(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-538954
(P2005-538954A)
(43)公表日　平成17年12月22日(2005.12.22)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
A61K 47/48	A61K	47/48	ZNA	4B018
A23L 1/30	A23L	1/30	Z	4B024
A61K 38/00	A61K	39/00	G	4B065
A61K 39/00	A61K	39/02		4C076
A61K 39/02	A61K	39/07		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 99 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2004-508839 (P2004-508839)
(86)(22)出願日　平成15年6月2日 (2003.6.2)
(85)翻訳文提出日　平成17年1月28日 (2005.1.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2003/017408
(87)国際公開番号　WO2003/101484
(87)国際公開日　平成15年12月11日 (2003.12.11)
(31)優先権主張番号　60/384,949
(32)優先日　平成14年5月31日 (2002.5.31)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　597177242
トーマス・ジェファーソン・ユニバーシティ
Ｔｈｏｍａｓ　Ｊｅｆｆｅｒｓｏｎ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ
アメリカ合衆国１９１０７－５５８７ペンシルベニア州フィラデルフィア、ウォールナット・ストリート１０２０番
(74)代理人　100067817
弁理士　倉内　基弘
(74)代理人　100085774
弁理士　風間　弘志
(74)代理人　100126527
弁理士　遠藤　朱砂

最終頁に続く

(54)【発明の名称】分子の経上皮輸送用組成物及び方法

(57)【要約】
本発明は、エンティティ(例えば、抗原、粒子、又は放射性核種)へ結合することができ、エンティティを、動物の非角質上皮膜を通してデリバリーするために使用されるボツリヌス菌ＨＣのフラグメントに関する。このフラグメントは、例えば、ワクチン、解毒剤、及び抗毒素の製造に有用であり、動物による薬剤の急速な摂取を目的とする場合にも有用である。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
動物の非角質上皮を通過してエンティティをトランスロケーションするための組成物であり、上記組成物はボツリヌス菌神経毒(BoNT)の重鎖(ＨＣ)のカルボキシ末端フラグメントへ結合しているエンティティを含有し、上記エンティティのサイズは上皮細胞の小胞の管腔容量を超えない組成物。
【請求項２】
上記BoNTはセロタイプＡ、Ｂ、及びＥのBoNTの群から選ばれる請求項１の組成物。
【請求項３】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約２％以上を含有する請求項１の組成物。
【請求項４】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約５％以上を含有する請求項１の組成物。
【請求項５】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約３０％以上を含有する請求項１の組成物。
【請求項６】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約５０％以上を含有する請求項１の組成物。
【請求項７】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣの約２０～約５０(アミノ酸)残基を含有する請求項１の組成物。
【請求項８】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣの約３５以上のアミノ酸残基を含有する請求項１の組成物。
【請求項９】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒のＨＣの約６０以上のアミノ酸残基を含有する請求項１の組成物。
【請求項１０】
上記フラグメントはβ－三葉型ドメイン及びレクチン結合ドメインから選ばれるドメインを含有する請求項１の組成物。
【請求項１１】
上記フラグメントは介在分子によりエンティティへ結合している請求項１の組成物。
【請求項１２】
上記介在分子はアビジン、抗体物質、及びビオチンの群から選ばれる請求項１１の組成物。
【請求項１３】
上記エンティティはペプチド結合によりフラグメントへ結合している請求項１の組成物。
【請求項１４】
上記エンティティはフラグメントのアミノ末端近くに結合している請求項１の組成物。
【請求項１５】
上記エンティティはフラグメントのアミノ末端へ結合している請求項１の組成物。
【請求項１６】
上記エンティティは超分子複合体である請求項１の組成物。
【請求項１７】
上記超分子複合体はマルチサブユニット蛋白質、フラグメントへ結合している蛋白質の１以上のサブユニット、である請求項１６の組成物。
【請求項１８】

上記エンティティはポリペプチドである請求項１の組成物。
【請求項１９】
上記ポリペプチドは、動物の病原体に関連する蛋白質の免疫原性部分である請求項１８の組成物。
【請求項２０】
上記病原体は、炭素菌、百日咳菌、ウシ流産菌、イヌ流産菌、マルタ熱菌、ブタ流産菌、ウェルチ菌、破傷風菌、ジフテリア菌、Ｑ熱リケッチア、クリミアーコンゴ出血熱ウィルス、野兎病菌、偽鼻疽菌、リシン、リフトバレー熱ウィルス、急性呼吸(窮迫)症候群(SARS)の原因物質であるコロナウィルス、サキシトキシン、ブドウ球菌エンテロトキシンＢ、トリコセシンマイコトキシン、大痘瘡ベネズエラウマ脳炎ウィルス、及びコレラ菌の群から選ばれた請求項１９の組成物。
【請求項２１】
上記動物はヒトであり、上記病原体はボツリヌス菌神経毒である請求項１９の組成物。
【請求項２２】
上記エンティティは抗体物質である請求項１の組成物。
【請求項２３】
上記抗体物質はテトラサブユニット免疫グロブリン及び単鎖抗体の群から選ばれた請求項２２の組成物。
【請求項２４】
更に複数のエンティティを含有する請求項１の組成物。
【請求項２５】
上記動物は哺乳類である請求項１の組成物。
【請求項２６】
上記上皮は、肛門上皮、胃腸上皮、鼻上皮、眼性上皮、肺上皮、及び膣性上皮の群から選ばれる請求項１の組成物。
【請求項２７】
上記エンティティの分子量は約１０００ドルトン以下である請求項１の組成物。
【請求項２８】
上記エンティティの分子量は約３００ドルトン～約５５０ドルトンである請求項１の組成物。
【請求項２９】
更にSEQ ID No：２０～１６８及び１７０～１８８のポリペプチドの群から選ばれる補体成分蛋白質を含む請求項１の組成物。
【請求項３０】
脊椎動物中で抗原に対する免疫反応を発現する組成物であり、上記組成物はボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合している抗原のエピトープの１以上を含有し、上記エピトープのサイズは上皮細胞の小胞の管腔容量を超えない組成物。
【請求項３１】
上記免疫反応は全身性免疫反応である請求項３０の組成物。
【請求項３２】
上記免疫反応は粘膜性免疫反応である請求項３０の組成物。
【請求項３３】
上記抗原は、炭素菌、百日咳菌、ウシ流産菌、イヌ流産菌、マルタ熱菌、ブタ流産菌、ウェルチ菌、破傷風菌、ジフテリア菌、Ｑ熱リケッチア、クリミアーコンゴ出血熱ウィルス、野兎病菌、偽鼻疽菌、リシン、リフトバレー熱ウィルス、急性呼吸(窮迫)症候群(SARS)の原因物質であるコロナウィルス、サキシトキシン、天然痘ウィルス、ブドウ球菌エンテロトキシンＢ、トリコセシンマイコトキシン、大痘瘡ベネズエラウマ脳炎ウィルス、及びコレラ菌、の抗原から選ばれる請求項３０の組成物。
【請求項３４】

上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約２％以上を含有する請求項３０の組成物。
【請求項３５】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約５％以上を含有する請求項３０の組成物。
【請求項３６】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約３０％以上を含有する請求項３０の組成物。
【請求項３７】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約５０％以上を含有する請求項３０の組成物。
【請求項３８】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣの約２０～約５０(アミノ酸)残基を含有する請求項３０の組成物。
【請求項３９】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣの約３５以上のアミノ酸残基を含有する請求項３０の組成物。
【請求項４０】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒のＨＣの約６０以上のアミノ酸残基を含有する請求項３０の組成物。
【請求項４１】
脊椎動物中でボツリヌス菌神経毒に対して免疫反応を発現する組成物であり、ボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣのカルボキシ末端フラグメントを含有する組成物。
【請求項４２】
上記免疫反応は全身性免疫反応である請求項４１の組成物。
【請求項４３】
上記免疫反応粘膜性免疫反応である請求項４１の組成物。
【請求項４４】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約２％以上を含有する請求項４１の組成物。
【請求項４５】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約５％以上を含有する請求項４１の組成物。
【請求項４６】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約３０％以上を含有する請求項４１の組成物。
【請求項４７】
上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約５０％以上を含有する請求項４１の組成物。
【請求項４８】
ボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合した抗原を含有するワクチンであり、上記抗原が脊椎動物の循環系へデリバリーされた時に、上記抗原は脊椎動物中の病原体に対して感染防御免疫を発現するワクチン。
【請求項４９】
肛門、鼻、肺、眼、口及び膣経路の群から選ばれた経路によりヒトへ投与するために処方された請求項４８のワクチン。
【請求項５０】
複数の病原体への免疫性を発現する複数の抗原を含有し、それぞれの抗原はボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣのフラグメントへ結合している請求項４８のワクチン。
【請求項５１】

ボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合している抗原を含有するワクチンであり、上記抗原が脊椎動物の循環系へデリバリーされた時に、上記抗原は脊椎動物中でボツリヌス菌神経毒に対して感染防御免疫を発現するワクチン。

【請求項５２】

抗原が脊椎動物の非角質上皮へ接触する時に抗原に対する免疫反応を発現する組成物であり、ボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合している抗原のエピトープの１以上を含有する組成物。

【請求項５３】

動物の非角質上皮を通してエンティティをトランスロケーションする方法であり、エンティティのサイズは上皮細胞の小胞の管腔容量を超えず、上皮を、ボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合しているエンティティを含有する組成物と接触させることを含む方法。

【請求項５４】

上記BoNTはセロタイプＡ、Ｂ、及びＥのBoNTの群から選ばれる請求項５３の方法。

【請求項５５】

上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約２％以上を含有する請求項５３の組成物。

【請求項５６】

上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約５％以上を含有する請求項５３の組成物。

【請求項５７】

上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約３０％以上を含有する請求項５３の組成物。

【請求項５８】

上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣ分子量の約５０％以上を含有する請求項５３の組成物。

【請求項５９】

上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣの約２０～約５０(アミノ酸)残基を含有する請求項５３の組成物。

【請求項６０】

上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣの約３５以上のアミノ酸残基を含有する請求項５３の組成物。

【請求項６１】

上記フラグメントはボツリヌス菌神経毒のＨＣの約６０以上のアミノ酸残基を含有する請求項５３の組成物。

【請求項６２】

上記フラグメントは介在分子によりエンティティへ結合している請求項５３の方法。

【請求項６３】

上記介在分子はアビジン、抗体物質、及びビオチンの群から選ばれる請求項６１の方法。

【請求項６４】

上記エンティティはペプチド結合によりフラグメントへ結合している請求項５３の方法。

【請求項６５】

上記エンティティはフラグメントのアミノ末端近くに結合している請求項５３の方法。

【請求項６６】

上記エンティティはフラグメントのアミノ末端へ結合している請求項５３の方法。

【請求項６７】

上記エンティティは超分子複合体である請求項５３の方法。

【請求項６８】

上記超分子複合体はマルチサブユニット蛋白質、フラグメントへ結合している蛋白質の１以上のサブユニット、である請求項５３の組成物。

【請求項６９】

上記エンティティはポリペプチドである請求項５３の方法。

【請求項７０】

上記ポリペプチドは、動物の病原体に関連する蛋白質の免疫原性部分である請求項６９の方法。

【請求項７１】

上記病原体は、炭素菌、百日咳菌、ウシ流産菌、イヌ流産菌、マルタ熱菌、ブタ流産菌、ウェルチ菌、破傷風菌、ジフテリア菌、Ｑ熱リケッチア、クリミアーコンゴ出血熱ウィルス、野兎病菌、偽鼻疽菌、リシン、リフトバレー熱ウィルス、急性呼吸(窮迫)症候群(SARS)の原因物質であるコロナウィルス、サキシトキシン、天然痘ウィルス、ブドウ球菌エンテロトキシンＢ、トリコセシンマイコトキシン、大痘瘡、ベネズエラウマ脳炎ウィルス、及びコレラ菌の群から選ばれた請求項６９の方法。

【請求項７２】

上記動物はヒトであり、病原体はボツリヌス菌神経毒である請求項６９の方法。

【請求項７３】

上記エンティティは抗体物質である請求項５３の方法。

【請求項７４】

上記抗体物質はテトラサブユニット免疫グロブリン及び単鎖抗体の群から選ばれた請求項５３の方法。

【請求項７５】

更に複数のエンティティを含有する請求項５３の方法。

【請求項７６】

上記動物は哺乳類である請求項５３の方法。

【請求項７７】

上記組成物は更にSEQ ID No：２０～１６８及び１７０～１８８のポリペプチドの群から選ばれる補体成分蛋白質を含む請求項５４の方法。

【請求項７８】

脊椎動物中のエンティティに対する免疫反応を発現する方法であり、下記ステップを含む方法；

ａ)エンティティをボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合するステップ、但しエンティティのサイズは上皮細胞の小胞の管腔容量を超えない；及び

ｂ)フラグメント結合したエンティティを上皮と接触させるステップ。

【請求項７９】

上記脊椎動物はヒトである請求項７８の方法。

【請求項８０】

上記エンティティはヒト病原体の抗原である請求項７９の方法。

【請求項８１】

脊椎動物中でクロストリジウム神経毒(BoNT)に対する免疫反応を発現する方法であり、上記方法は組成物の脊椎動物の上皮への接触を含み、上記組成物はボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合したエンティティを含み、上記エンティティは抗原が脊椎動物の循環系へデリバリーされた時に、脊椎動物中のボツリヌス菌神経毒に対して感染防御免疫を発現する抗原である方法。

【請求項８２】

脊椎動物の血流へエンティティを急速にデリバリーするための医薬組成物であり、上記組成物はボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合したエンティティを含み、肺投与用に配合されている組成物。

【請求項８３】

脊椎動物の血流へエンティティを急速にデリバリーするための医薬組成物であり、上記組成物はボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合したエンティティを含み、経口投与用に配合されている組成物。

【請求項８４】

その食品成分のゲノムはボツリヌス菌神経毒のＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合した、治療用又は免疫原性ポリペプチドを含有する蛋白質を発現的にエンコードするポリヌクレオチドを含有する食品。

【請求項８５】

ボツリヌス菌神経毒のＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合した免疫原性ポリペプチドを含有するトランスロケーション用ポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願のクロスリファレンス

本出願は米国予備特許出願番号第６０／３８４９４９号、２００２年5月３１日出願に対する合衆国法典第３５巻第１１９条(ｅ)に基づく優先権を主張し、それらの内容をここで資料として使用する。

連邦政府による援助研究又は開発に関する記載

この研究の一部は米国政府資金により支援された(国立衛生研究所認可番号第ＧＭ０５７３４２号)。

【背景技術】

【０００２】

ボツリヌス菌毒素は、ヒト及び他の動物(例えば、他の哺乳類、爬虫類、鳥類、及び両生類)のボツリヌス中毒及び他の機能障害の原因物質である。この薬品の病理学的効果は、消化管及び気道上皮を通過して全身循環系へ入ることの出来る神経毒により仲介される。一旦循環系中に入ると、ボツリヌス菌神経毒(BoNT)は神経筋接合部のシナプス前膜へ結合して、後ニューロン細胞質ソルへ入り込むことができる。細胞質ソル中で、BoNTはアセチルコリンのニューロン放出を神経筋接合部でブロックし、筋肉の弛緩性麻痺を引き起こす。

BoNTは約１５０キロドルトンの分子量を有する単鎖不活性プロポリペプチドとして合成される。不活性プロ－BoNTは内因性又は外因性蛋白質分解酵素により、プロ－BoNTの蛋白質分解開裂により活性化される。不活性BoNTプロペプチドの開裂(ニッキング)は２個のポリペプチド鎖(重鎖(ＨＣ)及び軽鎖(ＬＣ))を産出する。ＨＣ及びＬＣは通常、動物細胞の内部に存在するような還元条件下で切断されることのできるジスルフィド結合により結合している。

いくつかの種類のクロストリジウムが現在BoNT毒素を生産することが知られており、例えば、ボツリヌス菌、Ｆ型毒素産生菌(Cl.baratii)、Ｅ型毒素産生菌(酪酸菌、Cl. butyricum)が挙げられる。

【０００３】

BoNTは、現在７個の免疫学的に異なる形態(セロタイプ)、Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、及びＧとして産出されることが知られている。実際、それぞれのセロタイプは、下記２種類の蛋白質(以下、「補体成分蛋白質」ともいう。)と共にクロストリジウムから放出される。：(ｉ)赤血球凝集素(ＨＡ)ファミリー及び(ｉｉ)単一の、非毒素、非赤血球凝集素蛋白質(NTNH)。

BoNTは、消化管、肺、及び他の上皮膜を通り抜けて、血流に進入出来ることが知られている。血流中で、BoNTは神経筋接合部のニューロンへ入り込むことができ、そこで毒素はその特徴的作用を発現できる。

