILNNI</u> ILNLRYPD--NNLIDLSGYGAKVEVYNGVEL-ND--KNQFKLTSS	904
B1_B1INP5	IEMFNKYNS <u>EILNNI</u> ILNLRYPD--NNLIDLSGYGAKVEVYDGVEL-ND--KNQFKLTSS	904
B5_EF033130	IEIFNKYNS <u>DILNNI</u> ILNLRYPD--NKLIDLSGYGAKVEVYDGVKL-ND--KNQFKLTSS	904
A4_EU341307	LSTFTEYIK <u>NITNAS</u> ILSIVYKD--DDLIDLSRYGAEIYNGDKVYY-NSIDKNQIRLINL	919
A7_JQ954969	LSTFTEYIK <u>NIINTS</u> ILNLRYES--NHLIDLSRYASKINIGSRVNF-DPIDKNQIQLFNL	919
A6_FJ981696	LSTFTEYIK <u>NIINTS</u> ILNLRYES--NHLIDLSRYASKINIGSRVNF-DPIDKNQIQLFNL	919
A1_A5HZZ9	LSTFTEYIK <u>NIINTS</u> ILNLRYES--NHLIDLSRYASKINIGSKVNF-DPIDKNQIQLFNL	919
A5_EU679004	LSTFTEYIK <u>NIINTS</u> ILNLRYES--NHLIDLSRYASEINIGSKVNF-DPIDKNQIQLFNL	919
A3_DQ185900	LSTFTEYIK <u>NIIVNTS</u> ILSIVYK--DDLIDLSRYGAKINIGDRVYY-DSIDKNQIKLINL	915
A2_X73423	LSTFTEYIK <u>NIIVNTS</u> ILSIVYK--DDLIDLSRYGAKINIGDRVYY-DSIDKNQIKLINL	919
A8_KM233166	LSTFTEYIK <u>NITNTS</u> ILSIVVDKD-GRLIDLSRYGAEIYNGDKVSY-NSIDKNQIKLINL	920
H_KGO15617	IRYFNKNY <u>GELKYNC</u> ILNIKIYEMDRDKLVDSSGYRSRINIGTVKVF-SEIDKNQVQLSNL	909
E9_JX424534	ISYFNKFFK <u>TIKSSS</u> VLMRMRYKN--DKYIDTSGYDSNININGDVFI-YPTNKNQFGIYNS	893
E12_KM370319	ISYFNKFFK <u>RIKSSS</u> VLMRMRYKN--DKYVDTSGYDSNININGEIFI-YPTNKNQFSIFNS	896
E11_KF861875	ISYFNKFFK <u>TIKSSS</u> VLMRMRYKN--DKYIDTSGYDSNINIKGDVFI-YPTNKNQFGIYNN	893
E10_KF861917	ISYFNKFFK <u>RIKSSS</u> VLMRMRYKN--DKYVDTSGYDSNININGDVYK-YPTNKNQFGIYND	893
E7_JN695729	ISYFNKFFK <u>RIKSSS</u> VLMRMRYKN--DKYVDTSGYDSNININGDVYK-YPTNKNQFGIYND	893
E8_JN695730	ISYFNKFFK <u>RIKSSS</u> VLMRMRYKN--DKYVDTSGYDSNININGDVYK-YPTNKNQFGIYND	893
E5_AB037711	ISYFNKFFK <u>RIKSSS</u> VLMRMRYKN--DKYVDTSGYDSNININGEIFI-YPTNKNQFTIFNS	893
E6_AM695759	ISYFNKFFK <u>RIKSSS</u> VLMRMRYKN--DKYVDTSGYDSNININGDVYK-YPTNKNQFGIYNN	893
E4_AB088207	ISYFNKFFK <u>RIKSSS</u> VLMRMRYKN--DKYVDTSGYDSNININGDVYK-YPTNKNQFGIYND	893
E3_EF028403	ISYFNKFFK <u>RIKSSS</u> VLMRMRYKN--DKYVDTSGYDSNININGDVYK-YPTNKNQFGIYND	893
E1_Q00496	ISYFNKFFK <u>RIKSSS</u> VLMRMRYKN--DKYVDTSGYDSNININGDVYK-YPTNKNQFGIYND	893
E2_EF028404	ISYFNKFFK <u>RIKSSS</u> VLMRMRYKN--DKYVDTSGYDSNININGDVYK-YPTNKNQFGIYND	893
F7_GU213233	ISYFNRFYK <u>RIIDSS</u> ILNRMKYEN--NRFIDSSGYGSNISINGDIYI-YSTNRNQFGIYSS	903
F5_GU213211	IIFYNRLYK <u>KIKDSS</u> ILDMRYEN--NKFIDISGYGSNISINGNVYI-YSTNRNQFGIYDD	909
F1_Q57236	IIFYNKLYK <u>KIKDNS</u> ILDMRYEN--NKFIDISGYGSNISINGDVYI-YSTNRNQFGIYSS	912
F4_GU213214	IIFYNKLYK <u>KIKDNC</u> ILDMRYEN--NKFIDISGYGSNISINGELYI-YTTNRNQFTIYSG	912
F2_GU213209	IIFYNRLYK <u>KIKDSS</u> ILDMRYEN--NKFIDISGYGSNISINGNVYI-YSTNRNQFGIYSG	912
F3_GU213227	IIFYNRLYK <u>KIKDSS</u> ILDMRYEN--NKFIDISGYGSNISINGNVYI-YSTNRNQFGIYSD	912
F6_M92906	IIFYNRLYK <u>KIKDSS</u> ILDMRYEN--NKFIDISGYGSNISINGNVYI-YSTNRNQFGIYNS	911
T_P04958	VDNEEDIDV <u>ILKKST</u> ILNLDINN--DIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGKAIHLVNN	928

: * : . * * : : :

D_P19321	GD---KIIIVNLNNNIIYSAIYENSSVSFWIKISKDLT-----NSHNEYTIINSIEQ-----	958
DC_AB745660	GDRGKVIIVTQONENIVYNAMYESFSISFWIRINKWVS-----N-LPGYTIIDSVKN-----	960
C1_P18640	GDRGKVIIVTQONENIVYNAMYESFSISFWIRINKWVS-----N-LPGYTIIDSVKN-----	964
CD_AB200360	GD---KIIIVNLNNNIIYSAIYENSSVSFWIKISKDLT-----NSHNEYTIINSIKQ-----	962
G_Q60393	EN--SNITAHQSKFVVYDSMFDNFSINFVVRTPKYNNNDIQTYLQNEYTIISCIKN-----	965
B4_EF051570	AD--SKIRVTQONQNIIFNSMFLDFSVSFWIRIPKYRNDDIQNYIHNEYTIINCMKN-----	958
B8_JQ964806	TN--SEIRVTQONQNIIVNSMFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKN-----	958
B7_JQ354985	AN--SKIKVTQONQNIIFNSMFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKN-----	958
B6_AB302852	TN--SEIRVTQONQNIIFNSMFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCIKN-----	958
B2_AB084152	TN--SEIRVTQONQNIIFNSMFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCIKN-----	958
B3_EF028400	AN--SKIRVTQONQDIIFNSMFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCIKN-----	958
B1_B1INP5	AN--SKIRVTQONQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKN-----	958
B5_EF033130	AN--SKIRVIQONQNIIFNSMFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKN-----	958
A4_EU341307	ES--STIEVILKKAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFN-SI--SLNNEYTIINCMEN-----	970
A7_JQ954969	ES--SKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIKIPKYFS-KI--NLNNEYTIINCIEN-----	970
A6_FJ981696	ES--SKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIKIPKYFS-EI--SLNNEYTIINCIEN-----	970
A1_A5HZZ9	ES--SKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFN-SI--SLNNEYTIINCMEN-----	970
A5_EU679004	ES--SKIEIILKNAIVYNSMYENFSTSFWIKIPKYFS-KI--NLNNEYTIINCIEN-----	970
A3_DQ185900	ES--STIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIKIPKYFS-KI--NLNNEYTIINCIEN-----	966
A2_X73423	ES--STIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIKIPKYFS-KI--NLNNEYTIINCIEN-----	970
A8_KM233166	ES--SAIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIKIPKYFS-KI--NLNNEYTIINCIEN-----	971
H_KGO15617	ES--SKIEVILNNGVIYNSMYENFSTSFWIRIPKYFR-----NINNEYKIIISCMQN-----	958
E9_JX424534	KL--SEVNI SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRI PNYNNKIV--NVNNEYTIINCMRDN---	946
E12_KM370319	KP--SEVNI SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRI PNYDNKIV--NVNNEYTIINCMRDN---	949
E11_KF861875	KL--SEVNI SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRI PNYDNKIV--NVNNEYTIINCMRDN---	946
E10_KF861917	KL--SEVNI SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRI PNYDNKIV--NVNNEYTIINCMRDN---	946
E7_JN695729	KL--SEVNI SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRI PNYDNKIV--NVNNEYTIINCMRDN---	946
E8_JN695730	KL--SEVNI SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRI PNYDNKIV--NVNNEYTIINCMRDN---	946
E5_AB037711	KP--SEVNI SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRI PNYDNKIV--NINNEYTIINCMRDN---	946
E6_AM695759	KL--SEVNI SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRI PNYDNKIV--NVNNEYTIINCMRDN---	946
E4_AB088207	KL--SEVNI SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRI PNYDNKIV--NVNNEYTIINCMRDN---	946
E3_EF028403	KL--SEVNI SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRI PNYDNKIV--NVNNEYTIINCMRDN---	946
E1_Q00496	KL--SEVNI SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRI PNYDNKIV--NVNNEYTIINCMRDN---	946
E2_EF028404	KL--SEVNI SQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRI PNYDNKIV--NVNNEYTIINCMRDN---	946
F7_GU213233	RL--SEVNI TQNNTIIYNSRYQNFSVSFWVRI PKYNN-LK--NLNNEYTIINCMRNN---	955
F5_GU213211	RL--SEVNIAQNNDIIYNSRYQNFSISFWVRI PKHYR-PM--NHNREYTIINCMGNN---	961
F1_Q57236	KP--SEVNIAQNNDIIYNGRYQNFSISFWVRI PKYFN-KV--NLNNEYTIIDCIRNN---	964
F4_GU213214	KL--SEVNIAQNNDIIYNSRYQNFSISFWVRI PRYSN-IV--NLNNEYTIINCMGNN---	964
F2_GU213209	RL--SEVNIAQNNDIIYNSRYQNFSISFWVRI PKHYR-PM--NRNREYTIINCMGNN---	964
F3_GU213227	RL--SEVNIAQNNDIIYNSRYQNFSISFWVRI PKHYG-PM--NRNREYTIINCMGNN---	964
F6_M92906	RL--SEVNIAQNNDIIYNSRYQNFSISFWVRI PKHYK-PM--NHNREYTIINCMGNN---	963
T_P04958	ES--SEVIVHKAMDIEYNDMFTVSVFWLRV PKVSASHLEQYGTNEYSIISSMKKHSLS	986

: : . : . : .**:: . *..*..: .

D_P19321	-NSGWKLCIRN----	GNIEWILQDVNRKYKSLIFDYSELSHGTGNKWFVVTITNNIMG	1013
DC_AB745660	-NSGWSIGIIS----	NFLVFTLQKQENSEQDINFSDISKNAAGY--NKWFFVTITNMMG	1014
C1_P18640	-NSGWSIGIIS----	NFLVFTLQKQINDESEQSINFSDISNNAPGY--NKWFFVTITNMMG	1018
CD_AB200360	-NSGWKLCIRN----	GNIEWILQDVNRKYKSLIFDYSELSHGTGNKWFVVTITNNIMG	1017
G_Q60393	-DSGWKVSIGK----	NRIIWTLLIDVNAKSKSIFFEYSIKDNISDYINKWFSITITNDRLG	1020
B4_EF051570	-NSGWKISIRG----	NRIIWTLLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWFVVTITN-NLD	1012
B8_JQ964806	-NSGWKISIRG----	NRIIWTLLIDINGKIKSVFFEYSIRKDVSEYINRWFVVTITN-NLD	1012
B7_JQ354985	-NSGWKISIRG----	NRIIWTLLTDINGKTKSVFFEYSIREDISDYINRWFVVTITN-NLD	1012
B6_AB302852	-NSGWKISIRG----	NRIIWTLLTDINGKTKSVFFEYSIREDISDYINRWFVVTITN-NSD	1012
B2_AB084152	-NSGWKISIRG----	NRIIWTLLTDINGKTKSVFFEYSIREDISDYINRWFVVTITN-NSD	1012
B3_EF028400	-NSGWKISIRG----	NKIIWTLLTDINGKTKSVFFEYSIRKDVSEYINRWFVVTITN-NSD	1012
B1_B1INP5	-NSGWKISIRG----	NRIIWTLLIDINGKTKSVFFEYNIREDISEYINRWFVVTITN-NLN	1012
B5_EF033130	-NSGWKISIRG----	NMIIWTLLIDINGKIKSVFFEYSIKEDISEYINRWFVVTITN-NSD	1012
A4_EU341307	-NSGWKIVSLNY----	GEIIWTFQDTQEIKQRVVFYKYSQMINISDYINRWFVVTITNNRIT	1025
A7_JQ954969	-NSGWKIVSLNY----	GEIIWTLQDNQNIQRVVFYKYSQMVNISDYINRWFVVTITNNRIT	1025
A6_FJ981696	-NSGWKIVSLNY----	GEIIWTLQDNQNIQRVVFYKYSQMVNISDYINRWFVVTITNNRIT	1025
A1_A5HZZ9	-NSGWKIVSLNY----	GEIIWTLQDTQEIKQRVVFYKYSQMINISDYINRWFVVTITNNRLN	1025
A5_EU679004	-NSGWKIVSLNY----	GEIIWTLQDNQNIQRVVFYKYSQMVNISDYINRWFVVTITNNRLN	1025
A3_DQ185900	-NSGWKIVSLNY----	GEIIWTLQDNQNIQRVVFYKYSQMVNISDYINRWFVVTITNNRIT	1021
A2_X73423	-NSGWKIVSLNY----	GEIIWTLQDNQNIQRVVFYKYSQMVNISDYINRWFVVTITNNRIT	1025
A8_KM233166	-NSGWKIVSLNY----	GEIIWTLQDNQNIQRVVFYKYSQMVNISDYINRWFVVTITNNRIT	1026
H_KGO15617	-NSGWEVSLNFSNMNSKI	IWTLQDTEGIIKKTVVFQYQTNINISDYINRWFVVTITNNRIS	1017
E9_JX424534	-NSGWKISLNH----	NEIIWTLQDNAGINQKLVFKYGNANGISDYINKWIFVVTITNDRLG	1001
E12_KM370319	-NSGWKIVSLNH----	NEIIWTLQDNAGINQKLVFKYGNANGISDYINKWIFVVTITNDRLG	1004
E11_KF861875	-NSGWKIVSLNH----	NEIIWTLQDNAGINQKLVFKYGNANGISDYINKWIFVVTITNDRLG	1001
E10_KF861917	-NSGWKIVSLNH----	NEIIWTLQDNAGINQKLVFKYGNANGISDYINKWIFVVTITNDRLG	1001
E7_JN695729	-NSGWKIVSLNH----	NEIIWTLQDNAGINQKLVFKYGNANGISDYINKWIFVVTITNDRLG	1001
E8_JN695730	-NSGWKIVSLNH----	NEIIWTLQDNAGINQKLVFKYGNANGISDYINKWIFVVTITNDRLG	1001
E5_AB037711	-NSGWKIVSLNH----	NEIIWTLQDNARINQKLVFKYGNANGISDYINKWIFVVTITNDRLG	1001
E6_AM695759	-NSGWKIVSLNH----	NEIIWTLQDNAGINQKLVFKYGNANGISDYINKWIFVVTITNDRLG	1001
E4_AB088207	-NSGWKIVSLNH----	NEIIWTLQDNAGINQKLVFKYGNANGISDYINKWIFVVTITNDRLG	1001
E3_EF028403	-NSGWKIVSLNH----	NEIIWTLQDNAGINQKLVFKYGNANGISDYINKWIFVVTITNDRLG	1001
E1_Q00496	-NSGWKIVSLNH----	NEIIWTLQDNAGINQKLVFKYGNANGISDYINKWIFVVTITNDRLG	1001
E2_EF028404	-NSGWKIVSLNH----	NEIIWTLQDNAGINQKLVFKYGNANGISDYINKWIFVVTITNDRLG	1001
F7_GU213233	-NSGWKISLNY----	NNIIWTLQDTTGNQKLVFNFTQMI DISDYINKWTFVVTITNNRLG	1010
F5_GU213211	-NSGWKISLRTTG-	DCEIIWTLQDTSGNKKKLI FRYSQLGGISDYINKWIFVVTITNNRLG	1019
F1_Q57236	-NSGWKISLNY----	NKIIWTLQDTAGNNQKLVFNFTQMISISDYINKWIFVVTITNNRLG	1019
F4_GU213214	-NSGWKISLNY----	NKIIWTLQDTAGNNEKLVFNFTQMISISDYINKWIFVVTITNNRLG	1019
F2_GU213209	-NSGWKISLRTIR-	DCEIIWTLQDTSGNKKKLI FRYEELASISDYINKWIFVVTITNNRLG	1022
F3_GU213227	-NSGWKISLRNIR-	DCEIIWTLQDTSGNKKKLI FRYEELANISDYINKWIFVVTITNNRLG	1022
F6_M92906	-NSGWKISLRTVR-	DCEIIWTLQDTSGNKENLI FRYEELNRI SNYINKWIFVVTITNNRLG	1021
T_P04958	IGSGWSVSLKG----	NNLIWTLKDSAGEVRQITFRDLDPKFNAYLANKWVVTITNDRLS	1042