一部又は全てのＬＣが上皮膜を通過するために削除され変形されるBoNT分子の能力は文献に記載されている(例えば、米国特許第６０５１２３９号)。しかし、これら分子は、種々の理由で実用的でないことが明らかな(変形を受けていない)完全な形のＨＣの産出又は

単離を必要とした。BoNTのフラグメントを使用してボツリヌス中毒を予防するための注射可能なワクチンの製造も試みられた。しかし、上皮を通過するトランスサイトーシス可能な、ボツリヌス中毒を予防できるワクチンは未だ報告されていない。

【特許文献１】米国特許第６０５１２３９号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００４】

上皮経由で動物体内への、抗原、薬剤、造影剤、放射性核種及び他の試薬をデリバリーするための改良された組成物及び方法が求められている。本発明は、動物上皮膜を通してエンティティをデリバリーするための組成物及び方法を提供して、この要求を少なくとも一部は満たすことができる。

【課題を解決するための手段】

【０００５】

本発明は、ボツリヌス菌神経毒(BoNT)のＨＣのカルボキシ末端フラグメントは、動物の上皮膜を通過する能力を有する知見を基礎にしている。驚くべきことに、BoNTのＨＣのフラグメントは、エンティティがフラグメントへ結合した時に、広い範囲のエンティティの経上皮輸送を仲介出来ることが、更に発見された。従って、本発明はBoNTのＨＣ(以下「ＨＣ」ともいう。)のカルボキシ末端フラグメントへ結合したエンティティを含有する組成物に関する。本発明は又、それら組成物を使用する方法に関する。

特に、本発明は、動物の非角質上皮を通過してエンティティをトランスロケーションするための組成物を提供する。上記組成物は、BoNTのＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合したエンティティを含有する。上記エンティティのサイズは、好ましくは上皮細胞の小胞の管腔容量を超えない。本発明の組成物で使用される任意のエンティティは、実際には免疫原性、治療用、及び／又は診断用でもよい。

【０００６】

例えば、本発明の範囲内には、脊椎動物中で抗原に対する(粘膜性又は全身性)免疫反応を発現する組成物が含まれる。これら組成物はBoNTのＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合した抗原のエピトープの１以上でもよい。エピトープのサイズは、好ましくは上皮細胞の小胞の管腔容量を超えない。

例えば、本発明はBoNTのＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合した抗原を含むワクチンでもよく、上記抗原が脊椎動物の循環系へデリバリーされた時に、上記抗原は脊椎動物の病原体に対して感染防御免疫を発現する。例えば、上記ワクチンはBoNTのＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合した抗原を含有してもよく、上記抗原が脊椎動物の循環系へデリバリーされた時に、抗原は脊椎動物のボツリヌス菌神経毒に対して感染防御免疫を発現する。

【０００７】

本発明では又、動物の非角質上皮を通してエンティティをトランスロケーションする方法が提供される。上記方法は上皮と、BoNTのＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合したエンティティを含有する組成物との接触を含み、上記エンティティのサイズは上皮細胞の小胞の管腔容量を超えない。

同様に本発明で提供されるのは、脊椎動物中のエンティティに対する免疫反応を発現する方法である。この場合、上記方法は下記ステップを含む；

ａ)エンティティをBoNTのＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合するステップ、但しエンティティのサイズは上皮細胞の小胞の管腔容量を超えない；及び

ｂ)フラグメント結合したエンティティを上皮と接触させるステップ。

BoNTのＨＣのカルボキシ末端フラグメントへ結合したエンティティを含有する医薬組成物も又、本発明の方法及び／又は組成物で使用できる食品及びトランスロケーション用ポリペプチドと同様に、本発明としてここで記載される。

【発明を実施するための最良の形態】

【０００８】

上皮膜を通過するBoNT(ホロトキシン)のトランスロケーションは、BoNTの上皮細胞の膜への結合、細胞膜の陥入による細胞の小胞内へのBoNTの封入、細胞の一方から他方への(例えば、細胞の頂端面(apical face)からその基底面(basolateral face)へ、又はその反対)小胞のトランスロケーション、細胞膜への小胞の再統合及び細胞からのBoNTの放出、により起こると思われている。いくつかのＨＣのカルボキシ末端フラグメントは、上皮細胞の細胞質ソルへ入らずに上皮膜を通過して輸送(即ち、トランスサイトーシス；経細胞輸送)する能力を、天然分泌性BoNTへ与えることが発見された。特に、本発明者は約２キロドルトン程度の小さいＨＣカルボキシ末端フラグメントは、上皮細胞通過能を有し、１０００ドルトン以上の大きいサイズのエンティティが上皮膜を通過するために使用できることを発見した。

カルボキシ末端ＨＣフラグメントへ結合したエンティティの性質は、フラグメントの細胞通過能に大きく影響を及ぼさない。実質的にはどの種類のエンティティでもこの方法で輸送でき、この方法は上皮小胞のサイズ収容能力及び、エンティティをＨＣフラグメントへ結合する実施者の能力にのみ限定される。

【０００９】

本発明には、動物の非角質上皮を通過してエンティティをトランスロケーションするための組成物も含まれる。上記組成物は、カルボキシ末端ＨＣフラグメントへ結合したエンティティを含有する。好ましくはエンティティのサイズは上皮細胞の小胞の管腔容量を超えない。上皮は非角質上皮であり、好ましくは腎臓上皮ではない。フラグメント結合した単数又は複数のエンティティは、種々の他の成分(医薬的に許容できるビヒクル、通常活性ボツリヌス菌神経毒に付随する防御補体成分蛋白質(抗体)ＨＡ及び／又はNTNH、充填剤及び／又は医薬品に通常使用される他の構成詩成分等)と共に、懸濁又は混合することが出来る。

【００１０】

ここで使用される用語「ボツリヌス菌神経毒のＨＣのカルボキシ末端フラグメント」又は「カルボキシ末端ＨＣフラグメント」は、いずれかのセロタイプ(例えば、SEQ ID No：１－７の重鎖)のBoNTの完全長ＨＣのアミノ酸配列のフラグメントを意味し、そのフラグメントは、カルボキシ末端を含有する完全長ＨＣアミノ酸配列の半分を形成する配列の少なくとも一部を含む。従って、本発明に使用されるカルボキシ末端フラグメントは完全長ＨＣより短い。フラグメントは、例えば完全長ＨＣの１以上のアミノ酸残基を除外(exclude)し、好ましくは完全長ＨＣの５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、又は４００以上の残基を除外する。好ましくは、除外された残基の多くは完全長ＨＣのアミノ末端を含む完全長配列の半分で発生するものである。それにも拘らず、フラグメントの例として、５、１０、１５、２５、５０以上のアミノ酸残基が同様にカルボキシ末端を含有する完全長ＨＣの半分から除外されたものも検討された。

【００１１】

例えば、本発明のカルボキシ末端ＨＣフラグメントは、ボツリヌス菌神経毒のＨＣの約６０残基を含有し、好ましくはフラグメントはボツリヌス菌神経毒のＨＣの約３５残基を含有し、更に好ましくはフラグメントはボツリヌス菌神経毒のＨＣの２０～約５０アミノ酸残基を含有する。

一方、好ましくは、カルボキシ末端ＨＣフラグメントは、BoNTの完全長ＨＣのアミノ酸配列の(分子量で)２％以上であるアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、上記フラグメントはアミノ末端で開始される完全長ＨＣの目的としない部分の(即ち、図１のセロタイプＡ中の残基４６８で開始される)切除／削除により得られる。更に好ましくは、カルボキシ末端ＨＣフラグメントは、BoNTの完全長ＨＣのアミノ酸配列の、(分子量で)約５％以上、約３０％以上、約５０％以上、約６０％以上、約７０％以上、約８０％以上、及び約９０％以上を含有する部分のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【００１２】

例えば、ここで「８８ｋＨＣ」(BoNT ＨＣの８８キロドルトンカルボキシフラグメント)、「６６ｋＨＣ」(BoNT ＨＣの６６キロドルトンカルボキシフラグメント)、及び「５０

ｋＨＣ」(BoNT ＨＣの５０キロドルトンカルボキシフラグメント)で表される、カルボキシ末端ＨＣフラグメント、セロタイプＡは、完全長BoNT ＨＣ配列の一部の、それぞれ約８０％以上、約７０％以上、及び約５０％以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドであるカルボキシ末端ＨＣフラグメントである。

本発明に使用されるカルボキシ末端ＨＣフラグメントは、公知のいずれかのBoNTセロタイプ(例えば、Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、及びＧのいずれか)のＨＣ又は次に発見されるいずれかのBoNTセロタイプから誘導できる。好ましくは、カルボキシ末端ＨＣフラグメントは、組成物が投与される動物として同種の動物で病原性であることが公知であるセロタイプ(例えば、ヒトに対するセロタイプＡ、Ｂ、及びＥ)から誘導できる。しかし、選択されたフラグメントが、その動物中に細胞通過能を保有するために所定の動物においては通常は病原性を示すセロタイプから得られなければならない必要はない。

【００１３】

特定のセロタイプから得られるカルボキシ末端フラグメントＨＣ、又は特定のアミノ酸配列を有するフラグメントの本発明での使用適用性は、普通の科学的プロトコルを使用して経験的に評価でき、例えば、投与が意図され、経上皮輸送が観察され、評価される同じ(細胞)種及び(動物)種の細胞と、フラグメントが接触するモデルシステムが使用できる。

【００１４】

全てのフラグメントが全ての(動物)種の全ての上皮細胞種中で最大限に効率の良いトランスサイトーシスを示すとは限らないことが示された。例えば、本発明の開示例として記載された実験は、BoNT ＨＣ、及び／又はセロタイプＡ及びＢのフラグメントが、所定の細胞種(MDCK)のイヌ腎臓上皮膜を高い効率では通過しないことが示された。しかし、特定の(動物)種の特定の上皮細胞種を通過する高度に顕著な細胞通過能の特徴を有さない本発明の一例がある事実は、本発明の組成物及び方法の有効性を損なわない。

【００１５】

好ましくは本発明の方法で使用されるカルボキシ末端ＨＣフラグメント及び本発明の組成物は、細胞膜へ結合する毒素の能力の原因であるＨＣの部分を少なくとも有する。例えば、フラグメントは、β－三葉型ドメイン及び／又は関連するレクチン結合ドメインを含有してもよい。又、カルボキシ末端ＨＣフラグメントは、通常の結合アッセイにより経験的に確認されるとおり、天然ＨＣと同一の結合性を有するＨＣの擬ペプチドを含有してもよい。

【００１６】

カルボキシ末端ＨＣフラグメントへ結合したエンティティの本質又は性質は、上皮表面を通過してトランスロケートさせたいどのようなエンティティでもよい。カルボキシ末端ＨＣフラグメントへ結合された単数又は複数のエンティティは、エンティティのサイズが組成物が投与される細胞の小胞の管腔容量を超えない限り、実質的にどのようなサイズでもよい。好ましくは、BoNT ＨＣフラグメントへ結合された所定の単数又は複数のエンティティは、分子量が約数百ドルトン(約１００ドルトン～約２００ドルトン)から約数万ドルトン(約１００００ドルトン～約４００００ドルトン)である。更に好ましくはエンティティは約１０００ドルトン以下の分子量を有し、最も好ましくはエンティティは約３００ドルトン～約５５０ドルトンの分子量を有する。又、エンティティの分子量は、数十万、数百万、又は数千万ドルトン以上でもよい。従って、非常に大きな超分子複合体(例えば、リポソーム又はウィルスベクター)の経上皮輸送も本発明で意図される。

【００１７】

本発明のカルボキシ末端ＨＣフラグメントへ結合できる適切なエンティティとして例えば、有機的又は無機材料(例えば、セラミック粒子)、小さな有機又は無機化学的化合物(テトラフルオロエチレンポリマー、キトサン)、ポリペプチド(例えば、酵素、抗体、及び病原体のポリペプチドエピトープ等のシングル－及びマルチ－サブユニット蛋白質を含む。)、核酸、及び核酸ベクター(例えば、発現可能な核酸を含有するウィルスベクター)、の粒子が挙げられる。

【００１８】

エンティティは例えば、動物の病原体の免疫原性エピトープを含有してもよい。カルボキシ末端ＨＣフラグメントへ結合した免疫原性エピトープを有する組成物は、エピトープの動物の血流へのデリバリーを促進し、その結果エピトープに対する免疫応答の発現を誘起する。免疫原性エピトープは蛋白質でも非蛋白質でもよい。有機された免疫応答は、その後、動物中で病原体により引き起こされる病理を阻止し、予防することができる。適切なエピトープが獲得される非蛋白質抗原として炭水化物及び核酸が挙げられる。

【００１９】

従って、本発明の組成物は例えば、カルボキシ末端ＨＣフラグメントが結合されたエンティティが免疫原性である場合、哺乳類、爬虫類又は魚類等の脊椎動物中の感染防御免疫発現用のワクチンとして有用である。本発明の組成物及び方法は、実質的にはいずれのヒト又は他の脊椎動物の、当分野で公知又は開発された生物戦の薬剤として兵器化でき、使用できる病原体等の病原体(ウィルス性、細菌性、プリオン)、に対するワクチン接種として使用できる。

【００２０】

例えば、本発明の組成物が処方されるワクチンが対象とする病原体として、熱帯熱マラリア原虫(マラリアの原因物質)、百日咳菌(百日咳の原因物質)、麻疹ウィルス、おたふく風邪ウィルス、風疹ウィルス、インフルエンザウィルス、肝炎ウィルス、肺炎球菌ウィルス、水痘ウィルス、狂犬病ウィルス、及びヒト免疫不全性ウィルスが挙げられる。更に、エンティティとして使用するための免疫原性エピトープは、例えば、炭素菌(炭素の原因物質)、偽鼻疽菌、ボツリヌス菌毒素(ボツリヌス中毒の原因物質)、ペスト菌(ペストの原因物質)、コレラ菌、大痘瘡(天然痘の原因物質)、野兎病菌(野兎病の原因物質)、ウィルス性出血熱の原因物質であるウィルス(例えば、クリミアーコンゴ出血熱ウィルス)、ジフテリア菌、Ｑ熱リケッチア(Ｑ熱の原因物質)、ブルセラ菌属の微生物(例えば、ウシ流産菌、ブタ流産菌、マルタ熱菌、イヌ流産菌)(ブルセラ症の原因物質)、サキシトキシン、つち骨類鼻疽菌(鼻疽の原因物質)、ヒマのリシン毒素、ウェルチ菌のイプシロン毒素、破傷風菌、ブドウ球菌エンテロトキシンＢ、ニパウィルス、ハンタウィルス、リフトバレー熱ウィルス、ダニ媒介脳炎の原因物質であるウィルス、ブドウ球菌エンテロトキシンＢ、トリコセシンマイコトキシン、黄熱病の原因物質、多剤耐性結核の原因物質、及び急性呼吸(窮迫)症候群(SARS)の原因物質であるコロナウィルス等の病原体に対する免疫反応を発現するために選択できる。本発明のエンティティである免疫原性エピトープは又、昆虫又は爬虫類毒及び種々の寄生虫に対する免疫性を発現するエピトープでもよい。

【００２１】

単数又は複数のエンティティは、組成物が投与された動物の血流中で別の分子と特異的に結合できる分子を含有してもよい。これらエンティティとして、本発明を制限するものではないが、テトラサブユニット免疫グロブリン及び単鎖抗体等の抗体物質、並びに受容体－リガンド結合対の個々のメンバー又はフラグメント(例えば、腫瘍壊死因子アルファ及びその細胞－表面受容体)が挙げられる。「抗体物質」とは、免疫グロブリン分子又は免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、即ち、抗原と特異的結合をする抗原結合サイト、を有する分子を意味する。抗原と特異的結合をする分子は、抗原と結合するが他の分子と実質的に結合しない分子である。免疫グロブリン分子の免疫学的活性部位の例として、抗体をパパイン又はペプシン等を酵素で処理することにより得られるそれぞれＦ(ａｂ)及びＦ(ａｂ’)$_2$フラグメントが挙げられる。この用語は又、ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む。用語「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」は、特別なエピトープと免疫応答できる部位に結合しているただ１種類の抗原を含有する抗体分子の母集団を言う。

【００２２】

又、他の重要な例として、エンティティは、in vivoで触媒活性又は生物活性を示す試薬でもよい。これら試薬の例として、リシン等の細胞毒素；蛋白質分解酵素(例えば、組織型プラスミノゲン・アクチベータ又はウロキナーゼ型プラスミノゲン・アクチベータ)等の酵素；及び酵素阻害物質が挙げられる。エンティティは又、造影剤、放射性標識化し