.***.: : : : . : * *: * :*:*

D_P19321	YMKLYINGELKQSQKIEDLDEVKLDKTIVFGIDE-----NIDENQMLWIRDFNIFSK	1065
DC_AB745660	NMMIYINGKLIDTIKVKELTGINFSKTITFQMNKIPTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAK	1074
C1_P18640	NMKIYINGKLIDTIKVKELTGINFSKTITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAK	1078
CD_AB200360	YMKLYINGELKQSERIEDLDEVKLDKTIVFGIDEN-----IDENQMLWIRDFNIFSK	1069
G_Q60393	NANIYINGSLKKSEKILNLDRLNSSNDIDFKLINC-----TDTTKFVWIKDFNIFGR	1072
B4_EF051570	NAKIYINGTLESNMDIKDIGEVIVNGEITFKLDGD-----VDRTQFIWMKYFSIFNT	1064
B8_JQ964806	NAKIYINGKLESNMDIRDIRREVIANGEIIFKLDGD-----IDRTQFIWMKYFSIFNT	1064
B7_JQ354985	NAKIYINGKLESNIDIRDIRREVIIVNGEIIFKLDGE-----IDRTQFIWMKYFSIFNT	1064
B6_AB302852	NAKIYINGKLESNIDIKDIGEVIANGEIIFKLDGD-----IDRTQFIWMKYFSIFNT	1064
B2_AB084152	NAKIYINGKLESNIDIKDIGEVIANGEIIFKLDGD-----IDRTQFIWMKYFSIFNT	1064
B3_EF028400	NAKIYINGKLESNIDIKDIGEVIANGEIIFKLDGD-----IDRTQFIWMKYFSIFNT	1064
B1_B1INP5	NAKIYINGKLESNTDIKDIRREVIANGEIIFKLDGD-----IDRTQFIWMKYFSIFNT	1064
B5_EF033130	NAKIYINGKLESHIDIRDIRREVIANDEIIFKLDGN-----IDRTQFIWMKYFSIFNT	1064
A4_EU341307	KSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNKIMFKLDGC-----RDPHRYIVIKYFNLFDK	1077
A7_JQ954969	KSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNKIMFKLDGC-----RDPHRYILIKYFNLFDK	1077
A6_FJ981696	KSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNKIMFKLDGC-----RDPHRYIMIKYFNLFDK	1077
A1_A5HZZ9	NSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGC-----RDTHRYIWIKYFNLFDK	1077
A5_EU679004	NSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGC-----RDPHRYIWIKYFNLFDK	1077
A3_DQ185900	KSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNKIMFKLDGC-----RDPHRYIMIKYFNLFDK	1073
A2_X73423	KSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNKIMFKLDGC-----RDPHRYIMIKYFNLFDK	1077
A8_KM233166	KSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGC-----RDPHRYIVIKYFNLFDK	1078
H_KGO15617	NSKIYINGRLINEESISDLGNIHASNNIMFKLDGC-----RDPHRYIWIKYFNLFDK	1069
E9_JX424534	YSKLYINGHLIDQKSILNLGNIHVSDNILFKIVNC-----SY-TRYIGMRYFNIFDK	1052
E12_KM370319	DSKLYINGNLIDQKSILNLGNIHVSDNILFKIVNC-----SY-TRYIGIRYFNIFDK	1055
E11_KF861875	DSKLYINGNLIDKKSILNLGNIHVSDNILFKIVNC-----SY-TRYIGMRYFNIFDK	1052
E10_KF861917	DSKLYINGNLIDKKSILNLGNIHVSDNILFKIVNC-----SY-TRYIGMRYFNIFDK	1052
E7_JN695729	DSKLYINGNLIDQKSILNLGNIHVSDNILFKIVNC-----SY-TRYIGIRYFNIFDK	1052
E8_JN695730	DSKLYINGNLIDKKSILNLGNIHVSDNILFKIVNC-----SY-TRYIGIRYFNIFDK	1052
E5_AB037711	DSKLYINGHLIDQKSILNLGNIHVSDNILFKIVNC-----SY-TRYIGIRYFNIFDK	1052
E6_AM695759	DSKLYINGNLIDKKSILNLGNIHVSDNILFKIVNC-----SY-TRYIGIRYFNIFDK	1052
E4_AB088207	DSKLYINGNLIDKKSILNLGNIHVSDNILFKIVNC-----SY-TRYIGIRYFNIFDK	1052
E3_EF028403	DSKLYINGNLIDQKSILNLGNIHVSDNILFKIVNC-----SY-TRYIGIRYFNIFDK	1052
E1_Q00496	DSKLYINGNLIDQKSILNLGNIHVSDNILFKIVNC-----SY-TRYIGIRYFNIFDK	1052
E2_EF028404	DSKLYINGNLIDQKSILNLGNIHVSDNILFKIVNC-----SY-TRYIGIRYFNIFDK	1052
F7_GU213233	HSKLYINGNLTDQKSILNLGNIHVDDNILFKIVGC-----ND-TRYVGIYFKVFNFM	1061
F5_GU213211	NSRIYINGNLIVEKISISNLGDIHVSDNILFKIVGC-----DD-KMYVGIYFKVFNT	1070
F1_Q57236	NSRIYINGNLIDEKISISNLGDIHVSDNILFKIVGC-----ND-TRYVGIYFKVFDT	1070
F4_GU213214	NSRIYINGNLIDQKSISISNLGDIHVSDNILFKIVGC-----ND-TRYVGIYFKVFDT	1070
F2_GU213209	NSRIYINGNLIVEKISISNLGDIHVSDNILFKIVGC-----DD-ETYVGIYFKVFNT	1073
F3_GU213227	NSRIYINGNLIVEKISISNLGDIHVSDNILFKIVGC-----DD-KTYVGIYFKVFNT	1073
F6_M92906	NSRIYINGNLIVEKISISNLGDIHVSDNILFKIVGC-----DD-ETYVGIYFKVFNT	1072
T_P04958	SANLYINGVLMGSAEITGLGAIREDNITLKLDR-----NNNNQYVSIKDFRIFCK	1094

:**** * : : . * : : : : * :*

D_P19321	-----LVQYPDRSKLYTGNPITIKSVS----	DKNPYSRIILNGDNI I-LHMLYNS-RKY	1166
DC_AB745660	-----FNTRKNNDFNEGYKII IKRII---	GNTNDTRVR-GENVLYFNTTIDN-KQY	1175
C1_P18640	-----FNTRRNNDFNEGYKII IKRIR---	GNTNDTRVRGGDI-LYFDMTINN-KAY	1179
CD_AB200360	-----LVQYSDISKLYTKNPITIKSAA----	NKNPYSRIILNGDD-IMFHMLYDS-REY	1170
G_Q60393	-PRTNFN--NAAINYQNLYLGLRFIIKKASNRNINNDNIVREGDY-IYLNIDNISDESY		1186
B4_EF051570	-IRSKYNQNSNYINYRNLYIGEKFIIKRKSNSQSIN-DDIVRKEDY-IHLDFVNSN-EEW		1178
B8_JQ964806	-TRSKYNQNSQYINYRDLYIGEKFIIKRKSNSQSIN-DDIVRKEDY-IYLDFFNLN-QEW		1178
B7_JQ354985	-TRSKYNQNSNYINYRNLYIGEKFIIKRKSSSQSIS-DDIVRKEDY-IYLDFFNSN-REW		1178
B6_AB302852	-TRSKYNQNSNYINYRNLYIGEKFIIKRKSNSQSIN-DDIVRKEDY-IYLDFFNLN-QEW		1178
B2_AB084152	-TRSKYNQNSNYINYRNLYIGEKFIIKRKSNSQSIN-DDIVRKEDY-IYLDFFNSN-REW		1178
B3_EF028400	-TRSKYNQNSNYINYRNLYIGEKFIIKRKSNSQSIN-DDIVRKEDY-IYLDFFNLN-QEW		1178
B1_B1INP5	-TRSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIIKRKSNSQSIN-DDIVRKEDY-IYLDFFNLN-QEW		1178
B5_EF033130	-TRSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIIKRKSNSQSIN-DDIVRKEDY-IYLDFFNLN-QEW		1178
A4_EU341307	GPRDNVMTTNIYLN-SSLYMGTKFIIKKYA---	SGNKDNIVRNDR-VYINVVKN-KEY	1191
A7_JQ954969	GPRGSVTTNIYLN-SMLYMGTKFIIKKHA---	SGNKDNIVRNDR-VYINVLVKN-KEY	1191
A6_FJ981696	GSRSTLLTTNIYLN-SGLYMGTKFIIKKYA---	SGNKDNIVRNDR-VYINVVVN-KEY	1191
A1_A5HZZ9	GPRGSVMTTNIYLN-SSLYRGTKFIIKKYA---	SGNKDNIVRNDR-VYINVVKN-KEY	1191
A5_EU679004	GPRGSIVTTNIYLN-SSLYMGTKFIIKKYA---	SGNKDNIVRNDR-VYINVVKN-KEY	1191
A3_DQ185900	GPRGSVMTTNIYLN-STLYMGTKFIIKKYA---	SGNEDNIVRNDR-VYINVVKN-KEY	1187
A2_X73423	GPRGSVTTNIYLN-STLYEGTKFIIKKYA---	SGNEDNIVRNDR-VYINVVKN-KEY	1191
A8_KM233166	GPRGSVTTNIYLN-STLYMGTKFIIKKYA---	SGNKDNIVRNDR-VYINVVKN-KEY	1192
H_KGO15617	GPRGRIVTTNIYLN-STLYMGTKFIIKKYA---	SGNKDNIVRNDR-VYINVVKN-KEY	1183
E9_JX424534	NNR-----NIVNGL-YRLYSGIKVKIQKIN--	DSDTRDNIVRDNDQ-VYVNYINGN-VYY	1159
E12_KM370319	NHR-----YIVNGL-YRLYSGIKVKIQRVN--	DSSTNDQFVRKNDQ-VYINYIYNN-LSY	1162
E11_KF861875	NIR-----STIVLA-NRLYSGIKVKIQRVN--	NSSTNDNLVRKNDQ-VYINPVASKTHLF	1160
E10_KF861917	NIR-----STIVLA-NKLYLGIKVKIQRVN--	NSSTNDNLVRKNDQ-VYINFPVIKTHLF	1160
E7_JN695729	NIR-----STILLA-NRLYSGIKVKIQRVN--	NSSTNDNLVRKNDQ-VYINPVASKTHLF	1160
E8_JN695730	NIR-----STILLA-NRLYSGIKVKIQRVN--	NSSTNDNLVRKNDQ-VYINPVASKTHLF	1160
E5_AB037711	NIR-----STILLA-NRLYSGIKVKIQRVN--	DSSTNDRFVRKNDQ-VYINYISNS-SSY	1159
E6_AM695759	NIR-----STILLA-NRLYSGIKVKIQRVN--	NSSTNDNLVRKNDQ-VYINPVASKTHLL	1160
E4_AB088207	NIR-----STILLA-NRLYSGIKVKIQRVN--	NSSTNDNLVRKNDQ-VYINPVASKTHLL	1160
E3_EF028403	NIR-----STILLA-NRLYSGIKVKIQRVN--	NSSTNDNLVRKNDQ-VYINPVASKTHLF	1160
E1_Q00496	NIR-----STILLA-NRLYSGIKVKIQRVN--	NSSTNDNLVRKNDQ-VYINPVASKTHLF	1160
E2_EF028404	NIR-----STILLA-NRLYSGIKVKIQRVN--	NSSTNDNLVRKNDQ-VYINPVASKTHLF	1160
F7_GU213233	RQRGIYSKTNI FSN-ARLYTGVEVII RKNVSTDT SNTDNFVRKNDT-VYINVVDGN-SEY		1174
F5_GU213211	HQRGVTKDLFI FSN-YKLYEGVEVII RKNGPIDI SNTDNFVRKNDL-AYINVVDHG-VEY		1183
F1_Q57236	QQRGVYQKPNIFSN-TRLYTGVEVII RKNGSTDI SNTDNFVRKNDL-AYINVVDRD-VEY		1183
F4_GU213214	RARGVDRKANIFSN-KRLYKGVVEVII RKNEPIDI SNTDNFVRKGD-AYINVVDRD-VEY		1183
F2_GU213209	QQRGVTTGGISVFLN-YKLYEGVEVII RKNAPIDI SNTDNFVRKNDL-AYINVVDHG-VEY		1186
F3_GU213227	QQRGVTEG-SVFLN-YKLYEGVEVII RKNGPIDI SNTDNFVRKNDL-AYINVVYHD-VEY		1185
F6_M92906	QQRGVTEG-SVFLN-YKLYEGVEVII RKNGPIDI SNTDNFVRKNDL-AYINVVDRG-VEY		1184
T_P04958	-NAPSYTNGKLNIIYRRLYNGLKFIIKRYTPNNEI--	DSFVKSGDF-IKLYVSYNNNEHI	1208