た抗体物質、又は^{3}Ｈ、^{35}Ｓ、^{123}Ｉ、及び／又は^{131}Ｉ等の放射性同位元素等の検出可能な標識でも良い。

結合されたエンティティは、多数のより小さな治療用又は免疫原性試薬を封入又は取り込むようなより大きなエンティティであることが好ましい。例えば、多数のより小さい治療用、診断用又は免疫原性試薬を輸送するために使用できるエンティティとして、リポソーム、再封入したＲＢＣ、ミセル、ミクロスフィア、及び微粒子が挙げられる。

【００２３】

本発明の組成物中、任意の１又は複数のエンティティは、任意のカルボキシ末端ＨＣフラグメントへ結合してもよい。シングルフラグメントは同一又は異なる１以上のエンティティへ結合してもよい。又、シングルエンティティが、複数のフラグメント(それぞれは同一又は異なる。)と結合してもよい。

エンティティは、フラグメントの細胞通過能が非常に損なわれない限り、どの位置のカルボキシ末端ＨＣフラグメントへ結合してもよい。例えば、エンティティはフラグメントのカルボキシ末端またはその近傍へ結合してもよい。好ましくはエンティティは、フラグメントのアミノ末端又はその近傍へ結合される。

【００２４】

リンカーの実体は、様々でよい。結合に使用される詳細な化学的手法、リンカー又は方法、エンティティ及びBoNT ＨＣフラグメントの種類等のは、重要な要素ではない。結合は単に、上皮細胞によるフラグメントの小胞カプセル化において、フラグメントがエンティティから分離しないような充分な強度があるか弾力性がある必要がある。エンティティ及びフラグメントは例えばペプチド結合等の共有結合により結合されてもよい。しかし、強い非共有結合も又、使用できる。

又、リンカーは介在分子でもよく、その介在分子はその結合機能と共に化学的、治療用又は診断用機能を有しても有さなくても良い。リンカーとして使用できる介在分子の例として、ビオチン、アビジン、又は抗体物質が挙げられる。この種のリンカーは、エンティティ及びフラグメントの間に介在できる。

【００２５】

任意の単数又は複数のエンティティがペプチド又はポリペプチドの場合、エンティティは任意のフラグメントへペプチド結合により結合されて、エンティティ及びフラグメントを含有する一体化したポリペプチドを形成しても良い。例えば、カルボキシ末端ＨＣフラグメント及び任意のエンティティの両方を含有するように一体化したポリペプチドを調製できる。これらポリペプチドは、組み換え型発現ベクターからの融合ポリペプチドの発現により、又は例えば、固相方法等の化学的合成により、当分野で公知又は開発されたどのような方法ででも製造できる。

エンティティは又、エンティティそれ自身の中へフラグメントを組み込むことにより結合されてもよい。例えば、エンティティがリポソームの場合、フラグメントは、フラグメントの細胞通過機能部位が損なわれない状態でフラグメントの部分がリポソームの構造内に貫通し留まることが可能な特定のドメインを含む。

【００２６】

最終組成物を使用した、目的とする使用／投与経路に応じて、本発明の方法は化学的又は生物学的に不安定であるか可逆的手段でエンティティ及びフラグメントを結合する場合にも使用できる。例えば、その結合は、患者へ共投与された酵素により、又は組成物がデリバリーされる解剖学的域中に存在する公知のものにより、酵素開裂可能でもよい。又、１以上のジスルフィド結合が使用されてもよい。

エンティティ及びフラグメントは分離して調製されてから結合されてもよく、同時に調製されてもよい。

【００２７】

例えば、本発明の組成物はボツリヌス菌毒素に対するワクチンでもよく、ワクチン中ではエンティティ及びカルボキシ末端ＨＣフラグメントは内在性ポリペプチド分子として存在し、その場合リンカーはペプチド結合である。この本発明の例では、カルボキシ末端Ｈ

Ｃフラグメント／エンティティ内在性ポリペプチド分子は、ワクチンの対象である動物中の免疫反応を発現する免疫原性エピトープをエンコードする完全長BoNTの配列の部分を、少なくとも含有する。

【００２８】

使用されるエンティティのエピトープ又は特定のタイプに関係なく、引き起こされる免疫反応は、全身性免疫反応又は粘膜性免疫反応でもよい。本発明の組成物及び方法が適用される状況に応じて、特にそれに対して免疫性が発現されるべき抗原が有益及び有害／毒性のいずれの態様でも使用できる場合、全身性応答よりはむしろ粘膜性免疫反応を発現することが望ましい。

【００２９】

例えば、ボツリヌス菌毒素が生物戦又は生物テロの薬品として使用できる毒素であることは公知である。従って、本発明の組成物及び方法をボツリヌス菌毒素に対して使用する免疫手段が求められている。しかし、ボツリヌス菌毒素はアセチルコリンの過剰かつ不随意の放出により特徴つけられる機能障害を治療する治療薬として、通常使用されている。従って、ボツリヌス菌毒素への全身性免疫性を有する個体(患者)は、その後実質的にボツリヌス菌毒素治療の恩恵を受けることができない。

【００３０】

実質的には粘膜性免疫性のみを発現してこの問題を避けることのできるワクチンである本発明の組成物は、本発明のワクチン及び、実質的には粘膜性免疫性のみを選択的に発現するアジュバントを含有する組成物を使用して調製できる。このようなアジュバントとして、例えば、コレラ毒素Ｂサブユニット又は非メチル化オリゴヌクレオチドが挙げられる。アジュバントは、フラグメント結合した抗原又はフラグメント自体へ強く又は弱く結合してもよく、アジュバントが動物へ共投与されてもよい。

又、本発明のワクチンは動物中で実質的に粘膜性免疫性のみを発現するように調製でき、ワクチンはその動物へ、本発明の組成物中に粘膜性免疫反応を促進し、及び／又は全身性免疫反応を抑制するシグナル分子を含有させて投与される。これらシグナル分子として、インターロイキン又はトランスフォーミング増殖因子が挙げられる。シグナル分子は、フラグメント結合した抗原へ強く又は弱く結合しても、フラグメント自体でもよく、又、本発明の組成物と一緒に動物へ共投与してもよい。

【００３１】

本発明の組成物及び方法を使用する場合、多くの場合本発明の組成物の経上皮輸送は、一定方向に(即ち、上皮の頂端面から基底面へ、又は基底面から頂端面へ)行われる。トランスサイトーシスの効率は、脊椎動物の種類、選択された特定の上皮、及び／又は他の化学的又は生理学的因子に応じて変化するが、選択される上皮は公知のいずれのものでもよい。例えば、所定のイヌ腎臓上皮細胞培養物中で、セロタイプＡ及びＢのＨＣのカルボキシ末端フラグメントを使用した輸送は効率が良くない。従って、腎臓上皮は好ましくないことが示された。

エンティティ結合したカルボキシ末端ＨＣフラグメントにより通過される上皮は、好ましくは非角質であるか非角質化されたものである。皮膚以外の多くの上皮は通常非角質である。しかし、皮膚組織の脱角質化又は部分可溶化は、本発明の組成物及び方法の経皮使用を可能とする。一般的に適切な上皮の例として、消化器系(例えば、口、食道、胃、回腸、十二指腸、空腸、結腸、及び肛門)、鼻、肺、膣、及び眼性上皮が挙げられる。本発明の組成物の腹膜投与により(組成物が)到達する上皮も又、適切である。

【００３２】

広い種類の動物がボツリヌス菌による感染又は転移増殖に罹患する。本発明の組成物及び方法はこれら動物に好ましく適用される。従って、本発明の組成物は、好ましくは実質的に全ての脊椎動物で使用され、昆虫等の無脊椎動物における生理学的応答も発現する。

本発明の組成物及び方法が対象とする動物の種類の１種はヒトである。ヒト用には、Ａ、Ｂ、及びＥセロタイプの完全長ＨＣに由来するカルボキシ末端ＨＣフラグメントの使用が好ましい。更に、全てのBoNTセロタイプからの多くのフラグメントが家庭愛玩動物及び

農場家畜等の通常の動物で使用できる。従って、本発明の医薬的用途に類似する獣医学的使用も本発明の範囲内である。

【００３３】

当業者に理解されるとおり、特定の動物の上皮を通過するトランスサイトーシスへのフラグメントの能力は、フラグメントの主要配列、それに結合されたエンティティの種類／性質、フラグメントが由来するBoNTのセロタイプ等の種々の因子に応じて変化できる。例えば、セロタイプＣに由来するフラグメントは、ヒトで最も効率の良い経上皮デリバリーを示さないかもしれないが、非ヒト動物で比較的効果的な効率の良いデリバリーを促進するために使用できる。

【００３４】

この(動物)種により異なる能力は、(毒剤であるエンティティと共にヒト上皮を通過してトランスサイトーシスしないフラグメントを結合することにより)病虫菌予防用及び、殺虫目的のための本発明の組成物の使用を促進する。適切な病虫菌予防剤又は殺虫剤は、ヒトに対するよりも病虫菌又は害虫に対するより大きな有毒性を示し、多くの現在入手可能なものよりもより安全な病虫菌予防剤又は殺虫剤を製造するために使用できる。これらの試薬は、ヒトへの暴露が避けられない環境下(例えば、児童用設備又は食品製造設備等の状況)で特に有益である。

【００３５】

本発明には又、食品が含まれ、その場合、食品成分のゲノムがカルボキシ末端ＨＣフラグメントへ結合した、免疫原性又は治療用ポリペプチドを含有するキメラ蛋白質を発現的にエンコードするポリヌクレオチドを含有するように設計されている。必要であれば、キメラ蛋白質は又、１以上の補体成分蛋白質(ＨＡ又はNTNH；SEQ ID NO：２０～１６８及び１７０～１８８)、又は他の蛋白質又はポリペプチドを含有するように設計されてもよい。

【００３６】

このように遺伝学的に改変されることのできる成分の例として、バナナ、ジャガイモ、ほうれん草、大豆、及びトマトが挙げられる。成分は、ヒトへ別々に投与でき(例えば、加熱していない組み換え型バナナ、トマト、又はジャガイモの経口摂取により)、又、成分は、成分を含有する調理済み食品へ組み合わせることもできる(例えば、組み換え型バナナ片を含有するフルーツサラダ)。

【００３７】

本発明は、それにエンティティが活性成分として結合されたカルボキシ末端ＨＣフラグメントを含有する薬物及び医薬的又は獣医学的組成物の調製及び使用を含む。これら医薬組成物は、被検体投与用の適切な形態の、結合された活性成分のみから構成されても良い。又、医薬組成物は、結合された活性成分及び１以上の医薬的に許容できるビヒクル、１以上の追加的成分、又はこれらの幾つかの組み合わせを含有してもよい。被検体へのこれら医薬組成物の１種の投与は、本明細書の開示のいずれかに記載された被検体中の種々の機能障害のいずれかを、治療し、回復し、緩和し、それに対する免疫反応を引き起こし、予防し、抑制し、又は軽減するために有用である。活性成分は、当分野で公知のように生理学的に許容できるカチオン又はアニオンと組み合わせるような、生理学的に許容できるエステル又は塩の形で医薬組成物中に存在できる。

【００３８】

ここで使用される用語「医薬的に許容できるビヒクル」は、それと活性成分を組み合わせることができ、その組み合わせの後、活性成分を被検体へ投薬するために使用できる化学的組成物を意味する。

ここで使用される用語「生理学的に許容できる」エステル又は塩は、医薬組成物の他の成分のいずれとも親和性があり、組成物が投与される被検体に有毒でない活性成分のエステル又は塩形状を意味する。

【００３９】

本発明の医薬組成物の配合は、公知の又は薬理学の分野で公知又は開発されたいずれか

の方法により調製できる。一般に、これらの調製方法は、活性成分をビヒクル又は１以上の他の副成分と接触させ、次に必要ならば又は望ましくは、生成物を成形又は包装して、目的とする単回用又は複数回の服用単位とするステップを含む。

【００４０】

上記医薬組成物の記載は処方箋でのヒトへの投与用に適切な医薬組成物を主な対象としているが、これら組成物は全ての種類の動物への投与にも一般的に適切なことは当業者には当然である。本発明の組成物を種々の動物への投与用に適切とするために、ヒトへの投与用に適切な医薬組成物を改変することは、良く理解でき、獣医学や薬理学の当業者は通常、必要であれば試験して、これら改良を簡単に設計及び実施することができる。本発明の医薬組成物の投与が意図される被検体として、ヒト及び他の霊長類；ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、及びイヌ等の市販されている哺乳類を含む哺乳類；ニワトリ、カモ、ウズラ、ガン、及び七面鳥を含む市販されている鳥類等の鳥類；養殖魚及び鑑賞魚等の魚；及び養殖貝及び軟体類等の甲殻類が挙げられるが本発明を制限するものではない。

【００４１】

本発明の方法に使用できる医薬組成物は、胃腸、口、直腸、膣、腸管外(非経口)、局所的(経皮的)、肺、鼻内、口腔、眼、又は別の投与経路用に適切な配合で製造され、包装され、又は販売されることができる。他の意図される配合物として、放射状ナノ粒子、リポソーム製薬品、活性成分を含有する再封入した赤血球、及び免疫学的ベースの配合が挙げられる。

本発明の医薬組成物はバルクで、単回服用量、複数の単回服用量として製造され、包装され、又は販売できる。ここで使用される「服用量」とは、活性成分の所定量を含有する医薬組成物の別々の量である。活性成分量は、一般的には被検体へ投与される活性成分の投薬量、又は例えばその投薬量の二分の一又は三分の一の投薬量等の便利な分割部分と同じである。

【００４２】

本発明の医薬組成物中の活性成分、医薬的に許容できるビヒクル、及びいずれかの追加的成分の関係量は、治療される被検体の実体、サイズ、及び状態に依存し、更に組成物が投与される経路に依存して変化できる。例えば、組成物は０．１％～１００％(ｗ／ｗ)の活性成分を含有してもよい。本発明の医薬組成物の１の服用単位は、一般的に約１μｇ～約１グラムの活性成分、好ましくは約１００μｇ～約１００ｍｇの活性成分を含有できる。

【００４３】

活性成分に加えて、本発明の医薬組成物は更に、１以上の追加的医薬剤を含有してもよい。特に意図される追加的試薬として、胃腸管部分の酸性ｐＨ環境の影響からBoNT ＨＣフラグメント－エンティティ複合体を遮蔽出来る成分が挙げられる。公知又は開発された腸内デリバリー作用のための実質的に全ての配合物及び器具が使用できる。更に、上記のとおり特に組成物が経口又は胃腸管のいずれかの部分経由で投与される場合、医薬組成物は実際にBoNT毒素(ＨＡ及びNTNH)と弱く結合された１以上の補体成分蛋白質(例えば、SEQ ID No：２０～１６８及び１７０～１８８)を含有してもよい。蛋白質の変化はBoNTのセロタイプの変化に関連することは当分野で公知であるが、この関係が本発明の実施においても維持されることは必要ではない。

本発明の医薬組成物の制御－又は徐放性配合物は、従来技術を使用して製造できる。

【００４４】

経口投与用に適切な本発明の医薬組成物の配合物は、本発明を制限するものではないが、それぞれ所定の活性成分量を含有する錠剤、ハード又はソフトカプセル、カシェ剤、トローチ、又はロゼンジ等の別々の固体服用単位の形で製造され、包装され、又は販売されることができる。他の経口投与用の適切な配合物として、本発明を制限するものではないが、粉状又は粒子状配合物、水性又は油性懸濁液、水性又は油性溶液、又はエマルジョンが挙げられる。

ここで使用される「油状」液体とは、炭素含有液体分子を含有し、水より低い極性を示

すものである。

【００４５】

活性成分を含有する錠剤は、例えば任意で１以上の追加的成分と共に、活性成分を圧縮又は成形して製造できる。圧縮錠は適切な器具中で、粉又は粒子状調剤等の易流動性形状の活性成分を圧縮して製造でき、任意で１以上の結合剤、滑剤、賦形剤、表面活性剤、及び分散剤を混合してもよい。成形錠は適切な器具中で、活性成分、医薬的に許容できるビヒクル、及び混合物を湿らせるために少なくとも充分な液体の混合物を成形して製造できる。錠剤の製造に使用される医薬的に許容できる賦形剤として、本発明を制限するものではないが、不活性希釈剤、粒状化剤及び崩壊剤、結合剤、及び潤滑剤等が挙げられる。適切な分散剤として、本発明を制限するものではないが、ジャガイモスターチ及びスターチグリコレートナトリウムが挙げられる。公知の表面活性剤として、本発明を制限するものではないが、ナトリウムラウリルサルフェートが挙げられる。公知の希釈剤として、本発明を制限するものではないが、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、微晶質セルロース、リン酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、及びリン酸ナトリウムが挙げられる。適切な粒状化剤、崩壊剤として、本発明を制限するものではないが、コーンスターチ及びアルギン酸が挙げられる。結合剤として、本発明を制限するものではないが、ゼラチン、アカシア、予備ゼラチン化トウモロコシスターチ、ポリビニルピロリドン、及びヒドロキシプロピルメチルセルロースが挙げられる。潤滑剤として、本発明を制限するものではないが、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、シリカ、及びタルクが挙げられる。

【００４６】

錠剤は被覆されていなくてもよく、又、被検体の胃腸管中での崩壊遅延とそれによい生じる活性成分の徐放及び吸収を達成するために公知又は開発された方法を使用して被覆されてもよい。例えば、グリセリルモノステアレート又はグリセリルジステアレート等の材料が、錠剤を被覆するために使用できる。更に例えば、錠剤は、浸透圧制御性放出錠剤を形成するための、米国特許第４２５６１０８、４１６０４５２、及び４２６５８７４号に記載された方法を使用して被覆されてもよい。医薬的に洗練され、口当たりの良い調剤を提供するために、錠剤は更に甘味剤、風味剤、着色剤、防腐剤、又はこれらの組み合わせを含有してもよい。

【００４７】

活性成分を含有するハードカプセルは、ゼラチン等の生理学的分解性組成物を使用して製造できる。これらハードカプセルは活性成分を含有し、更に、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、又はカオリン等の不活性固体希釈剤等の追加的成分を含有してもよい。

活性成分を含有するソフトゼラチンカプセルは、ゼラチン等の生理学的分解性組成物を使用して製造できる。これらソフトカプセルは活性成分を含有し、それは、水又は；落花生油、液体パラフィン若しくはオリーブ油等の油媒体；と混合されてもよい。

【００４８】

経口用組成物は、ヒト患者の小腸又は大腸中で経口投与される試薬を特異的に放出する公知の技術を使用して製造できる。例えば、結腸を含む胃腸システムへのデリバリー用配合物として、例えば、ｐＨ６以上でのみ易溶性であり、ポリマーが小腸へ進入したときのみ溶解を開始するようなポリ(メタクリル酸、メチルメタクリレート)等のメタクリレートコポリマーベースの腸内的に被覆されたシステムが挙げられる。これらポリマー配合物が崩壊する部位は、腸内通過速度及び存在するポリマー量に依存する。例えば、比較的厚いポリマー被膜が近位の結腸へのデリバリーのために使用される(Hardyら、1987 Aliment.Pharmacol.Therap.1:273-280)。その場合、部位特定型結腸用デリバリー可能なポリマーも又、使用でき、ポリマーが大腸の細菌性フロラによりポリマー被覆の酵素的分解が引き起こされて医薬を放出する。例えば、アゾポリマー(米国特許第４６６３３０８号)、グリコシド(Friendら、1984、J.Med.Chem.27:261-268)及び種々の天然由来の及び修飾されたポリサッカリド(国際公開第ＰＣＴＧＢ８９／００５８１号)がこれら配合物中で使用できる。

【００４９】
米国特許第４７７７０４９号に記載されたようなパルス放出技術も又、活性剤を胃腸管内の特定の部位へ投与するために使用できる。これらシステムは、in vivoで、医薬を所定の時間にデリバリーすることを可能とし、薬剤の安定性及び(直接的に結腸での)摂取を促進するために局所的ミクロ環境を変化させ、活性剤のin vivo投与のために水の存在以外の外部の条件に影響されない他の任意の添加剤と一緒にデリバリーするために使用できる。
【００５０】
経口投与に適切な本発明の医薬組成物の液体配合物は、液状又は使用前に水又は別の適切なビヒクルで再成可能な乾燥品の形状のいずれかで、製造され、包装され、及び販売されることができる。
【００５１】
液体懸濁液は、水性又は油性ビヒクル中で活性成分の懸濁液を得るために従来の方法を使用して調製できる。水性ビヒクルとして、例えば、水及び生理(等張性)食塩水が挙げられる。油性ビヒクルとして、例えば、アーモンド油；油性エステル；エチルアルコール；落花生、オリーブ、ゴマ、又はヤシ油等の野菜油；分留精製野菜油；及び液体パラフィン等の鉱物油が挙げられる。液体懸濁液は更に、本発明を制限するものではないが、懸濁剤、分散剤又は湿潤剤、乳化剤、粘滑剤、防腐剤、緩衝剤、塩、香味料、着色剤、及び甘味剤等の１以上の追加的成分を含有してもよい。油性懸濁液は、更に増粘剤を含有してもよい。懸濁剤として、本発明を制限するものではないが、ソルビトールシロップ、水素化食用脂、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガム、アカシアガム、並びにカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、及びヒドロキシプロピルメチルセルロース等のセルロース誘導体が挙げられる。分散剤又は湿潤剤として、本発明を制限するものではないが；レシチン等の天然分泌性リン脂質；アルキレンオキシドの、脂肪酸との縮合物、長鎖脂肪族アルコールとの縮合物、脂肪酸及びヘキシトールに由来する部分エステルとの縮合物、又は脂肪酸及びヘキシトール無水物に由来する部分エステルとの縮合物(例えばポリオキシエチレンステアレート、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート、及びポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、それぞれ)が挙げられる。乳化剤として、本発明を制限するものではないが、レシチン及びアカシアが挙げられる。防腐剤として、本発明を制限するものではないが、メチル、エチル、又はｎ－プロピル－para－ヒドロキシベンゾエート、アスコルビン酸、及びソルビン酸が挙げられる。甘味剤として、例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、スクロース、及びサッカリンが挙げられる。油性懸濁液用の増粘剤として、例えば、蜜ロウ、ハードパラフィン、及びセチルアルコールが挙げられる。
【００５２】
水性又は油性溶媒中の活性成分の液体溶液は、液体懸濁液と実質的に同じ方法で調製でき、主な違いは、活性成分は溶媒中で懸濁するのではなく溶解することである。本発明の医薬組成物の液体溶液は、液体懸濁液に関して記載されたそれぞれの成分を含有してもよく、懸濁剤は、溶媒中に活性成分を溶解することを必ずしも促進しないことは当然である。水性溶媒として、例えば水及び生理食塩水が挙げられる。油性溶媒として、例えばアーモンド油；油性エステル；エチルアルコール；落花生、オリーブ、ゴマ、又はヤシ油等の野菜油；分留精製野菜油；及び液体パラフィン等の鉱物油が挙げられる。
【００５３】
本発明の医薬的調剤の粉状及び粒子状配合物は、公知の方法を使用して調製できる。これら配合物は、例えば、錠剤を形成して、カプセル中に充填して、又は水性又は油性ビヒクルを添加することにより水性又は油性懸濁液又は溶液を調製して、直接被検体へ投与されてもよい。これら配合物のそれぞれは更に、１以上の分散剤又は湿潤剤、懸濁剤、及び防腐剤を含有してもよい。充填剤及び甘味剤、香味料又は着色剤等の追加的賦形剤も又、これら配合物へ含有されてもよい。

【００５４】
本発明の医薬組成物は又、水中油滴型エマルジョン又は油中水滴型エマルジョンの形状で製造され、包装され、又は販売されてもよい。油相はオリーブ油又は落花生油等の野菜油；液体パラフィン等の鉱物油、又はこれらの組み合わせでもよい。これら組成物は更に、アカシアガム又はトラガカントガム等の天然分泌性ガム；大豆又はレシチンリン脂質等の天然分泌性リン脂質；ソルビタンモノオレエート等の脂肪酸及びヘキシトール無水物の組み合わせに由来するエステル又は部分エステル；及びポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート等の、上記部分エステルとエチレンオキシドとの縮合物等の１以上の乳化剤を含有してもよい。これらエマルジョンは又、例えば、甘味剤又は香味料等の追加的成分を含有してもよい。
本発明の医薬組成物は、直腸投与に適切な配合物として製造され、包装され、又は販売されてもよい。これら組成物は、例えば、坐剤、停滞用浣腸医薬品、及び直腸又は結腸の洗浄用溶液の形状でもよい。
【００５５】
坐剤配合物は、活性成分を刺激性の少ない医薬的に許容できる賦形剤と組み合わせて製造できる。その賦形剤は通常の室温(即ち、約２０℃)で固体であり、被検体の直腸温度(即ち健康なヒトでは約３７℃)では液体である。適切な医薬的に許容できる賦形剤として、本発明を制限するものではないが、ココアバター、ポリエチレングリコール、及び種々のグリセリドが挙げられる。坐剤配合物は更に、本発明を制限するものではないが、酸化防止剤及び防腐剤等の種々の追加的成分を含有してもよい。
【００５６】
停滞用浣腸剤又は直腸又は結腸洗浄用溶液は、活性成分を医薬的に許容できる液体ビヒクルと組み合わせて製造できる。当分野で公知のように、浣腸剤は、被検体の解剖学的直腸部位へ適用できるデリバリー器具を使用して、その中に封入されて投与されても良い。浣腸剤は、本発明を制限するものではないが、酸化防止剤及び防腐剤等の更に種々の追加的成分を含有してもよい。
【００５７】
本発明の医薬組成物は膣内投与に適切な配合物として、製造され、包装され、又は販売されてもよい。これら組成物は、例えば、坐剤；タンポン等の含浸(充填)され又は被覆された膣内挿入可能な材料、圧注用剤、又は膣内洗浄用溶液等の形でもよい。
化学的組成物による材料の含浸又は被膜方法は、当分野で公知であり、本発明を制限するものではないが、化学的組成物を表面上へ付着又は結合する方法、化学的組成物を材料の構造中へ材料(即ち、生理学的分解性材料等)の合成中に組み込む方法、及び水性若しくは油性溶液又は懸濁液を吸収性材料中に吸収させ、次に乾燥してもしなくてもよい方法、が挙げられる。
【００５８】
圧注用剤又は膣内洗浄用溶液は、活性成分を医薬的に許容できる液体ビヒクルと組み合わせて製造できる。当分野で公知のように、圧注用剤は、被検体の解剖学的膣部位へ適用できるデリバリー器具を使用して、その中に封入されて投与されても良い。圧注用剤は、本発明を制限するものではないが、酸化防止剤、抗生物質、抗カビ剤、及び防腐剤等の更に種々の追加的成分を含有してもよい。
【００５９】
ここで使用される、医薬組成物の「腸管外投与」とは、被検体の組織の物理的進入及び組織中へのその進入による医薬組成物の投与が行なわれるいずれの投与経路も含む。従って腸管外投与として、本発明を制限するものではないが、組成物の注入、外科的切開部を通しての組成物の適用、組織貫入的非外科的損傷を通しての組成物の適用等による医薬組成物の投与が挙げられる。特に、意図される腸管外投与として、本発明を制限するものではないが、皮下、腹膜内、静脈内、動脈内、筋肉内、又は胸骨内注射技術及び静脈内、動脈内、又は腎臓透析点滴技術が挙げられる。
【００６０】

腸管外投与に適切な本発明の医薬組成物の配合物として、無菌水又は無菌生理食塩水等の医薬的に許容できるビヒクルと組み合わせたフラグメント結合した活性成分が挙げられる。これら配合物は、ボーラス投与又は連続的投与に適切な形状で製造され、包装され、又は販売されてもよい。注入可能な配合物は、アンプル中、防腐剤を含有する複数回服用容器中、又は自己注射若しくは医者による注射用使い捨て器具中等の投薬単位の形状で製造され、包装され、又は販売されてもよい。腸管外投与用配合物として、本発明を制限するものではないが、懸濁液、溶液、油性又は水性ビヒクル中のエマルジョン、ペースト、及び埋込み可能な徐放性又は生分解性配合物が挙げられる。これら配合物は更に、本発明を制限するものではないが、懸濁剤、安定剤、又は分散剤等の１以上の追加的成分を含有してもよい。腸管外投与用配合物の例として、活性成分は、再生可能な乾燥状態(即ち、粉又は粒子状)であり、組成物の腸管外投与前に適切なビヒクル(例えば、無菌パイロジェンフリー水)で再成される形で提供されてもよい。

【００６１】

医薬組成物は、無菌注入可能な水性又は油性懸濁液又は溶液の形状で製造され、包装され、又は販売されてもよい。この懸濁液又は溶液は、当分野の方法により配合され、活性成分に加えて、上記分散剤、湿潤剤、又は懸濁剤等の追加的成分を含有してもよい。これら無菌注入可能な配合物は、たとえ水又は１，３－ブタンジオール等の無毒性腸管外適用可能な希釈剤又は溶媒を使用して調製されることができる。他の適用可能な希釈剤及び溶媒として、本発明を制限するものではないが、リンゲル液、生理食塩水、及び合成モノ－又はジ－グリセリド等の不揮発性油が挙げられる。他の使用できる腸管外投与可能配合物として、微晶質性形状で、リポソーム調剤で、又は生分解性ポリマーシステムの構成要素として、活性成分を含有するものが挙げられる。徐放性又は埋込み用組成物は、エマルジョン、イオン交換樹脂、難溶性ポリマー、又は難溶性塩等の医薬的に許容できるポリマー性又は疎水性材料を含有してもよい。

【００６２】

局所的(経皮的)投与に適切な配合物として、本発明を制限するものではないが、リニメント剤、ローション剤、クリーム等の水中油滴型若しくは油中水滴型エマルジョン、軟膏若しくはペースト及び溶液若しくは懸濁液等の液体又は半流動体調剤が挙げられる。局所的投与可能配合物は約１％～約１０％(ｗ／ｗ)の活性成分を含有してもよいが、活性成分の濃度は溶媒中の活性成分の溶解限度と同じ程度の濃度である。局所投与用配合物は、更に上記追加的成分を１以上含有してもよい。局所的に投与される配合物は非角質上皮組織(例えば、口、鼻、又は喉の内側)へ投与され、これら投与を行なうためのアプリケーター又はディスペンサーと一緒に提供されてもよい。

【００６３】

本発明の医薬組成物は、口腔経由の肺投与用に適切な配合物として製造され、包装され、又は販売されてもよい。これら配合物は、活性成分を含有し、直径が約０．５～約７ｎｍの範囲、好ましくは約１～約６ｎｍである乾燥粒子を含有してもよい。これら組成物は、噴射剤の流れが粉を分散する方向に向けられている乾燥粉リザーバーを備えた器具を使用して、又は密封容器中の低沸点噴射剤に溶解又は懸濁された活性成分を含む器具等の自己噴射性溶媒／粉－投与用容器を使用して、投与するための乾燥粉の形状が便利である。好ましくは、これら粉は、９８重量％以上の粒子が０．５ｎｍを超える直径を有し、粒子の数で９５％以上が７ｎｍ未満の直径を有する粒子を含有する。更に好ましくは、９５重量％以上の粒子が１ｎｍを超える直径を有し、粒子の数の９０％以上が６ｎｍ未満の直径を有する。乾燥粉組成物は好ましくは、糖等の固体微粉希釈剤を含有し、単回服用単位剤形で便利に提供される。

【００６４】

低沸点噴射剤として一般的に、大気圧下で６５°Ｆ以下の沸点を有する液体噴射剤が挙げられる。一般的には、噴射剤は、組成物の５０～９９．９％(ｗ／ｗ)を構成し、活性成分は組成物の０．１～２０％(ｗ／ｗ)を構成する。噴射剤は更に、液体非イオン性又は固体アニオン性界面活性剤又は固体希釈剤(好ましくは活性成分含有粒子と同じオーダーの

粒子サイズを有する。)等の追加的成分を含有してもよい。

【００６５】

肺デリバリー用に配合された本発明の医薬組成物は又、溶液又は懸濁液の小滴の形状の活性成分として提供できる。これら配合物は、任意で無菌で、活性成分を含有する水性又は希アルコール性溶液又は懸濁液として製造され、包装され、又は販売されてもよく、いずれの噴霧(nebulization、atomization)用器具を使用しても便利に投与できる。これら配合物は更に、本発明を制限するものではないが、サッカリンナトリウム等の風味剤、揮発性油、緩衝剤、表面活性剤、又はメチルヒドロキシベンゾエート等の防腐剤等の１以上の追加的成分を含有してもよい。この投与経路で提供される小滴は、好ましくは平均直径が約０．１～約２００ｎｍの範囲である。

ここで記載された肺デリバリーに使用できる配合物は又、本発明の医薬組成物の鼻内デリバリーにも使用できる。

【００６６】

鼻内投与に適切な別の配合物は、活性成分を含有し、約０．２～５００μｍの平均粒子を有する粗粉である。これら配合物は、鼻性呼吸が行なわれる方法、即ち、外鼻孔近くに設けられた粉容器から鼻経路を通じて急速吸入することにより、投与される。