: . * : : .

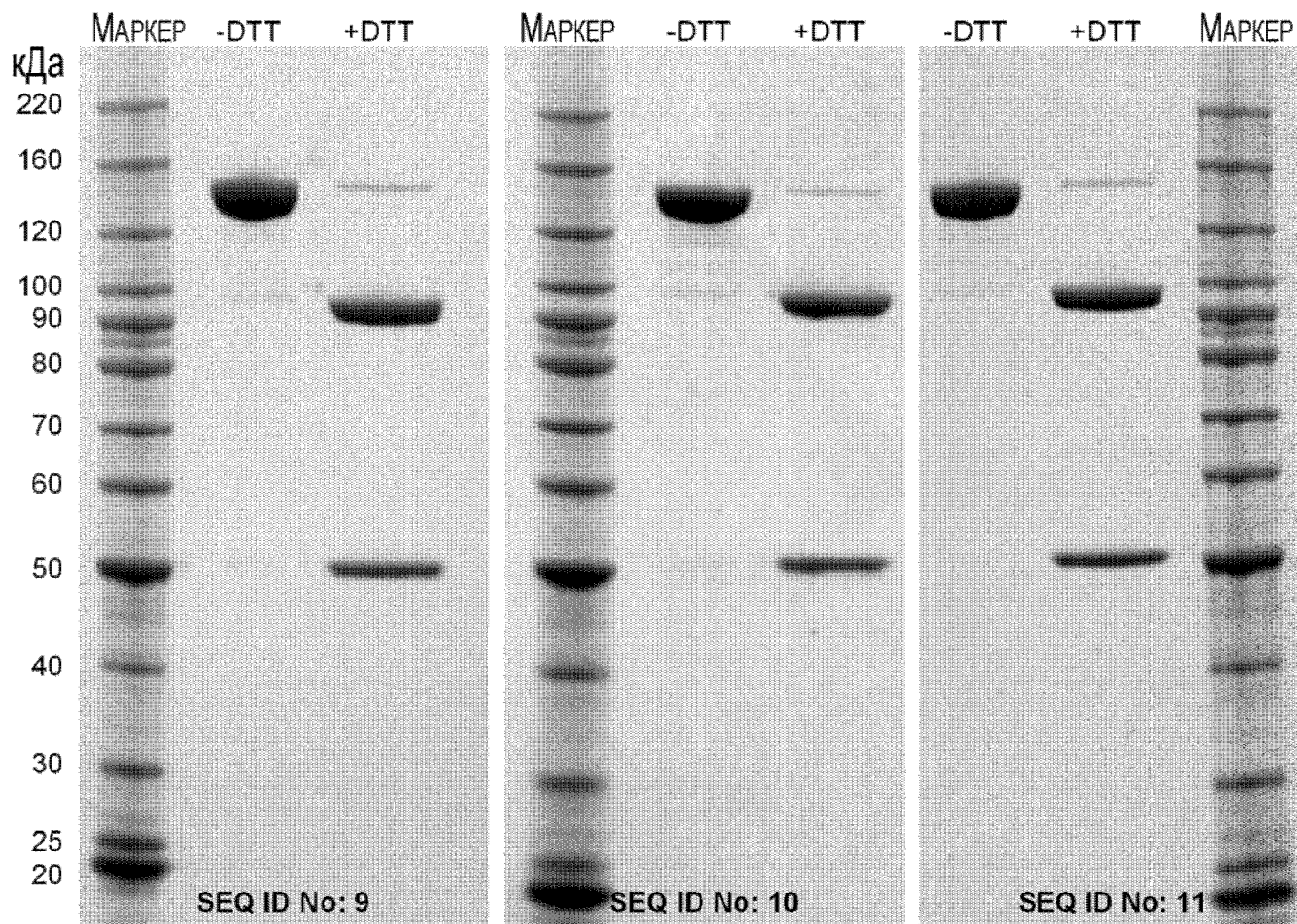
D_P19321	MI-----IRDT--DTIYATQGGECSONCVYALKLQSNLG--NYG--IGIFSIKNIIVSKNKYC	1217
DC_AB745660	SLGMYKPSRNL--GTDLVPLGA-LDQ-----PMDEIR-KY---GSFTIQPCNTFDYYA	1221
C1_P18640	NL-----FMKN--ETMYADNHS----TEDIYAIGLREQTK--DINDNII FQIQPMNNTYYYA	1228
CD_AB200360	MI-----IRDT--DTIYATQGGQCSKNCVYALKLQSNLG--NYG--IGIFSIKNIIVSQNKYC	1221
G_Q60393	RVYVLVNSKEI--QTQL-----FLAPINDDP--TFYDVLQIK--KYYEKTYYNC	1229
B4_EF051570	RVYAYKNFKEQ--EQKL-----FLSIIYDSN--EFYKTIQIK--EYDEQPTYSC	1221
B8_JQ964806	RVYAYKDFKGQK--EQKL-----FLANIHDSN--EFYKTIQIK--EYDEQPTYSC	1222
B7_JQ354985	RVYAYKNFKGQE--EKL-----FLANIYDSN--EFYKTIQIK--EYDEQPTYSC	1221
B6_AB302852	RVYALKNFKKKE--EKL-----FLAPISDS--EFYNTIQIK--EYDEQPTYSC	1221
B2_AB084152	RVYAYKDFKEEE--KKL-----FLANIYDSN--EFYKTIQIK--EYDEQPTYSC	1221
B3_EF028400	RVYAYKDFKKKE--EKL-----FLANIYDSN--EFYNTIQIK--EYDEQPTYSC	1221
B1_B1INP5	RVYTYKYFKKEE--EKL-----FLAPISDS--EFYNTIQIK--EYDEQPTYSC	1221
B5_EF033130	RVYMYKYFKKEE--EKL-----FLAPISDS--EFYNTIQIK--EYDEQPTYSC	1221
A4_EU341307	RLATNASQAGV--EKIL-----SALEIPDVG--NLSQVVMKSKNDQGITNKC	1235
A7_JQ954969	RLATNASQAGG--EKIL-----SAVEIPDVG--NLSQVVMKSKNDQGIRNKC	1235
A6_FJ981696	RLATNASQAGV--EKIL-----SALEIPDIG--NLSQVVMKSKNDQGIRNKC	1235
A1_A5HZZ9	RLATNASQAGV--EKIL-----SALEIPDVG--NLSQVVMKSKNDQGITNKC	1235
A5_EU679004	RLATNASQAGV--EKIL-----SVLEIPDVG--NLSQVVMKSKNDQGIRNKC	1235
A3_DQ185900	RLATNASQAGV--EKIL-----SALEIPDVG--NLSQVVMKSKDDQGIRNKC	1231
A2_X73423	RLATNASQAGV--EKIL-----SALEIPDVG--NLSQVVMKSKDDQGIRNKC	1235
A8_KM233166	RLATNALQAGV--EKIL-----SALEIPDVG--NLSQVVMKSKNDQGIRNKC	1236
H_KGO15617	RLATNASQAGV--EKIL-----SAVEIPDVG--NLSQVVMKSENDQGIRNKC	1227
E9_JX424534	SLYADTNATNK--EKTI-----K---SSTSGNRFNQVVMN-----SVRNNC	1196
E12_KM370319	SLYADTNIKDK--EKTI-----K---SSLSGNI FNQVVMN-----SVGNNC	1199
E11_KF861875	PLYADTNTTNK--EKTI-----K---SSSSGNRFNQVVMN-----SVGNNC	1197
E10_KF861917	PLYADTNTTNK--EKTI-----K---SSSSGNRFNQVVMN-----SVGNNC	1197
E7_JN695729	PLYADTATTNK--EKTI-----K---ISSSGNRFNQVVMN-----SVGNNC	1197
E8_JN695730	PLYADTNTTNK--EKTI-----K---SSSSGNRFNQVVMN-----SVGNNC	1197
E5_AB037711	SLYADTNTTDK--EKTI-----K---SSSSGNRFNQVVMN-----SVGNNC	1196
E6_AM695759	PLYADTATTNK--EKTI-----K---ISSSGNRFNQVVMN-----SVGNNC	1197
E4_AB088207	PLYADTATTNK--EKTI-----K---ISSSGNRFNQVVMN-----SVGNNC	1197
E3_EF028403	PLYADTATTNK--EKTI-----K---ISSSGNRFNQVVMN-----SVGNNC	1197
E1_Q00496	PLYADTATTNK--EKTI-----K---ISSSGNRFNQVVMN-----SVGNNC	1197
E2_EF028404	PLYADTNTTNK--EKTI-----K---SSSSGNRFNQVVMN-----SVGNNC	1197
F7_GU213233	QLYADVSTSAV--EKTI-----KLRRISNSNYSNQMI IMD-----SIGDNC	1214
F5_GU213211	RLYADISITKP--EKII-----KLIRRSNPDDSLGQIIVMD-----SIGNNC	1223
F1_Q57236	RLYADISIAPK--EKII-----KLIRTSNSNNSLGQIIVMD-----SIGNNC	1223
F4_GU213214	RLYANTSNAPQ--EKTI-----KLIRTSNSNDSLDQIIVMD-----SIGNNC	1223
F2_GU213209	RLYADISITKS--EKII-----KLIRTSNPNDSLGQIIVMD-----SIGNNC	1226
F3_GU213227	RLYADISITKP--EKII-----KLIRTSNPNDSLGQIIVMD-----SIGNNC	1225
F6_M92906	RLYADTKSEK---E-----KII RTSNLNDSLGQIIVMD-----SIGNNC	1220
T_P04958	VGYPKDGNAFNNDLDRIL-----RVGYNAPGI--PLYKKMEAV--KLRDLKTYSV	1253

D_P19321	SQIFSSFRENTMLLA-----DIYKPWRFSFKNAYTPVAVTNYET	1256
DC_AB745660	SQFLSSNATNTRIGILSIGSYS-----FKLGDDYWFNHEYLIPIVIEHYAS	1269
C1_P18640	SQIFKSNFNGENISGICSIGTYR-----FRLGGDW-YRHNYLVPTVKQGNYS	1275
CD_AB200360	SQIFSSFMKNTMLL-ADIYKPWR-----FSFEN-----AYTPVAVTNYET	1260
G_Q60393	QILCEKDTK---TFGLFGIGKVFVKDYGYVWDYDNYFCISQWYLRRISE-----NI	1277
B4_EF051570	QLLFKKDEESTDDIGLIGIHRFY-ESGVLRRKKYKDYFCISKWYLKEVKK-----KP	1271
B8_JQ964806	QLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFY-ESGFVQYKYYFCISKWYLKEVKK-----KP	1272
B7_JQ354985	QLLFKKDEESTDEIGLIGIHNFY-ESGILFKDYKDYFCISKWYLKEVKK-----KP	1271
B6_AB302852	QLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFY-ESGIVFKDYKYYFCISKWYLKEVKK-----KP	1271
B2_AB084152	QLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFY-ESGIVLKDYKDYFCISKWYLKEVKK-----KP	1271
B3_EF028400	QLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFY-ESGIVFKDYKDYFCISKWYLKEVKK-----KP	1271
B1_B1INP5	QLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFY-ESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKK-----KP	1271
B5_EF033130	QLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFY-ESGIVFKEYKDYFCISKWYLKEVKK-----KP	1271
A4_EU341307	KMNLQDNN--GNDIGFIGFHQFN-----NIAKLVASNWNRYQIER-----SS	1275
A7_JQ954969	KMNLQDNN--GNDIGFIGFHQFN-----NIAKLVASNWNRYQIGK-----TS	1275
A6_FJ981696	KMNLQDNN--GNDIGFIGFHQFN-----DIYKLVASNWNRYQIEI-----SS	1275
A1_A5HZZ9	KMNLQDNN--GNDIGFIGFHQFN-----NIAKLVASNWNRYQIER-----SS	1275
A5_EU679004	KMNLQDNN--GNDIGFIGFHQFN-----NIDKLVASNWNRYQIER-----SS	1275
A3_DQ185900	KMNLQDNN--GNDIGFVGFHLYD-----NIAKLVASNWNRYQVGG-----AS	1271
A2_X73423	KMNLQDNN--GNDIGFIGFHLYD-----NIAKLVASNWNRYQVGG-----AS	1275
A8_KM233166	KMNLQDNN--GNDIGLIGFHQFN-----NIAKLVASNWNRYQVGG-----AS	1276
H_KGO15617	KMNLQDNN--GNDIGFIGFHQFN-----NIAKLVASNWNRYQIGK-----AS	1267
E9_JX424534	TMNFKNNN--GHDIGLLGFKSN-----ALVASTWYYTNMRD-----HT	1232
E12_KM370319	TMNFKNNN--GNNIGLLGFKDN-----TLVASTWYYTHMRD-----NT	1235
E11_KF861875	TMNFKNNN--GNNIGMLGFKDN-----TLVASTWYYTHMRD-----NT	1233
E10_KF861917	TMNFKNNN--GNNIGMLGFKDN-----TLVASTWYYTHMRD-----NT	1233
E7_JN695729	TMNFKNNN--GNNIGLLGFKAD-----TVVASTWYYTHMRD-----HT	1233
E8_JN695730	TMNFKNNN--GNNIGMLGFKDN-----TLVASTWYYTHMRD-----NT	1233
E5_AB037711	TMNFKNNN--GNNIGLLGFKAD-----TVVASTWYYTHMRD-----HT	1232
E6_AM695759	TMNFKNNN--GNNIGLLGFKAD-----TVVASTWYYTHMRD-----NT	1233
E4_AB088207	TMNFKNNN--GNNIGLLGFKAD-----TVVASTWYYTHMRD-----NT	1233
E3_EF028403	TMNFKNNN--GNNIGLLGFKAD-----TVVASTWYYTHMRD-----HT	1233
E1_Q00496	TMNFKNNN--GNNIGLLGFKAD-----TVVASTWYYTHMRD-----HT	1233
E2_EF028404	TMNFKNNN--GNNIGMLGFKDN-----TLVASTWYYTHMRD-----NT	1233
F7_GU213233	TMNFKTNN--GNDIGLLGFHLN-----NLVASSWYKNI RN-----NT	1250
F5_GU213211	TMNFQNNN--GGNIGLLGFHSD-----NLVASSWYNNIRR-----NT	1259
F1_Q57236	TMNFQNNN--GGNIGLLGFHSN-----NLVASSWYNNIRK-----NT	1259
F4_GU213214	TMNFQNNN--GGNIGLLGFHSN-----TLVASSWYNNIRR-----NT	1259
F2_GU213209	TMNFQND--GSNIGLLGFHSD-----DLVASSWYNNHIRR-----NT	1262
F3_GU213227	TMNFQNNN--GGNIGLLGFHSD-----NLVASSWYNNIRR-----NT	1261
F6_M92906	TMNFQNNN--GSNIGLLGFHSN-----NLVASSWYNNIRR-----NT	1256
T_P04958	QLKLYDDK--NASLGLVGTNGQ---IGNDPNRDILIASNWFNHLKD-----K-	1297