鼻投与に適切な配合物として、例えば活性成分を約０．１％(ｗ／ｗ)の少量から１００％(ｗ／ｗ)の多量まで含有してもよく、更に１以上の上記追加的成分を含有してもよい。

【００６７】

本発明の医薬組成物は口腔投与に適切な配合物として製造され、包装され、又は販売されてもよい。これら配合物は、例えば、従来法を使用して製造された錠剤又はロゼンジ錠の形状でもよく、例えば、０．１～２０％(ｗ／ｗ)の活性成分と、その残部は口内で溶解可能又は分解性組成物、更に任意で１以上の上記追加的成分を含有してもよい。又、口腔投与に適切な配合物は、活性成分を含有する粉又は、エアロゾル化若しくは噴霧化した溶液又は懸濁液を含んでもよい。これら粉状化、エアロゾル化、又は噴霧化した配合物は、分散される場合、好ましくは約０．１～約２００ｎｍの範囲の平均粒子径又は平均小滴径を有し、更に１以上の上記追加的成分を含有してもよい。

【００６８】

本発明の医薬組成物は、眼投与に適切な配合物として製造され、包装され、又は販売されてもよい。これら配合物として、例えば、水性又は油性液体ビヒクル中の活性成分０．１～１．０％(ｗ／ｗ)溶液又は懸濁液等の目薬の形状が挙げられる。これら目薬は更に、緩衝剤、塩、又は１以上の他の上記追加的成分を含有してもよい。

他の使用できる眼科的投与可能配合物として、微晶質性形状又はリポソーム調剤での活性成分が挙げられる。

【００６９】

ここで使用される「追加的成分」として、本発明を制限するものではないが、１以上の下記成分が挙げられる：賦形剤；表面活性剤；分散剤；不活性希釈剤；粒状化剤及び崩壊剤；結合剤；潤滑剤；甘味剤；香味料剤；着色剤；防腐剤；ゼラチン等の生理学的分解性組成物；水性ビヒクル及び溶媒；油性ビヒクル及び溶媒；懸濁剤；分散剤又は湿潤剤；乳化剤；粘滑剤；緩衝剤；塩；増粘剤；充填剤；乳化剤；酸化防止剤；抗生物質；抗カビ剤；安定剤；及び医薬的に許容できるポリマー性又は疎水性材料。本発明の医薬組成物中に含有できる他の「追加的成分」として、例えばGenaro、ed.、1985、「Remington's Pharmaceutical Sciences」Mack Publishing Co.、Easton、PA、米国(ここで資料として使用する。)に記載されている当分野で公知であるものが挙げられる。

【００７０】

通常医師又は獣医であれば、被検体の機能障害を治療、回復、軽減、抑制、予防、緩和し、又は免疫反応を発現するための本発明の化合物の有効量を容易に決定し、処方できることは当然である。その手続中、医師又は獣医は、例えば、最初に比較的定量の投薬量を処方し、続いて適切な応答が得られるまで投薬量を増加させることができる。しかし、特定の被検体に対する特定の投薬レベルは、使用される特定の化合物の活性、被検体の年齢

、体重、身体の健康、性別、及び食事、投与時間、投与経路、排出速度、医薬品の組み合わせ、並びに機能障害の程度等の種々の因子に依存する。

【００７１】

本発明は又、本発明の医薬組成物及び取扱い説明書を含むキットに関する。ここで使用される、「取扱い説明書」として、被検体の機能障害を、治療、回復、軽減、抑制、予防、又は緩和するため、又はこれら組成物を上記経路を通して投薬するための本発明の医薬組成物の有用性を伝達するために使用される、印刷物、記録物、図表、又は他の表現媒体が挙げられる。取扱い説明書は又、例えば本発明の医薬組成物の適切な投薬量も表す。本発明のキットの取扱い説明書は、例えば、本発明の医薬組成物を備えた容器へ貼り付けられ、又は医薬組成物を含む容器に一緒に載置されてもよい。一方、取扱い説明書は、取扱い説明書及び医薬組成物が患者により協同的に使用されることを意図して、容器と分離して載置されてもよい。

【００７２】

本発明は又、本発明の医薬組成物及び、組成物を被検体へデリバリーするためのデリバリー器具を含むキットに関する。例えば、デリバリー器具として、圧縮式スプレーボトル、投薬目盛り付きスプレーボトル、エアロゾルスプレー器具、アトマイザー、乾燥粉デリバリー器具、自己噴射性溶媒／粉投与用器具、シリンジ、針、タンポン、又は投薬量測定容器が挙げられる。キットは更に上記取扱い説明書を含有してもよい。

【００７３】

本発明を下記実施例を参照して記載する。これら実施例は、本発明の例示にのみ提供されるものである。本発明は、これら実施例により制限されるものではなく、ここで提供された知見の結果として明らかな全ての変更をも含むものである。

【実施例】

【００７４】

実施例に詳述した実験結果を表１に示す。

【００７５】

【表１】

実施例	分子[A]	ｾﾛﾀｲﾌﾟ	細胞種[B]	輸送A⟶B[C]	輸送B⟶A[C]	輸送率(fmol/hr/cm²)[D]
1	BoNT	A	T-84	+		図3
2	BoNT	A	MDCK	−		図4
3	^{125}I-BoNT	A	T-84	+		11.29 ± 0.30
4	^{125}I-BoNT	A	T-84		+	8.98 ± 0.20
5	^{125}I-BoNT	A	Caco-2	+		8.42 ± 0.49
6	^{125}I-BoNT	A	MDCK	±		0.05 ± 0.01
7	^{125}I-uBoNT	B	T-84	+		9.01 ± 0.44
8	^{125}I-uBoNT	B	MDCK	−		0.05 ± 0.00
9	^{125}I-uBoNT	B	T-84		+	4.48 ± 0.00
10	^{125}I-uBoNT	B	MDCK		−	0.05 ± 0.00
11	^{125}I-nBoNT	B	T-84	+		6.57 ± 0.07
12	^{125}I-nBoNT	B	MDCK	−		0.05 ± 0.00
13	^{125}I-nBoNT	B	T-84		+	5.54 ± 0.00
14	^{125}I-nBoNT	B	MDCK		−	0.05 ± 0.00
15	HC	A	T-84	+		図5
16	HC	A	MDCK	−		図6
17	^{125}I-HC	A	T-84	+		7.10 ± 0.00
18	^{125}I-HC	A	MDCK	−		0.06 ± 0.00
19	66kHC	A	T-84	+		図7
20	66kHC	A	MDCK	−		図8
21	50kHC	A	T-84	+		図9
22	50kHC	A	MDCK	−		図10
23	^{125}I-50kHC	A	T-84	+		13.97 ± 0.00
24	^{125}I-50kHC	A	MDCK	−		0.06 ± 0.00
25	AF-BoNT	A	T-84	+		図11
26	AF-BoNT	A	MDCK	−		図12
27	bt-50kHC	A	T-84	+		図13
28	bt-50kHC	A	MDCK	−		図14
29	GFP-66kHC	A	T-84	+		図15
30	GFP-66kHC	A	MDCK	−		図16
31	Stag-50kHC	A	T-84	+		図17
32	Stag-50kHC	A	MDCK	−		図18
33	GST-88kHC	A	T-84	+		図19
34	GST-88kHC	A	MDCK	−		図20
35	GST-66kHC	A	T-84	+		図21
36	GST-66kHC	A	MDCK	−		図22
37	^{125}I-BoNT	A	Calu-3	+		0.422 ± 0.076
38	^{125}I-BoNT	A	Calu-3		+	0.206 ± 0.037
39	^{125}I-HC	A	Calu-3	+		0.198 ± 0.007
40	^{125}I-HC	A	Calu-3		+	0.112 ± 0.033
41	^{125}I-BoNT	A	RAEC	+		0.376 ± 0.014
42	^{125}I-BoNT	A	RAEC		+	0.159 ± 0.027
43	^{125}I-HC	A	RAEC	+		0.140 ± 0.050
44	^{125}I-HC	A	RAEC		+	0.132 ± 0.026
45	^{125}I-BoNT	A	mRT	+		図23
46	^{125}I-HC	A	mRT	+		図24
47	6×his-50kHC	A	mRT	+		図25
48	GST-50kHC	A	mRT	+		図26
49	GST-50kHC	A	mRT	+		図27
50	6×his-50kHC	A	mRT	+		±
51	CTBS-50kHC	A	mRT	+		図28
52	完全長HC(100kDa)	A	口	+		図29
53	HC及びそのﾌﾗｸﾞﾒﾝﾄ	A&B	in vivo; in vitro	+	+	—

【００７６】

[A]略語は下記の通り：

ＢｏＮＴ＝ボツリヌス菌神経毒(ホロトキシン)；

ｎＢｏＮＴ＝切れ目のある(nicked)BoNT、即ち、ＨＣ及びＬＣに開裂し、ジスルフィド結合により結合されているBoNT前駆体ポリペプチド；
ｕＢｏＮＴ＝切れ目のない(un-nicked)BoNT、即ち、開裂されずにいるBoNT前駆体ポリペプチド(１５０ｋＤａ)；
ＨＣ＝ボツリヌス菌神経毒の重鎖；
８８ｋＨＣ＝８８キロドルトンＨＣカルボキシ末端フラグメント(図２参照)；
６６ｋＨＣ＝６６キロドルトンＨＣカルボキシ末端フラグメント(図２参照)；
５０ｋＨＣ＝５０キロドルトンＨＣカルボキシ末端フラグメント(図２参照)；
４８ｋＨＣ＝２キロドルトンのカルボキシ末端が切除された５０ｋＨＣフラグメント(図２参照)；
ＡＦ＝商標「ALEXAFLUOR」５６８蛍光染料；
ｂｔ＝ビオチン；
ＧＦＰ＝緑色蛍光蛋白質；
ＧＳＴ＝グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ；
Ｓｔａｇ＝商標「S-TAG」システム(１５ａａS-TAGペプチド及びリボヌクレアーゼＳ－蛋白質、Novagen社製、Madison、Wisconsin、米国)；
６×ｈｉｓ＝ヘキサヒスチジン標識；並びに
ＣＴＢＳ＝コレラ毒素Ｂサブユニット。
[B]細胞種は下記の通り：
Ｔ－８４＝T-84ヒト消化管上皮細胞；
ＭＤＣＫ＝Madin-Darbyイヌ腎臓上皮細胞；
Ｃａｃｏ－２＝Caco－２ヒト消化管上皮細胞；
Ｃａｌｕ－３＝Calu－３ヒト肺上皮細胞；
ＲＡＥＣ＝ラット肺胞上皮細胞；並びに
ｍＲＴ＝ネズミ気道細胞(in vivo)。
[C]Ａ＝細胞の頂端面、及び、Ｂ＝細胞の基底面。
[D]率は平均±平均の標準誤差を上皮表面のフェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}で表した。

【００７７】

ここに記載した実施例で使用した材料及び方法は、個々の実施例で特記する場合を除き、下記の通りである。

天然及び組み換え型蛋白質、天然毒素及び天然鎖。

ボツリヌス菌神経毒(BoNT)並びにＨＣ及び軽鎖(ＬＣ)構成要素を資料に記載されている標準技術(「DasGupta and Sathyamoorthy」1984;Simpsonら、1988)を使用して単離した。

【００７８】

BoNTＬＣを発現するプラスミドの構築

ＤＮＡフラグメント単離用標準技術、ＤＮＡポリメラーゼＩのKlenowフラグメントによる張り出し末端の修復、及びＴ４ＤＮＡリガーゼによるライゲーションを使用した。全てのクローン化ステップ及び発現は、ｐＲＥＰ４リプレッサープラスミドを含有するＥ．ｃｏｌｉＭ－１５(Qiagen社製、Chatsworth、CA、米国)中で行なった。BoNTＬＣ(ｒＬ鎖)をコードするＤＮＡフラグメントは、下記配列を有するプライマーを使用してプラスミドｐＣＬ８から増幅した：forward、ＣＣＣＡＡＴＡＡＣＡ　ＡＴＴＡＡＣＡＡＣＴ　ＴＴＡＡＴ(SEQ ID NO：８)；及びreverse、ＴＴＴｃｔｇｃａｇＣ　ＴＡＴＴＴＡＴＴＡＴ　ＡＴＡＡＴＧＡＴＣＴ　ＡＣＣＡＴＣ(SEQ ID NO：９)、但し、ＰｓｔＩ制限酵素切断部位は、下付(小)文字で表す。１個のシトシンをforwardプライマーの５’末端へ添加し、ＢａｍＨＩ制限酵素切断部位の再構築を行い、又、翻訳メチオニンのｐＱＥ－３０開始フレーム中の軽鎖ＤＮＡのクローン化を行った。reverseプライマー中で、ＰｓｔＩ制限酵素切断部位を終止コドンのすぐ下流に導入した。増幅した生成物を精製し、Ｔ４ポリメラーゼで処理し、ＰｓｔＩで切断し、発現ベクターｐＱＥ－３０のKlenow－充填ＢａｍＨＩ及びＰｓｔＩ制限酵素切断部位との間に挿入し、プラスミドｐＱＥ－ＬＣ１を生成した。ｐＱＥ－ＬＣ１の構造はＤＮＡシークエンシングで確認した。

【００７９】

ＨＣ(カルボキシ末端ＨＣフラグメント)の短縮(truncation)突然変異体を発現するプラスミドの構築

(商標「GENBANK」登録番号Ｘ７３４２３で記載されているヌクレオチド配列SEQ ID NO：１０、を有する。)構造遺伝子は、BoNTセロタイプＡ(BoNT A)のＨＣの８８キロドルトン(８８Ｋ)、６６キロドルトン(６６Ｋ)、又は５０キロドルトン(５０Ｋ)フラグメントをエンコードしており、ＰＣＲにより産出した。これらＨＣフラグメントはここで表される「８８ｋＨＣ」「６６ｋＨＣ」及び「５０ｋＨＣ」である。

【００８０】

８８ｋＨＣをエンコードするＤＮＡフラグメント(SEQ ID NO：１０；SEQ ID NO：１１のヌクレオチド残基１６０９－３９８７)を、下記オリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅した：forwardプライマー(SEQ ID NO：１０のヌクレオチド残基１６０９－１６３２)ＣＧＣｇｇｔａｃｃＡ　ＣＣＴＴＴＡＡＴＴＴ　ＴＧＡＴＡＡＴＧＡＡ　ＣＣＴ(SEQ ID NO：１２)、reverseプライマー(SEQ ID NO：１０のヌクレオチド残基３９８７－３９６８)ＡＡＣＣＣｃｔｇｃａ　ｇＴＴＡＣＡＧＴＧＧ　ＣＣＴＴＴＣＴＣＣＣ　Ｃ(SEQ ID NO：１３)、ただしforwardプライマー配列中のＫｐｎＩ制限酵素切断部位及びreverseプライマー配列中のＰｓｔＩ制限酵素切断部位は、下付(小)文字で表す。

【００８１】

６６ｋＨＣをエンコードするＤＮＡフラグメント(SEQ ID NO：１０；SEQ ID NO：１４のヌクレオチド残基２１７０－３９８７)を下記オリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅した：forwardプライマー(ヌクレオチド残基SEQ ID NO：１０の２１７０－２１９３)ＣＧＣｇｇｔａｃｃＧ　ＴＴＣＡＡＡＣＡＡＴ　ＡＧＡＴＡＡＴＧＣＴ　ＴＴＡ(SEQ ID NO：１５)、reverseプライマー(SEQ ID NO：１０のヌクレオチド残基３９８７－３９６８)ＡＡＣＣＣｃｔｇｃａ　ｇＴＴＡＣＡＧＴＧＧ　ＣＣＴＴＴＣＴＣＣＣ　Ｃ(SEQ ID NO：１３)、ただしforwardプライマー配列中のＫｐｎＩ制限酵素切断部位及びreverseプライマー配列中のＰｓｔＩ制限酵素切断部位は、下付(小)文字で表す。

【００８２】

５０ｋＨＣをエンコードするＤＮＡフラグメント(SEQ ID NO：１０；SEQ ID NO：１６のヌクレオチド残基２６８９－３９８７)を、下記オリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅した：forwardプライマー(SEQ ID NO：１０のヌクレオチド残基２６８９－２７１２)ＴＣＴＴｇｇａｔｃｃ　ＡＣＡＴＴＴＡＣＴＧ　ＡＡＴＡＴＡＴＴＡＡ　ＧＡＡＴ(SEQ ID NO：１７)、reverseプライマー(ヌクレオチド残基SEQ ID NO：１０の３９８７－３９６８)ＴＴＣＴｇａｇｃｔｃ　ＴＴＡＣＡＧＴＧＣＣ　ＴＴＴＣＴＣＣＣＣ(SEQ ID NO：１４)、ただしforwardプライマー配列中のＢａｍＨＩ制限酵素切断部位及びreverseプライマー配列中のＳａｃＩ制限酵素切断部位は、下付(小)文字で表す。