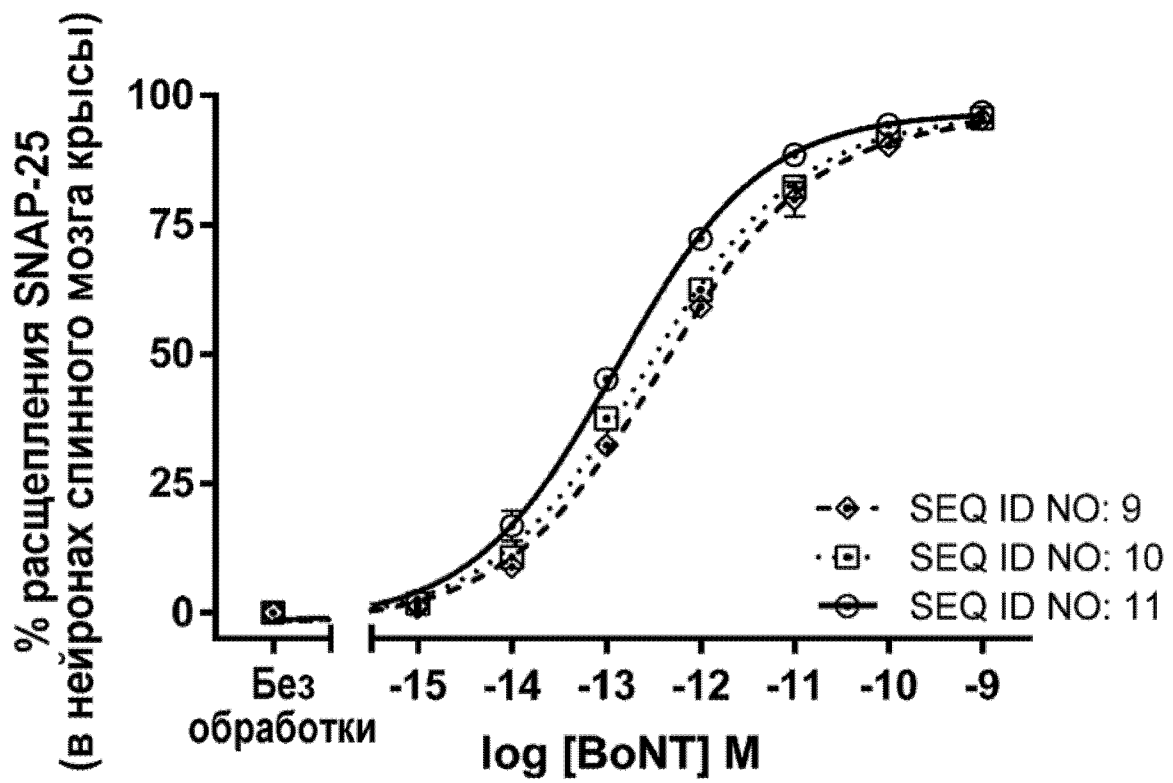
D_P19321	KLLSTSSFWKFISRDPGWVE---	1275
DC_AB745660	LLESTSTHWVFPASE-----	1285
C1_P18640	LLESTSTHWGFVPVSE-----	1291
CD_AB200360	KLLSTSSFWKFISRDPGWVE---	1280
G_Q60393	NKLRLGCMWQFIPVDEGWTE---	1297
B4_EF051570	YKSNLGCNWQFIPKDEGWTE---	1291
B8_JQ964806	YNPDLGCMWQFIPKDEGWTE---	1292
B7_JQ354985	YSSNLGCNWQFIPKDEGWTE---	1291
B6_AB302852	YNPNLGCNWQFIPKDEGWIE---	1291
B2_AB084152	YNPNLGCNWQFIPKDEGWIE---	1291
B3_EF028400	YNPNLGCNWQFIPKDEGWIE---	1291
B1_B1INP5	YNLKLGCNWQFIPKDEGWTE---	1291
B5_EF033130	YNSKLGCMWQFIPKDEGWTE---	1291
A4_EU341307	--RTLGCSEWEIFPVDDGWRERPL	1296
A7_JQ954969	--VTLGCSEWELIPVDYGWGESSL	1296
A6_FJ981696	--RTFGCSEWEIFPVDDGWGEKPL	1296
A1_A5HZZ9	--RTLGCSEWEIFPVDDGWERPL	1296
A5_EU679004	--RTFGCSEWEIFPVDDGWGESPL	1296
A3_DQ185900	--RTFGCSEWEIFPVDDGWGESSL	1292
A2_X73423	--RTFGCSEWEIFPVDDGWGESSL	1296
A8_KM233166	--RTFGCSEWEIFPVDDGWGESSQ	1297
H_KG015617	--RTFGCSEWEIFPVDDGWGESSL	1288
E9_JX424534	--NSNGCFWFSFIPSEENGWQEH--	1251
E12_KM370319	--NSNGCFWNFISEEHWQEK--	1254
E11_KF861875	--NSNGCFWNFISEEHWQEK--	1252
E10_KF861917	--NSNGCFWNFISEEHWQEK--	1252
E7_JN695729	--NSNGCFWNFISEEHWQEK--	1252
E8_JN695730	--NSNGCFWNFISEEHWQEK--	1252
E5_AB037711	--NSNGCFWNFISEEHWQEK--	1251
E6_AM695759	--NSNGFFWNFISEEHWQEK--	1252
E4_AB088207	--NSNGFFWNFISEEHWQEK--	1252
E3_EF028403	--NSNGCFWNFISEEHWQEK--	1252
E1_Q00496	--NSNGCFWNFISEEHWQEK--	1252
E2_EF028404	--NSNGCFWNFISEEHWQEK--	1252
F7_GU213233	--RNNGCFWFSFISKEHWQE---	1268
F5_GU213211	--SSNGCFWFSFISKEHWQE---	1277
F1_Q57236	--SSNGCFWFSFISKEHWQEN--	1278
F4_GU213214	--SSNGCFWFSFISKEHWQE---	1277
F2_GU213209	--SSNGCFWFSFISKEHWKE---	1280
F3_GU213227	--SSNGCFWFSFISKEHWQE---	1279
F6_M92906	--SSNGCFWSSISKENGWKE---	1274
T_P04958	---ILGCDWYFVPTDEGWTND--	1315

. * : .

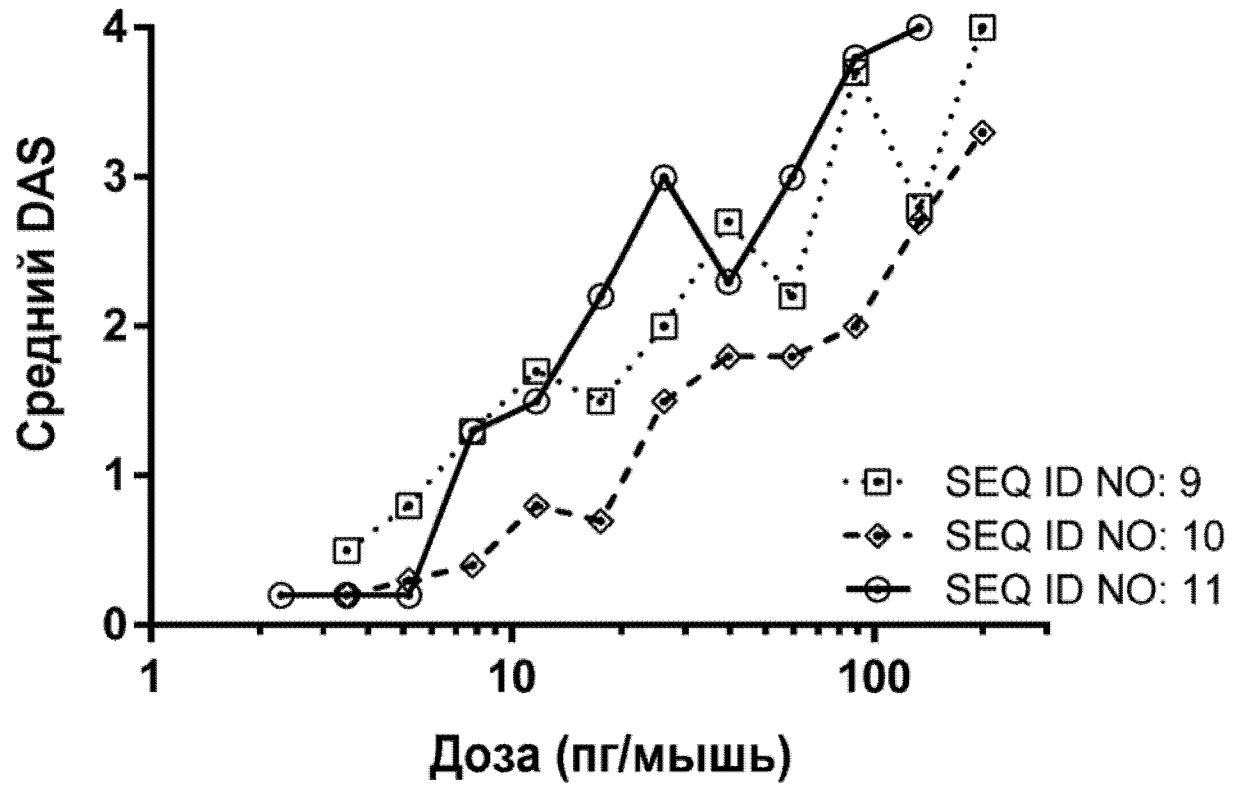
ФИГ.2



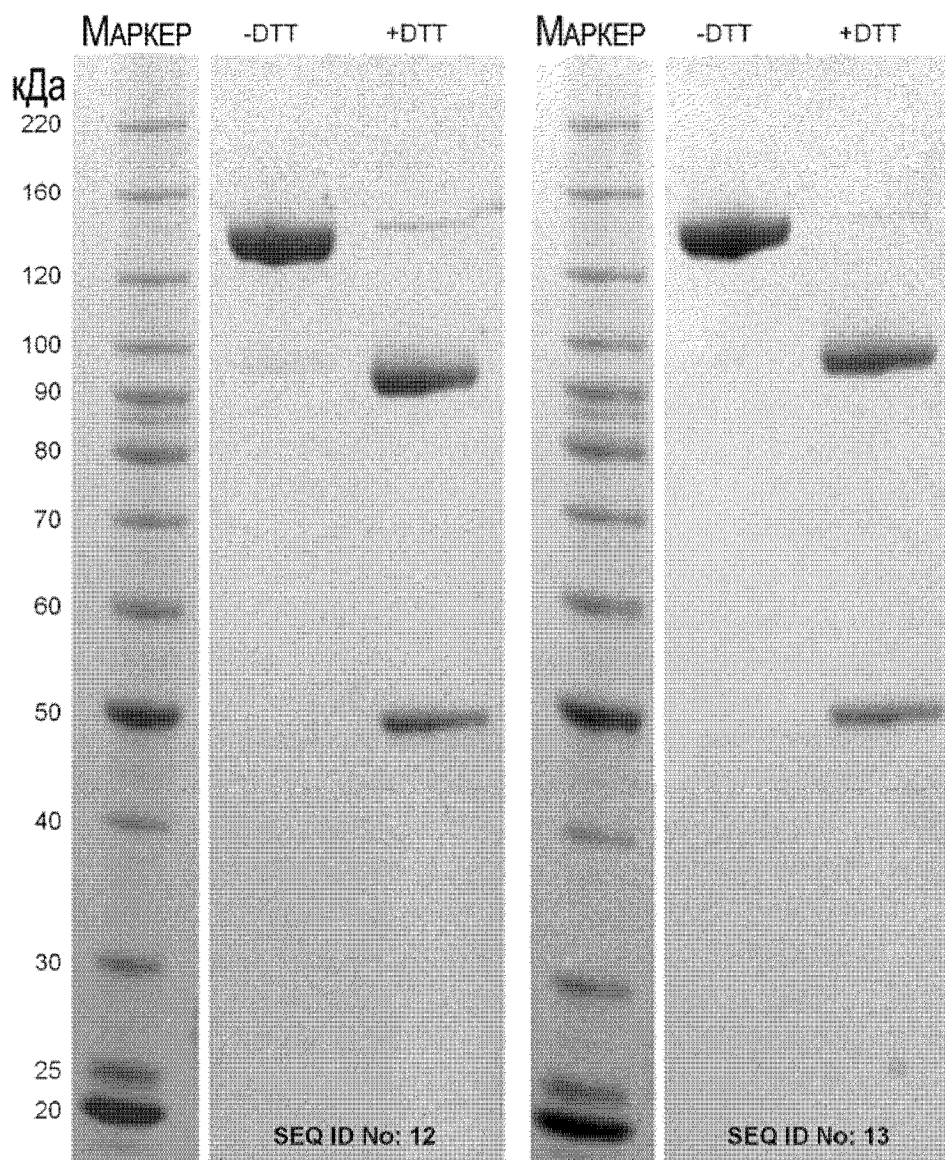
ФИГ.3



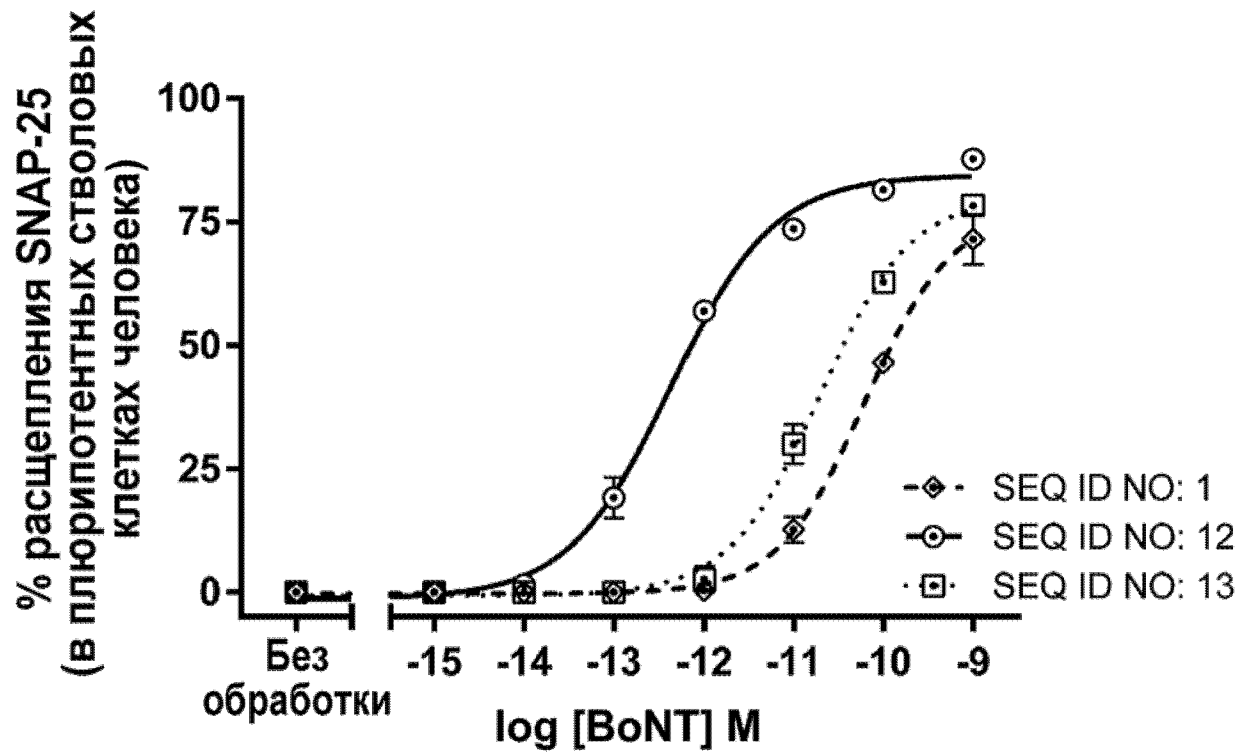
ФИГ.4



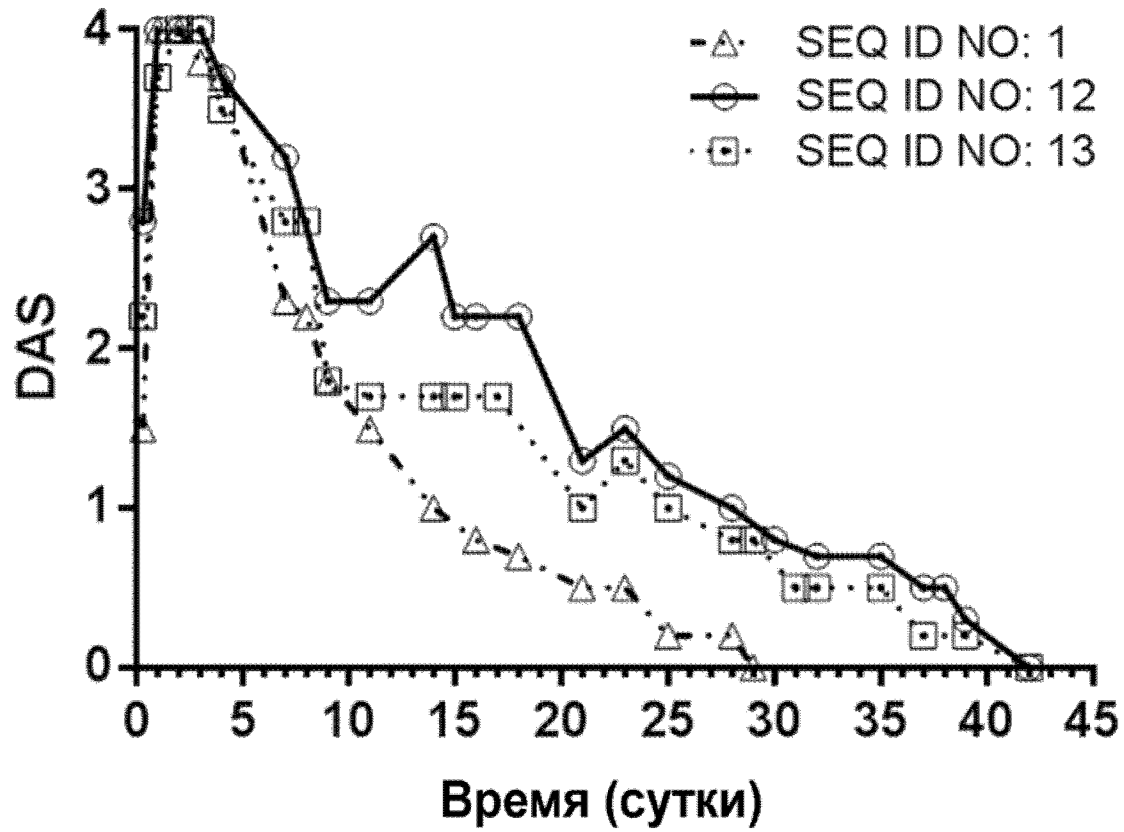
ФИГ.5



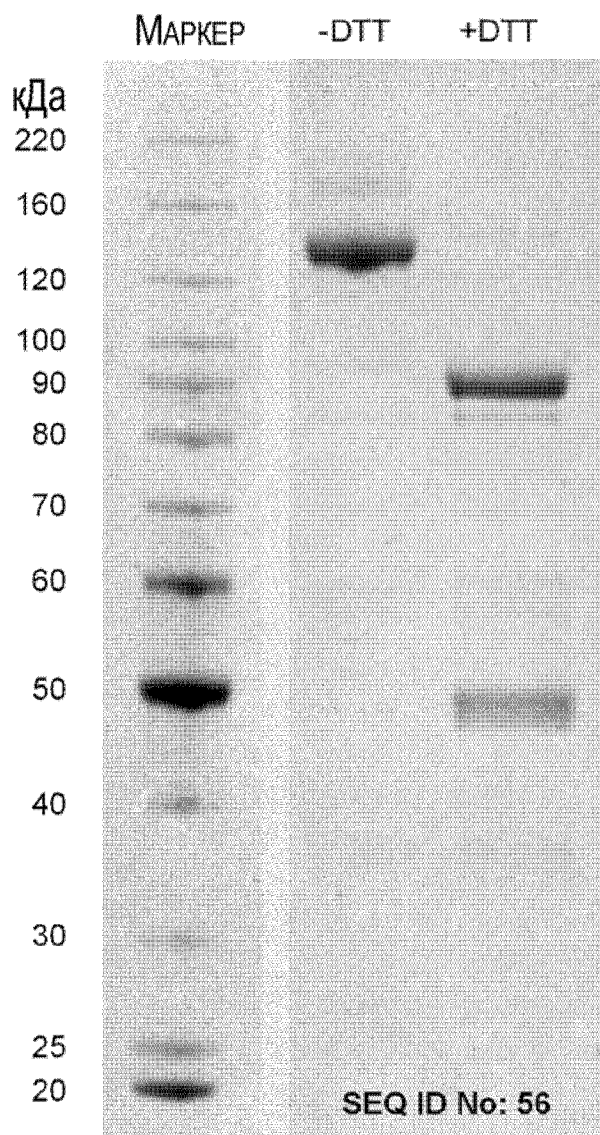
ФИГ.6



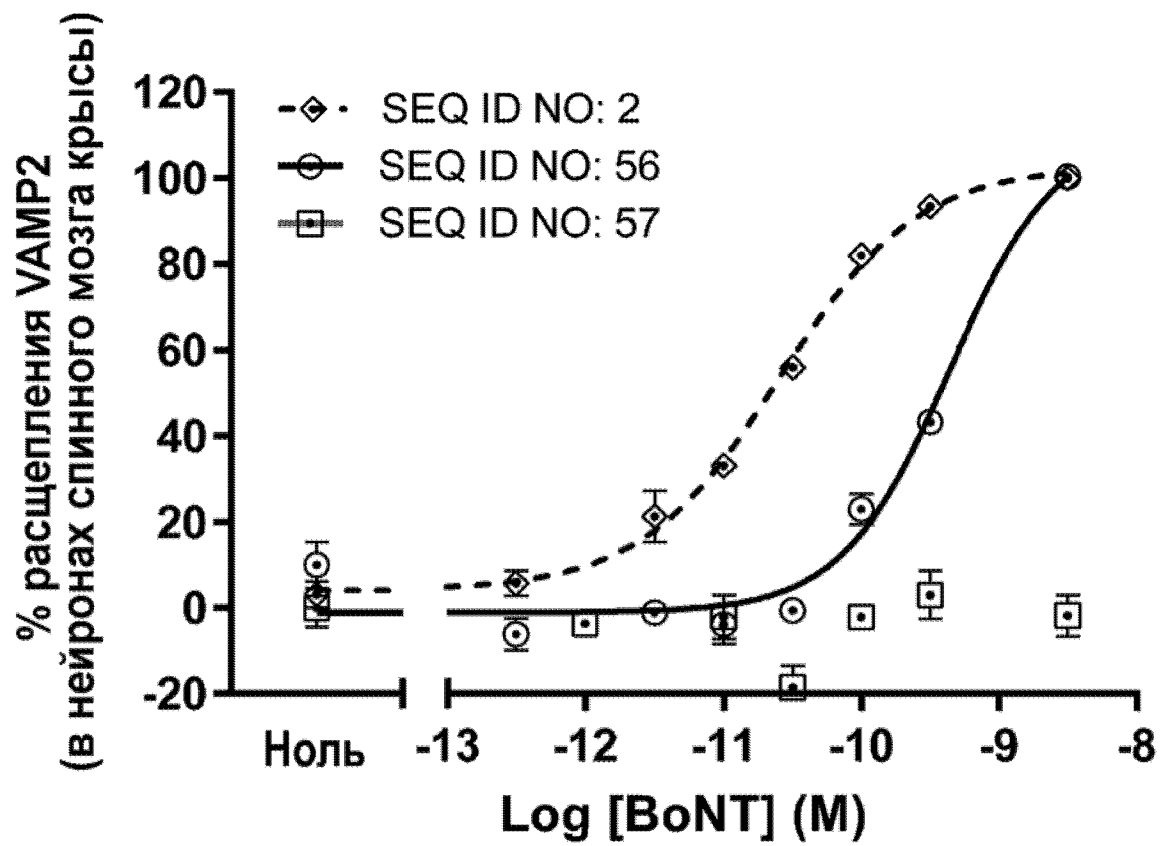
ФИГ.7



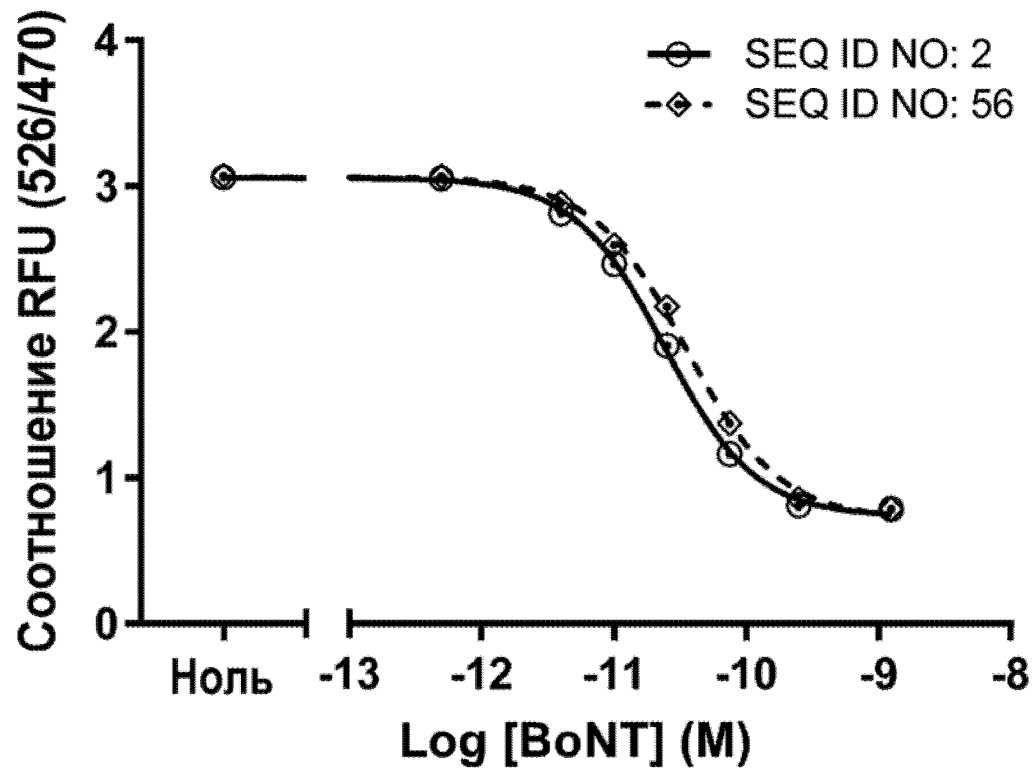
ФИГ.8



ФИГ.9



ФИГ.10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/060821

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/00 C07K14/33 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JIAFU WANG ET AL: "Longer-acting and highly potent chimaeric inhibitors of excessive exocytosis created with domains from botulinum neurotoxin A and B", BIOCHEMICAL JOURNAL, PORTLAND PRESS LTD, GB, vol. 444, no. Part 1, 15 May 2012 (2012-05-15), pages 59-67, XP002690949, ISSN: 0264-6021, DOI: 10.1042/BJ20120100 cited in the application	1
A	----- -/--	2-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search <p align="center">25 July 2017</p>		Date of mailing of the international search report <p align="center">01/08/2017</p>
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <p align="center">Schmitz, Till</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/060821