【００８３】

BoNT ＨＣの欠失誘導体をエンコードするＰＣＲ増幅したフラグメントをそれぞれの制限エンドヌクレアーゼで処理し、ＡＴＧコドン及び６×ｈｉｓ標識のフレーム中のプラスミドｐＱＥ－３０へクローン化した。その結果得られた3個のクローンを、ｐＱＥ－BoNT／ＡＨＣ８８、ｐＱＥ－BoNT／ＡＨＣ６６及びｐＱＥ－BoNT／ＡＨＣ５０で表し，それらは８８ｋＨＣ、６６ｋＨＣ及び５０ｋＨＣをそれぞれエンコードするBoNT AＨＣ遺伝子の欠失フラグメントを含有する。全てのクローン化及び発現はE. coli菌株BL21コドンplus(DE3)－RIL(Stratagene社製、LaJolla、CA、米国)内で行われた。全ての組み換え型クローンはＤＮＡシークエンシングで確認した。

【００８４】

ＧＦＰ－６６ｋＨＣ融合を発現するプラスミドの構築

緑色蛍光蛋白質(ＧＦＰ)の配列コードをＰＣＲにより産出した。２６キロドルトン(２６Ｋ)ＧＦＰ蛋白質をエンコードするＤＮＡフラグメントを、下記ヌクレオチド配列を有するプライマーを使用して増幅した：forwardプライマーＡＣＡＴｇｃａｔｇｃ　ＡＴＧＡＧＴＡＡＡＧ　ＧＡＧＡＡＧＡＡＣＴ　ＴＴＴＣＡ(SEQ ID NO：１８)、reverseプライ

マーＣＣｇｇｔａｃｃＣＣ ＡＧＧＣＣＣＡＴＴＴ ＧＴＡＧＡＧＣＴＣＡ ＴＣ(SEQ ID NO：１９)、ただしforwardプライマー配列中のＳｐｈＩ制限酵素切断部位及びreverseプライマー配列中のＫｐｎＩ制限酵素切断部位は、下付(小)文字で表す。ＧＦＰ遺伝子を含有する増幅したフラグメントはＳｐｈＩ及びＫｐｎＩと共に処理され、プラスミドｐＱＥ－６６ｋＨＣ中の、ＳｐｈＩ及びＫｐｎＩ制限酵素切断部位の間に挿入される。得られたプラスミドｐＱＥ－ＧＦＰ－６６ｋＨＣは、ＡＴＧコドン、６×ｈｉｓ標識及び６６ｋＨＣ遺伝子フレーム中にＧＦＰ遺伝子を含有する。

【００８５】

組み換え型蛋白質の発現及び精製

Lennoxブロス中３７℃で振とうして、６００ｎｍ(A_{600})での吸収値が０．６～０．８となるまでインキュベートを行った。イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド(ＩＰＴＧ)を１．０ミリモル濃度(最終濃度)となるよう添加し、インキュベートを更に５時間続けた。１リットルの誘発培養物からの細菌を４℃で遠心分離して回収し、５０ミリモル濃度リン酸ナトリウムの緩衝剤(ｐＨ．７．４)２０ｍｌ中で３００ミリモル濃度ＮａＣｌと再懸濁した。細胞懸濁液を、１分２回のパルスでそれぞれ７５％出力で、モデル160 sonic dismembrator(Fisher Scientific社製、Malvern、PA、米国)により音波粉砕により氷上に溶解した。溶解産物を２００００×ｇ、３０分４℃で遠心分離した。清澄化した浮遊物を２ｍｌの充填されたニトリル三酢酸樹脂と共に混合し、１時間４℃で回転装置上でインキュベートし、最終的に２５ｍｌカラム中へ注いだ。

【００８６】

カラムを３０倍体積の洗浄緩衝剤(５０ミリモル濃度リン酸ナトリウム(ｐＨ６．０)、３００ミリモル濃度ＮａＣｌ、２５ミリモル濃度イミダゾール)で洗浄した。結合された蛋白質は溶離緩衝剤(５０ミリモル濃度リン酸ナトリウム(ｐＨ４．５)、３００ミリモル濃度ＮａＣｌ)で溶離した。精製蛋白質をナトリウムドデシルサルフェート－ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)及びウェスタンブロット法により分析した。

【００８７】

BoNTのニッキング

ボツリヌス菌毒素は比較的不活性な単鎖分子として表される。完全に活性とするために、毒素は蛋白質分解プロセシング(ニッキング)」を受けてその二鎖形状を産出しなければならない。実験室的には、これは通常トリプシンにより達成される。

次に続く毒素のニッキング酵素からの分離を容易にするために、ＴＰＣＫ(Ｌ－１－トシルアミド－２－フェニルエチルクロロメチルケトン)を４％ビーズ化アガロースへ架橋(固定化)したトリプシン(固定化トリプシン；PIERCE社製、Rockford、IL、米国)処理したものを使用した。トリプシンスラリーを反応緩衝剤(１０ミリモル濃度リン酸ナトリウム緩衝剤、ｐＨ７．５)で３回洗浄した。毒素を酵素へ添加し、室温で(２３℃)１時間、毒素に対するトリプシン比１：１０でインキュベートした。インキュベート後、反応混合物を毎分１００００回転で５分間、Eppendorf 卓上型遠心分離機中で遠心分離した。「切れ目のある(nicked)」毒素を含有する浮遊物を収集し、－２０℃で貯蔵した。又、「切れ目のある」毒素は、０．２ミクロン遠心分離フィルター(Schleicher&Schuell Centrexミクロフィルターユニット)を通して、清浄無菌管へろ過して、ビーズ化トリプシンから分離しても良い。材料サンプルは電気泳動によりニッキングを確認するために試験した。

【００８８】

BoNTの還元

二鎖毒素は、ジスルフィド結合により結合されたＬＣ(酵素部分)及びＨＣ(結合及びトランスロケーション部分)から構成される。この結合はその酵素活性、神経伝達物質放出を引き起こす蛋白質の開裂、を発揮するために、(ジスルフィド結合が)還元(破壊)され軽鎖とされる必要がある。in vitro開裂試験を行うために、天然毒素は還元させなければならなかった。

ボツリヌス菌毒素は、生理学的ｐＨ(ｐＨ７．２～７．４)でのリン酸緩衝剤中又はリン酸緩衝食塩水(ＰＢＳ)中で、ジチオトレイトール(ＤＴＴ；クリランド試薬)でインキュベ

ートされ、還元された。通常使用されるＤＴＴの濃度は、試験に応じて５ミリモル濃度～２０ミリモル濃度である。ＤＴＴ及び毒素反応混合物を、室温で(２３℃)１時間インキュベートした。毒素還元は、非還元性ゲル上での電気泳動により確認した。

【００８９】

^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬(ＭＷ３８７．２)の精製BoNT及びそのフラグメントへの付着

ボルトンハンター試薬は、Perkin Elmer Life Sciences社(Boston、Massachusetts、米国)から市販されている。この分子へ、蛋白質(例えば、リシン残基)の第１級アミンと反応する、反応性サクシンイミジルエステル成分を供給した。毒素、ＨＣ又はそのフラグメントを(^{125}Ｉ)－ボルトンハンター試薬を本質的に製造者の指示に従い使用してヨウ素化した。得られる生成物の生物活性の損失を減少させるため、反応時間を少くした。蛋白質を標識化して、５００キュリー／ミリモル以下の平均特定活性とした。

【００９０】

ホウ酸塩緩衝剤(ｐＨ７．８；２００μｌ)中の精製蛋白質(３５０μｇ)を乾燥した、ヨウ素化したエステルへ添加し、１５分間氷上で反応させた。反応を１モル濃度グリシンの５０μｌホウ酸塩緩衝剤を１５分間添加して終了した。合計反応混合物(２５０μｌ)及び洗浄液(２５０μｌ)を、ろ過緩衝剤(１５０ミリモル濃度Na_2HPO_4、１５０ミリモル濃度ＮａＣｌ、０．１％(ｗ／ｖ)ゼラチン、ｐＨ７．４)で予備平衡にした商標「SEPHADEX」Ｇ－２５カラム上にかけた。標識化毒素がろ過緩衝剤で溶離し、０．５ｍｌフラクションを収集した。それぞれのフラクションの分取(５μｌ)を放射能分析した。空隙容量で溶離した標識化毒素ピークを貯留し、３℃で貯蔵した。貯留したフラクションの毒素濃度を、り１．６３$Å_{278}$／ｍｌ＝１ｍｇの関係式を使用して、２７８ｎｍの分光光度分析で決定した。このサンプルの部分を標識化毒素を定量化するためにガンマカウンターで測定した。サンプル濃度及び関連する数値を特定の活性を計算するために使用した。標識化毒素を３℃で貯蔵した。

【００９１】

商標「ALEXAFLUOR」５６８(ＭＷ７９２)の精製BoNTへの付着

商標「ALEXAFLUOR」５６８は、５７７ｎｍで吸収(励起)最大値、６０３ｎｍで発光最大値を有する染料分子である。この染料は、Molecular Probes社(Eugene、OR、米国)から市販されており、製造者の指示に従い使用した。この分子を、蛋白質(例えば、リシン残基)の第１級アミンと反応する反応性サクシンイミジルエステル成分へ供給した。精製BoNT Aの１．０ｍｇ／ｍｌＰＢＳ溶液０．５０ｍｌへ５０μｌの１．０モル濃度重炭酸ナトリウムを供給し、続いて混合物を染料へ添加した。反応を１時間室温で攪拌して連続した。ヒドロキシルアミン溶液(１７μｌ)を添加し、インキュベートを更に３０分間室温で続けてから反応を停止した。完全な反応体積を次にＰＢＳで平衡化してＰＢＳで溶離するゲルろ過カラムを通してろ過した。最初にカラムから溶離した染色帯(標識化毒素)を収集し、３℃で貯蔵した。標識化の量は、製造者の指示に従い、商標「ALEXAFLUOR」染料及び毒素の吸光度係数を使用して計算した。トランスサイトーシス実験で使用した毒素は３～７モル／モル毒素の染料で標識化した。

【００９２】

トランスサイトーシスアッセイ

単層の極性化した上皮細胞を、０．４μｍ孔径のポリカーボネート膜、商標「TRANSWELL」(Corning-Costar社製、Cambridge、Massachusetts、米国)多孔質ボトムインサート上に成長させた。商標「TRANSWELL」装置は、上皮細胞培養物の頂端面の又は基底面のいずれかの上に生成物を封じ込め可能である。上皮細胞層を通過する生成物のトランスサイトーシスのない場合、実質的には全ての生成物が装置により上皮の一方の側の上に保持される。従って、商標「TRANSWELL」装置は、生成物の上皮通過性トランスサイトーシスの評価に有用である。

【００９３】

それぞれの商標「TRANSWELL」インサート中の細胞増殖面積は、１ｃｍ^{2}と同じ大きさで

ある。細胞接種の前に、インサート膜は、ラット尾タイプＩコラーゲン１０μｇ／ｃｍ^{2}で被覆した。コラーゲン貯蔵液(６．７ｍｇ／ｍｌ)を無菌１％(ｖ／ｖ)酢酸で調製し、３℃で貯蔵した。このコラーゲン貯蔵液を、必要に応じて氷冷６０％(ｖ／ｖ)エタノールで希釈し、１０μｇの希釈コラーゲンを含有する得られた溶液の１５０μｌを、それぞれのウェルへ添加した。

【００９４】

コラーゲン溶液を室温で一晩(約１８時間)乾燥した。乾燥後、ウェルをＵＶ光下で１時間殺菌し、細胞インキュベート媒体で予備インキュベート(３０分間インキュベート)した。予備インキュベート媒体を、細胞及び新鮮な媒体の添加の直前に除去した。細胞を融合的密度で商標「TRANSWELL」装置中に接種した。添加した媒体の体積は、上部室(ウェル)へ０．５ｍｌ、底部(下部)室(ウェル)へ１．０ｍｌであった。インキュベート媒体は２日毎に交換した。１２ウェルプレート中の培養物は、使用前に最小１０日間分化された。細胞単層の完全性及び接着結合の形成を、インサート中の培養液のメニスカス(曲面表面)が、底部ウェルに比較してやや高く維持されることことを監視して観察した。接着結合の形成は、上部ウェルから底部室への(^{3}Ｈ)－イヌリン拡散速度のアッセイ又は単層を通過する経上皮抵抗の測定により実験室的に確認した。

【００９５】

トランスサイトーシスを、通常上部室(ウェル；細胞の頂端面)中の媒体を対象とする(^{125}Ｉ)－標識化蛋白質を種々の濃度で含有する、適切な体積の媒体で置換することによりアッセイした、放射性標識化蛋白質の輸送を、通常底部室(ウェル；細胞の基底面)である反対側のウェルの全内容物をサンプリングして検知した。サンプルとした媒体の分取(０．５ｍｌ)を商標「SEPHADEX」Ｇ－２５カラムを通してろ過し、０．５ｍｌフラクションを採取した。フラクション中の放射性量をガンマカウンターを使用して決定した。トランスサイトーシスされた蛋白質の量をノーマライズし、インキュベートした細胞表面のフェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}として表した。１条件当り少なくとも２回実験値を測定し、実験は通常少なくとも３回行なった。

【００９６】

有毒性試験(In vitro有毒性試験)

発現した蛋白質の有毒性を、マウス横隔膜神経片側横隔膜調製物上でバイオアッセイした。組織を切除し、９５％O_2、５％CO_2で通気した生理学的緩衝剤中で懸濁し、３５℃で維持した。生理学的溶液は下記組成物であった：１３７ミリモル濃度ＮａＣｌ；５ミリモル濃度ＫＣｌ；１．８ミリモル濃度$CaCl_2$；１．０ミリモル濃度$MgSO_4$；２４ミリモル濃度$NaHCO_3$；１．０ミリモル濃度NaH_2PO_4；１１ミリモル濃度Ｄ－グルコース；及び０．０１％(ｗ／ｖ)ゼラチン。横隔膜神経を連続的に刺激し(１．０Hertz；０．１～０．３ミリ秒持続)、筋肉痙攣を記録した。毒素誘発された麻痺の測定結果は、神経性刺激への筋肉痙攣応答の５０％減少であった。

【００９７】

(In vivo有毒性試験)

発現した蛋白質の有毒性を、蛋白質を実験マウスへ投与して試験した。ヒスチジン親和性樹脂又はGST親和性樹脂からの溶離により精製蛋白質を、１ｍｇ／ｍｌのウシ血清アルブミン(ＢＳＡ)を含むＰＢＳで希釈し、マウスへ腹膜内(ｉ．ｐ．)注射した。組み換え型蛋白質を、濃度１～１００μｇ／動物(平均重量約２５グラム)で、ＰＢＳ－ＢＳＡ１００μｌ分取物へ投与した。時間の長さを変化させて監視して、動物への非特定の有毒性を検知した。

【００９８】

胃又は腸への毒素又はフラグメントの外科的投与

スイス・ウェブスターマウス(メス、それぞれ２５グラム)を、Ace Animals社(Boyertown、PA、米国)から購入し、食物及び水を無制限に与えた。

手術前プロトコルでは、手術前に動物を１８時間固定したが、水は自由に与えた。又、手術前操作では、腹部を剃毛し、ゲンタマイシンサルフェート(６ｍｇ／ｋｇ体重(Fujusa

waUSA社製、Deerfield、IL、米国)の予防用の皮下投与量を投薬した。手術当日に、動物を獣医学手術室へ移し、次に続く全てのステップは、無菌外科環境内で行った。

【００９９】

動物をイソフルラン(商標「ISO-THESIA」、Abbott Laboratories North社製、シカゴ、IL、米国)及び酸素の投与で麻酔し、同一の吸入麻酔を手術中行った。開腹手術(マウスのサイズに応じて約１．５～２．５ｃｍ)を行い、胃又は胃の直近の小腸のいずれかを部分的に外側にとり出した。プロトコルで必要な場合、商標「３－０PROLENE」(ポリプロピレン縫合材料、Ethicon社製、Somerville、NJ、米国)を使用して、結紮を幽門括約筋の真上(胃の近位)に設けた。この結紮が胃液の腸への流れ(又は腸内内容物の胃への逆流)を阻止するのに充分であるが、包まれた組織への物理的損傷が生じないように注意した。神経毒を、０．５インチ、２７ゲージ針を備えた１ｍｌツベリクリンシリンジを通して投与した。注入体積は、投与部位(胃又は腸)に関係なく動物当たり１００μｌ定量にした。全ての注入で、ビヒクルは１ｍｇ／ｍｌＢＳＡを有する無菌ダルベッコＰＢＳ(ｐＨ７．４)から構成された。神経毒を、より大きい曲率を有する胃壁を通して、胃大網脈管を避けるよう注意しながら注入して胃の内腔へ投与した。神経毒を、体節に平行で常に胃から離れた方向にした針を斜めに挿入して小腸の内腔へ投与した。注入時間を記録した。