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>J. WANG ET AL: "Novel chimeras of botulinum and tetanus neurotoxins yield insights into their distinct sites of neuroparalysis", THE FASEB JOURNAL, vol. 26, no. 12, 1 December 2012 (2012-12-01), pages 5035-5048, XP055175043, ISSN: 0892-6638, DOI: 10.1096/fj.12-210112 cited in the application figure 1</p>	1-23
A	<p>----- US 2014/147429 A1 (CHADDOCK JOHN [GB] ET AL) 29 May 2014 (2014-05-29) the whole document</p>	1-23
A	<p>----- WO 2015/097087 A1 (UNIV DUBLIN CITY [IE]) 2 July 2015 (2015-07-02) figure 1 -----</p>	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2017/060821

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2014147429	A1	29-05-2014	AU 2012257578 A1 28-11-2013 BR 112013029525 A2 24-01-2017 CA 2835285 A1 22-11-2012 CN 103649317 A 19-03-2014 EP 2710129 A1 26-03-2014 ES 2562425 T3 04-03-2016 HK 1192587 A1 14-10-2016 JP 6050330 B2 21-12-2016 JP 2014516526 A 17-07-2014 KR 20140036239 A 25-03-2014 RU 2013155594 A 27-06-2015 UA 112985 C2 25-11-2016 US 2014147429 A1 29-05-2014 WO 2012156743 A1 22-11-2012

WO 2015097087	A1	02-07-2015	AU 2014372689 A1 21-07-2016 CA 2934986 A1 02-07-2015 CN 105916875 A 31-08-2016 EP 3087089 A1 02-11-2016 JP 2017501715 A 19-01-2017 KR 20160096201 A 12-08-2016 US 2015174217 A1 25-06-2015 US 2016230159 A1 11-08-2016 WO 2015097087 A1 02-07-2015