【０１００】

神経毒の投与後、器官を丁寧に原位置に戻し、腹部筋肉の切開部を３－０商標「PROLENE」を使用して縫合した。動物へ塩酸ブプレノルフィン(２ｍｇ／ｋｇ体重、皮下注射可能；商標「BUPRENEX」、Reckitt&Colman Pharmaceuticals社製、Richmond、VA、米国)の鎮痛剤注射及びゲンタマイシンの別投薬をした後、皮膚を数個の小型創傷クリップを使用して閉鎖した。

外科操作は１動物当り約１５分間続き、麻酔薬の懸濁液は１０～１５分間内の完全回復を示した。次に動物を実験室に移し、それらをアッセイ終点まで監視した。死亡時間を記録し、注入時間から死亡時間までの合計所用時間(分)を計算した。

【０１０１】

免疫方法

結合保持能力並びに消化管及び気道上皮細胞の通過保持能力を示す毒素変種の、下記経口及び／又は鼻内投与で免疫性を発現するそれらの能力を試験した。更に評価されるためには、経口又は吸入可能なワクチンは、１０００MLD_{50}以上の親毒素に対する免疫防御を引き起こす必要がある。特定の病原体フリーのスイス・ウェブスターマウス(メス)をこの実施に使用した。

皮下(ｓ．ｃ．)免疫用に、動物へ０．１ｍｌのＰＢＳ中の１～２０μｇ蛋白質を投与した。４回投薬を１４日間隔で与えた。第２回、第３回及び第４回の免疫後、マウスを７日間飼育し、毒素変種への免疫反応性用免疫ブロット法により分析した。マウスに腹膜内(ｉ．ｐ．)経路を経由して$1\times10^{3}MLD_{50}$以上の親毒素の負荷をかけた。注入前に、毒素を１％(ｗ／ｖ)ゼラチン含有ＰＢＳで希釈した。マウスに１４日間負荷をかけ、次にそれらに最終ワクチン接種した。又、未処理のマウスをコントロールとして使用した。

【０１０２】

鼻内免疫用に、マウスに２０μｌのＰＢＳ中に懸濁した１～２０μｇの蛋白質を投与した。マウスをイソフルラン(商標「ISO-THESIA」、Abbott Laboratories North社製、シカゴ、IL、米国)で軽く麻酔した。蛋白質を外鼻孔へ１０～２０μｌの懸濁液の単回投与で投与した。動物の頭部は後部咽頭中へのドレナージを最小化するために垂直位置で保持した。５回投薬を７日間隔で投与した。第３回、第４回及び第５回の免疫後、マウスを７日間飼育し、試験体を、毒素変種への免疫反応性用免疫ブロット法で分析した。マウスにｉ．ｐ．経路を経由して$1\times10^{3}MLD_{50}$以上の親毒素の負荷１０日をかけ、次にそれらに最終ワクチン接種した。

【０１０３】

経口免疫を１００μｌのＰＢＳ中に懸濁した１～２０μｇの蛋白質を接種して行った。マウスをイソフルラン(商標「ISO-THESIA」、Abbott Laboratories North社製、シカゴ、

IL、米国)で軽く麻酔し、蛋白質を(栄養)補給管を経由して単回投与で投与した。５回投薬を７日間隔で投与した。第３回、第４回及び第５回の免疫後、マウスを７日間飼育し、試験体を、毒素変種への免疫反応性用免疫ブロット法で分析した。マウスにｉ．ｐ．経路を経由して1×10^{3}ＭＬＤ$_{50}$以上の親毒素の負荷１０日をかけ、次にそれらに最終ワクチン接種をした。

【０１０４】

経口免疫

スイス・ウェブスターマウス(メス、それぞれ２０－２５グラム)を、Ace Animals社(Boyertown、PA、米国)から購入し、食物及び水を無制限に与えた。マウスを経口で(ｐ．ｏ．)免疫化した。ｐ．ｏ．投与用に、それぞれの動物へ、０．２ｍｌ溶離緩衝剤中に懸濁した４μｇの蛋白質を胃内栄養(補給)針を経由して投与した。マウスを０日に免疫化し、ブースター(追加抗原)を１４、２８、及び４２日に与えた。同一に免疫化したマウスからの血清サンプルを、２１、３５、及び４９日に採取して貯留した．血清採取用に、イソフルラン麻酔下のマウスの眼窩後部叢(retro-orbital plexus)からキャピラリー管により血液を抜き取った。

【０１０５】

免疫化した又はコントロールマウスからの血清を、免疫ブロット分析を使用して抗体のアッセイをした。組み換え型抗原(ホロトキシン又はフラグメント；０．１μｇ／ｌａｎｅ)をSDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース膜へ移した。膜をトリス－緩衝食塩水(ＴＢＳ)中の５％(ｗ／ｖ)粉状無脂肪乳でブロックし、帯状に切断し、種々の血清サンプルを使用して免疫反応性蛋白質の検出を行った。

一次インキュベートを一晩(１８時間)室温で１：１０００希釈血清で行った。次にホースラディッシュペルオキシダーゼ－標識化抗マウスＩｇＧを、１：１００００希釈で１時間室温で使用した。充分な洗浄後、膜を強化型化学発光試薬(商標「ＥＣＬ」、Amersham Biosciences社製、Piscataway、NJ、米国)を使用して処理した。

【０１０６】

酵素結合した免疫吸着剤アッセイ(ELISA)

ELISAを、微小な変更を行った以外はSiegelの記載した方法で行った。高度に精製(＞９５％)BoNT Aを、リン酸緩衝食塩水(ｐＨ７．４)濃度５μｇ／ｍｌとなるように希釈し、次にミクロタイタープレート(１００μｌ／ウェル)へ添加し、４℃で一晩密封容器中でインキュベートした。

１％ＢＳＡの０．１％(ｖ／ｖ)商標「TWEEN」２０を有するＴＢＳ溶液を、不特定の結合をブロックするために使用した。血清サンプルを最初に１：３０に希釈し、続いて４倍希釈して合計７個の希釈液(１：３０～１：１２２、８８０)とした。希釈血清を毒素被覆したウェル正副２個へ添加した(１００μｌ／ウェル)。第２の抗体は１：１０００に希釈したアルカリホスファターゼ－結合ヤギ抗ヒト又は抗マウスＩｇＡ又はＩｇＧであった。第１及び第２抗体を６０分間３７℃でインキュベートした。ｐ－ニトロフェニルリン酸(１００μｌ／ウェル)を基質として添加した。プレートを室温で３０分間インキュベートし、吸収を４０５ｎｍでミクロプレートリーダーで測定した。上記より、ELISAタイターを、吸収０．２(吸収ユニット)を与える最も高い血清希釈の逆数として定義した。

【０１０７】

鼻内投与後のマウス血漿中の組み換え型BoNTフラグメントの検出用ELISAの獲得

ミクロタイタープレートを、１：１０００希釈したウサギ抗ボツリヌス菌トキソイドＡを含有する被膜緩衝剤(０．１モル濃度Na_2CO_3、ｐＨ９．６)溶液で、１００μｌ／ウェルで、一晩４℃で被覆した。次に吸着残存部位を、洗浄緩衝剤(２０ミリモル濃度ＴＢＳ、０．１％(ｖ／ｖ)商標「TWEEN」２０、ｐＨ７．６)中の１％(ｗ／ｖ)ＢＳＡを添加して１時間３７℃でブロックした。次にプレートを洗浄緩衝剤で４回洗浄した。適切な体積のアッセイ緩衝剤(２０ミリモル濃度ＴＢＳ、ｐＨ７．６)又は適切なマウス血清で抗原を希釈して標準カーブを作成した。標準及び血清のサンプル(１００μｌ／ウェル)を、１時間３７℃でインキュベートし、プレートを上記の様に洗浄した。１：５００希釈したマウ

ス抗BoNT AHCを添加し、１時間３７℃でインキュベートした。プレートを緩衝剤で３回洗浄し、洗浄緩衝剤で希釈(１：５０００)したアルカリホスファターゼ－標識化ヤギ抗マウスＩｇＧ結合体１００μｌを添加し、１時間３７℃でインキュベートした。プレートを洗浄後、１００μｌの基質(ｐ－ニトロフェニルリン酸)のグリシン緩衝剤、ｐＨ１０．４(０．１モル濃度グリシン、１ミリモル濃度$MgCl_2$、及び１ミリモル濃度$ZnCl_2$)溶液をそれぞれのウェルへ添加した。室温で３０分間インキュベート後、反応を停止し、４０５ｎｍの吸収を測定した。

【０１０８】

実施例で使用した細胞タイプは、T-84ヒト消化管上皮細胞(T-84及びCaco－２細胞)、ヒト肺上皮細胞(Calu－３)、及びMadin-Darbyイヌ腎臓上皮細胞(MDCK細胞)である。これらタイプの細胞は、例えばAmerican Tissue CultureCollection(ATCC)社(Manassas、VA、米国)から市販されている。又、ラット上皮肺胞(alveolar)細胞の第１培養物も使用した。

【０１０９】

実施例１(T-84細胞の頂端面から細胞の基底面へのBoNT Aのトランスサイトーシスのウェスタンブロット法による検知)

この試験は、天然BoNT A及びヒト消化管上皮細胞(T-84細胞)を使用して行った。トランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してT-84細胞培養物を分析した。アッセイを、１×１０^{-8}モル濃度の天然、精製BoNT Aを装置の上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の、装置の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスされた分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法により確認した。

ウェスタンブロットは、トランスサイトーシス前のコントロール(BoNT A)及びT-84細胞を通してトランスサイトーシスされた(即ち、底部室から集めた)BoNT Aは、ほとんど同一のサイズを有することを示した。従って、BoNT Aが効率良くT-84細胞を通過するだけではなく、分子の分子量も変化せず、トランスサイトーシスが行われる機構はBoNTの変性を生じないことを示した。

【０１１０】

実施例２(MDCK細胞中の頂端面から基底面へトランスサイトーシスしたBoNT Aのウェスタンブロット)

この試験は、BoNT A及びMadin-Darbyイヌ腎臓細胞(MDCK細胞)を使用して行った。トランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMDCK細胞培養物を分析した。アッセイを、１×１０^{-8}モル濃度の天然、精製BoNT Aを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスされた分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法により確認した。

ウェスタンブロットは、天然BoNT AはMDCK細胞により、弱く結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出されたことを示した。結論は、BoNT Aは、細胞の基底面から採取した媒体中には検知されず、BoNT Aは効率良くMDCK細胞を通過しないことを示した。

【０１１１】

実施例３(T-84細胞中の頂端面から基底面へのBoNT Aのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合したBoNT Aのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してヒト消化管上皮細胞(T-84)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０^{-8}モル濃度(^{125}Ｉ)－BoNT Aを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数

を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化BoNT Aの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、^{125}Ｉｔへ結合したBoNT Aは細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを示した。それは、トランスサイトーシス率１１．２９±０．３０フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}で効率良くT-84細胞を通過した。

実験結果から３つの主要な結論が得られた。第１に、精製ボツリヌス菌神経毒は、分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により、結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、^{125}Ｉの結合によるリシン残基の改質は、これら性質を示すホロトキシンの能力を変化させない。第３に、BoNT Aはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。

【０１１２】

実施例４(T-84細胞中の基底面から頂端面へのBoNT Aのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合したBoNT Aのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してT-84細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－BoNT Aを底部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に上部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化BoNT Aの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、^{125}Ｉへ結合したBoNT Aが細胞の基底面から頂端面へ輸送されたことを示した。それは効率良くT-84細胞を通過し、トランスサイトーシス率は８．９８±０．２０フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}と定量された。

【０１１３】

実験結果から３つの主要な結論が得られた。第１に、精製ボツリヌス菌神経毒は、分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により、結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。このプロセスは、基底面から頂端面への方向では反対の方向よりも幾分効率が良くない。第２に、リシン残基の修飾はこれら性質を示すホロトキシンの能力を変えない。第３に、BoNT Aはヒト消化管上皮細胞の基底面から頂端面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。

【０１１４】

実施例５(Caco－２細胞中の頂端面から基底面へのBoNT Aのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合したBoNT Aのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してCaco－２細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－BoNT Aを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量を標識化毒素の特定の活性に基づいて計算した。

【０１１５】

結果は、精製神経毒は細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを示した。BoNT Aは効率良くCaco－２細胞を通過した。トランスサイトーシス率は８．４２±０．４９フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}と定量された。

実験結果から４つの主要な結論が得られた。第１に、精製ボツリヌス菌神経毒は、分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により、結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、リシン残基の修飾はこれらの性質を示すホロトキシンの能力を変えない。第３に、BoNT Aはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。第４に、ＨＣはヒト消化管上皮細胞通過時に１を超える分子(ＬＣ及びボルトンハンター試薬)を輸送可能である。

【０１１６】

実施例６(MDCK細胞中の頂端面から基底面へのBoNT Aのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合したBoNT Aのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞培養物を分析した。アッセ

イを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－BoNT Aを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化BoNT Aの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、BoNT Aは細胞の頂端面から基底面へあまり輸送されなかったことを示した。精製神経毒は効率良くMDCK細胞を通過しなかったことが、トランスサイトーシス率の０．０５±０．０１フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}で示された。

BoNT Aは、極性化したMDCK細胞による、結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出は不充分になされた。

【０１１７】

実施例７(T-84細胞中の頂端面から基底面への切れ目のないボツリヌス菌神経毒セロタイプＢのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合した切れ目のないボツリヌス菌神経毒のトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してT-84細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－ｕBoNT Bを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化ｕBoNTの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、ｕBoNTは細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを示した。それは９．０１±０．４４フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}の割合で効率良くT-84細胞を通過した。

【０１１８】

実験結果から４つの主要な結論が得られた。第１に、精製、切れ目のないボツリヌス菌神経毒、セロタイプＢは、分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により、結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、リシン残基の修飾は、これら性質を示すｕBoNTの能力を変化させない。第３に、ｕBoNTはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。第４に、ｕBoNTのＨＣはヒト消化管上皮細胞通過時に１を超える分子(ＬＣ部分及びボルトンハンター試薬)を輸送可能である。

【０１１９】

実施例８(MDCK細胞中の頂端面から基底面への切れ目のないボツリヌス菌神経毒セロタイプＢのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合した切れ目のないボツリヌス菌神経毒のトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞培養物を分析した。アッセイはｌｘ１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－ボツリヌス菌毒素タイプＢを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量を標識化毒素の特定の活性に基づいて計算した。

結果は、ｕBoNT Bは細胞の頂端面から基底面へあまり輸送されなかったことを示した。それは効率良くMDCK細胞(０．０５±０．００フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2})を通過しなかった。ｕBoNTセロタイプＢは、極性化したMDCK細胞による、結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出は不充分になされた。

【０１２０】

実施例９(T-84細胞中の基底面から頂端面への切れ目のないボツリヌス菌神経毒セロタイプＢのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合した切れ目のないボツリヌス菌神経毒のトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してT-84細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－ｕBoNT Bを底部室へ添加して開始した。続いて培

養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に上部(頂端面)室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化ｕBoNTの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、ｕBoNTは細胞の基底面から頂端面への側面へ輸送されたことを示した。ｕBoNTは４．４８±０．００フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}の割合で、効率良くT-84細胞を通過した。

【０１２１】

上記よりいくつかの結論が得られた。第１に、ｕBoNTは分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、リシン残基の修飾は、これら性質を示すｕBoNTの能力を変化させない。第３に、ｕBoNTは、ヒト消化管上皮細胞の基底面から頂端面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。第４に、ｕBoNTのＨＣはヒト消化管上皮細胞通過時に１を超える分子(ＬＣ及びボルトンハンター試薬)を輸送可能である。

【０１２２】

実施例１０(MDCK細胞中の切れ目のないボツリヌス菌神経毒セロタイプＢの基底面から頂端面へのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合した切れ目のないボツリヌス菌神経毒のトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－ｕBoNTを底部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、上部(頂端面)室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化ｕBoNTの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、精製ｕBoNTは細胞の基底面から頂端面へあまり輸送されなかったことを示した。精製ｕBoNTは効率良くMDCK細胞(０．０５±０．００フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2})を通過しなかった。

精製ｕBoNT Bは、極性化したMDCK細胞による、結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出は不充分になされた。

【０１２３】

実施例１１(T-84細胞中の頂端面から基底面への切れ目のあるボツリヌス菌神経毒セロタイプＢのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合した切れ目のあるBoNT Bのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してT-84細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－ｎBoNT Bを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化ｎBoNT Bの特定の活性を基礎にして計算した。

【０１２４】

結果は、切れ目のある精製神経毒は細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを示した。精製神経毒は、６．５７±０．０７フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}の割合で効率良くT-84細胞を通過した。

上記よりいくつかの結論が得られた。第１に、分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により、精製ｎBoNT Bは、結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、リシン残基の修飾はこれら性質を示すホロトキシンの能力を変えない。第３に、ｎBoNT Bはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。第４に、ｎBoNT BのＨＣはヒト消化管上皮細胞通過時に１を超える分子(ＬＣ及びボルトンハンター試薬)を輸送可能である。

【０１２５】

実施例１２(MDCK細胞中の頂端面から基底面への切れ目のあるボツリヌス菌神経毒セロタイプＢのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合したｎBoNT Bのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－ｎBoNT Bを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化ｎBoNTの特定の活性を基礎にして計算した。

【０１２６】

結果は、精製ｎBoNTは細胞の頂端面から基底面へあまり輸送されなかったことを示した。精製ｎBoNTは効率良くMDCK細胞(０．０５±０．００フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2})を通過しなかった。

精製ｎBoNT Bは、極性化したMDCK細胞による、結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出は不充分になされた。

【０１２７】

実施例１３(T-84細胞中の基底面から頂端面への切れ目のあるボツリヌス菌神経毒セロタイプＢのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合したｎBoNT Bのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してヒト消化管上皮(T-84)細胞培養物を分析した。アッセイは１ｘ１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－ｎBoNT Bを底部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に上部(頂端面)室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化ｎBoNT Bの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、ｎBoNTは細胞の基底面から頂端面への側面へ輸送されたことを示した。精製ｎBoNTは、５．５４±０．００フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}の割合で効率良くT-84細胞を通過した。

【０１２８】

上記よりいくつかの結論が得られた。第１に、精製ｎBoNT Bは、分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、リシン残基の修飾は、これら性質を示すｎBoNT Bの能力を変化させない。第３に、ｎBoNT Bはヒト消化管上皮細胞の基底面から頂端面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。第４に、ｎBoNT BのＨＣはヒト消化管上皮細胞通過時に１を超える分子(ＬＣ及びボルトンハンター試薬)を輸送可能である。

【０１２９】

実施例１４(MDCK細胞中の基底面から頂端面への切れ目のあるボツリヌス菌神経毒セロタイプＢのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合したｎBoNT Bのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－BoNT Bを底部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、上部(頂端面)室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化ｎBoNTの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、精製ｎBoNT Bは細胞の基底面から頂端面へあまり輸送されなかったことを示した。精製ｎBoNT Bは効率良くMDCK細胞(０．０５±０．００フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2})を通過しなかった。精製ｎBoNT Bは、極性化したMDCK上皮細胞による、結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出は不充分になされた。

【０１３０】

実施例１５(T-84細胞中の頂端面から基底面へトランスサイトーシスしたＨＣのウェスタンブロット)

ＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してヒト消化管上皮(T-84)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度ＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスした分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法により確認した。

【０１３１】

結果は、ＨＣは細胞の頂端面から基底面へ輸送したことを確認した。ＨＣが効率良くT-84細胞を通過しただけでなく、分子の分子量は変化しなかった。

実験結果から２つの主要な結論が得られた。第１に、ボツリヌス菌神経毒のＨＣは分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、トランスサイトーシス後、基底面上へ放出される天然ＨＣの分子サイズは変化していなかった。そのことからトランスサイトーシスのプロセスはＨＣの物理的構造を変えないという結論が導かれる。

【０１３２】

実施例１６(MDCK細胞中の頂端面から基底面へトランスサイトーシスしたＨＣのウェスタンブロット)

ＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度ＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部(基底面)室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスした分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法により確認した。

結果は、ＨＣは細胞の基底面から採取した媒体中には検知されなかったことを示した。従って、ＨＣは効率良くMDCK細胞を通過しなかった。ボツリヌス菌神経毒のＨＣは、極性化したMDCK細胞による、結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出は不充分になされた。

【０１３３】

実施例１７(T-84細胞中の頂端面から基底面へのＨＣのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合したＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してヒト消化管上皮(T-84)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)ＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化ＨＣの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、ＨＣは細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを示した。ＨＣが効率良くT-84細胞を通過しただけでなく、得られたトランスサイトーシス率(７．１０±０．００フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2})は精製BoNT Aのトランスサイトーシス率(１１．３４フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2})に匹敵した。

３つの主要な結論が得られた。第１に、ＨＣ、セロタイプＡは、分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により、結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、リシン残基の修飾は、これら性質を示すＨＣの能力を変化させない。第３に、ＨＣはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。

【０１３４】

実施例１８(MDCK細胞中の頂端面から基底面へのBoNT AＨＣのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合したＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－ＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化ＨＣの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、ＨＣは細胞の頂端面から基底面へあまり輸送されなかったことを示した。ＨＣは効率良くMDCK細胞を通過しなかったことが、トランスサイトーシス率の０．０６±０．００フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}で示された。ＨＣ、セロタイプＡは、極性化した腎臓上皮細胞による、結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出は不充分になされた。

【０１３５】

実施例１９(T-84細胞中の頂端面から基底面へトランスサイトーシスした６６ｋＨＣのウェスタンブロット)

６６ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してヒト消化管上皮(T-84)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度６６ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスされた分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法により確認した。

【０１３６】

結果は、６６ｋＨＣは細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを確認した。６６ｋＨＣが効率良くT-84細胞を通過したばかりでなく、分子の分子量は変化しなかった。

これら結果から３つの主要な結論が下記の通り得られた。第１に、６６ｋＨＣは分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により、結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、トランスサイトーシス後、基底面に放出された６６ｋＨＣの分子サイズは、変化していなかった。第３に、６６ｋＨＣはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ６×－ヒスチジン標識を輸送可能である。

【０１３７】

実施例２０(MDCK細胞中の頂端面から基底面へトランスサイトーシスした６６ｋＨＣのウェスタンブロット)

６６ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度６６ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスされた分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法により確認した。

結果は、６６ｋＨＣは細胞の基底面から採取した媒体中には検知されなかったことを示した。従って、６６ｋＨＣは効率良くMDCK細胞を通過しなかった。６６ｋＨＣは、極性化したMDCK細胞による、結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出は不充分になされた。

【０１３８】

実施例２１(T-84細胞中の頂端面から基底面へトランスサイトーシスした５０ｋＨＣのウェスタンブロット)

５０ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してヒト消化管上皮(T-84)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度５０ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でイ

ンキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスされた分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法により確認した。

結果は、５０ｋＨＣフラグメントは細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを確認した。５０ｋＨＣは効率良くT-84細胞を通過するだけではなく、分子の分子量は変化しなかった。

【０１３９】

実験結果から３つの主要な結論が得られた。第１に、５０ｋＨＣは、分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、トランスサイトーシス後、基底面に放出された５０ｋＨＣフラグメントの分子サイズは変化していなかった。第３に、５０ｋＨＣフラグメントはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ６×－ヒスチジン標識を輸送可能である。

【０１４０】

実施例２２(MDCK細胞中の頂端面から基底面へトランスサイトーシスした５０ｋＨＣのウェスタンブロット)

５０ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度５０ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスされた分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法により確認した。

結果は、５０ｋＨＣは細胞の基底面から採取した媒体中には検知されなかったことを示した。従って、５０ｋＨＣは効率良くMDCK細胞を通過しなかった。従って、５０ｋボツリヌス菌神経毒のＨＣは、極性化したMDCK細胞による、結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出は不充分になされた。

【０１４１】

実施例２３(T-84細胞中の頂端面から基底面への５０ｋＨＣのトランスサイトーシス)

リシン残基で^{125}Ｉへ結合した５０ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してヒト消化管上皮(T-84)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－５０ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化５０ｋＨＣの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、５０ｋＨＣは細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを示した。５０ｋＨＣは効率良くT-84細胞を通過するだけではなく、トランスサイトーシス率(１３．９７±０．００フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2})は精製BoNT Aのトランスサイトーシス率(１１．３４フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2})に匹敵した。

【０１４２】

実験結果から５つの主要な結論が得られた。第１に、ボツリヌス菌神経毒の５０ｋＨＣフラグメントは、分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、リシン残基の修飾は、これら性質を示す５０ｋＨＣフラグメントの能力を変化させない。第３に、５０ｋＨＣはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。第４に、５０ｋＨＣフラグメントはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ６×－ヒスチジン標識を輸送可能である。第５に、５０ｋＨＣフラグメントはヒト消化管上皮細胞通過時に１を超える分子(ポリヒスチジン標識及びボルトンハンター試薬)を輸送可能である。

【０１４３】

実施例２４(MDCK細胞中の頂端面から基底面への５０ｋＨＣのトランスサイトーシス)
リシン残基で^{125}Ｉへ結合した５０ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－５０ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化５０ｋＨＣの特定の活性を基礎にして計算した。
結果は、５０ｋＨＣは細胞の頂端面から基底面へあまり輸送されなかったことを示した。５０ｋＨＣが効率良くMDCK細胞を通過しなかったことが、トランスサイトーシス率の０．０６±０．００フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}で示された。従って、ボツリヌス菌神経毒の５０ｋＨＣフラグメントは、極性化したMDCK上皮細胞による、結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出は不充分になされた。

【０１４４】

実施例２５(T-84細胞中の頂端面から基底面への商標「ALEXAFLUOR」－５６８BoNT Aのトランスサイトーシス)
リシン残基で^{125}Ｉへ結合した商標「ALEXAFLUOR」５６８BoNT Aのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してヒト消化管上皮(T-84)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度商標「ALEXAFLUOR」５６８－BoNT Aを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に底部室の内容物を集め、蛍光分光法で分析した。関連するトランスサイトーシスの量は商標「ALEXAFLUOR」５６８BoNT A結合体の発光ピークに基づいて示した。
結果は、精製BoNT Aは小分子を細胞の頂端面から基底面輸送したことを示した。精製BoNT Aは効率良くT-84細胞を通過し、小分子が共輸送された。

【０１４５】

実験結果から３つの主要な結論が得られた。第１に、精製BoNT Aは分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、リシン残基の修飾はこれら性質を示すホロトキシンの能力を変えない。第３に、BoNT Aはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ商標「ALEXAFLUOR」５６８を輸送可能である。

【０１４６】

実施例２６(MDCK細胞中の頂端面から基底面への商標「ALEXAFLUOR」５６８BoNT Aのトランスサイトーシス)
リシン残基で^{125}Ｉへ結合した商標「ALEXAFLUOR」５６８BoNT Aのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度商標「ALEXAFLUOR」５６８－BoNT Aを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に底部室の内容物を集め、蛍光分光法で分析した。関連するトランスサイトーシスの量は商標「ALEXAFLUOR」５６８－標識化BoNT A結合体の発光ピークに基づいて示した。
結果は、精製BoNT Aは細胞の頂端面から基底面へ効率良く小分子を輸送しなかったことを示した。精製BoNT Aは効率良くMDCK細胞培養物中の小分子を共輸送しなかった。精製BoNT Aは、分化し、極性化したイヌ腎臓上皮細胞による、結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出は不充分になされたため、これら細胞を通して小分子を輸送できなかった。

【０１４７】

実施例２７(T-84細胞中の頂端面から基底面へのビオチン－５０ｋＨＣのトランスサイトーシス)
ビオチン－５０ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してヒト消化管上皮(T-84)細胞培養物を分析した。アッセイを

１×１０$^{-7}$モル濃度ビオチン－５０ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスされた分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法及びコピーしたブロットをアビジン－ＨＲＰでプローブすることにより確認した。

結果は、ビオチン－５０ｋＨＣは細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを確認した。ビオチン－５０ｋＨＣは効率良くT-84細胞を通過するだけではなく、分子の分子量及び受容体結合性は変化しなかった。

【０１４８】

６つの結論が得られた。第１に、ビオチン－５０ｋＨＣは分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、ビオチン添加によるフラグメントの改質は、これら性質を示す５０ｋＨＣフラグメントの能力を変化させない。第３に、５０ｋＨＣフラグメントはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へビオチンを輸送可能である。第４に、輸送されたビオチン分子は、そのリガンド結合性及びアビジンとの関連性を保持する。第５に、５０ｋＨＣフラグメントはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ６×－ヒスチジン標識を輸送可能である。第６に、５０ｋＨＣフラグメントはヒト消化管上皮細胞通過時に１を超える分子(ポリヒスチジン標識及びビオチン)を輸送可能である。

【０１４９】

実施例２８(MDCK細胞中の頂端面から基底面へのビオチン－５０ｋＨＣのトランスサイトーシス)

ビオチン－５０ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-7}$モル濃度ビオチン－５０ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスされた分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法及びコピーしたブロットをアビジン－ＨＲＰでプローブすることにより確認した。

結果は、ビオチン－５０ｋＨＣは細胞の頂端面から基底面へ効率良く輸送されなかったことを確認した。精製５０ｋＨＣはMDCK培養物中の２４４ドルトン－ビオチン分子を効率良く共輸送しなかった。

実験結果から２つの主要な結論が得られた。第１に、ビオチン－５０ｋＨＣは、分化し、極性化したイヌ腎臓上皮細胞により結合されず、内在化せず、トランスサイトーシスせず、放出されなかった。第２に、５０ｋＨＣはイヌ腎臓上皮細胞のの頂端面から基底面へビオチンを輸送しなかった。

【０１５０】

実施例２９(T-84細胞中の頂端面から基底面への緑色蛍光蛋白質６６ｋＨＣのトランスサイトーシス)

緑色蛍光蛋白質６６ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してヒト消化管上皮(T-84)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度ＧＦＰ－６６ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、底部室の内容物を集め、蛍光分光法で分析した。関連するトランスサイトーシスの量はＧＦＰ－６６ｋＨＣ結合体の発光ピークを基礎に示した。

結果は、６６ｋＨＣは細胞の頂端面から基底面へ緑色蛍光蛋白質６６ｋＨＣを輸送したことを示した。精製フラグメントは効率良くT-84細胞を通過し、緑色蛍光蛋白質６６ｋＨＣが共輸送された。

【０１５１】

４(６？)つの結論が得られた。第１に、６６ｋＨＣは分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、ＧＦＰ添加による６６ｋＨＣの改質は、これら性質を示す６６ｋＨＣの能力を変化させない。第３に、６６ｋＨＣはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へＧＦＰを輸送可能である。第４に、輸送されたＧＦＰ分子はその蛍光発光性を保持する。第５に、６６ｋＨＣはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ６×－ヒスチジン標識を輸送可能である。第６に、６６ｋＨＣはヒト消化管上皮細胞を通して１を超える分子を同時に(ポリヒスチジン標識及びＧＦＰ)輸送可能である。

【０１５２】

実施例３０(MDCK細胞中の頂端面から基底面への緑色蛍光蛋白質６６ｋＨＣのトランスサイトーシス)

緑色蛍光蛋白質６６ｋＨＣのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度ＧＦＰ－６６ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、底部室の内容物を集め、蛍光分光法で分析した。関連するトランスサイトーシスの量はＧＦＰ－６６ｋＨＣ結合体の発光ピークを基礎に示した。

結果は、６６ｋＨＣはＧＦＰ細胞の頂端面から基底面へは効率良く輸送しなかったことを示した。精製６６ｋＨＣフラグメントはMDCK細胞培養物中のＧＦＰを効率良く輸送しなかった。６６ｋＨＣは、分化し、極性化したイヌ腎臓上皮細胞による、結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出は不充分になされた。

【０１５３】

実施例３１(T-84細胞中の頂端面から基底面への商標「S-TAG」－５０ｋＨＣのトランスサイトーシス)

商標「S-TAG」５０ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してヒト消化管上皮(T-84)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度商標「S-TAG」－５０ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスされた分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法により確認した。

結果は、商標「S-TAG」－５０ｋＨＣは細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを確認した。商標「S-TAG」－５０ｋＨＣは効率良くT-84細胞を通過するだけではなく、分子の分子量は変化しなかった。

【０１５４】

６つの結論が得られた。第１に、商標「S-TAG」－５０ｋＨＣは分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、商標「S-TAG」の添加による５０ｋＨＣの改質は、これら性質を示す５０ｋＨＣの能力を変化させない。第３に、５０ｋＨＣはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ商標「S-TAG」を輸送可能である第４に、輸送された商標「S-TAG」分子はその抗体結合性を保持する。第５に、５０ｋＨＣはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ６×－ヒスチジン標識を輸送可能である。第６に、５０ｋＨＣはヒト消化管上皮細胞通過時に１を超える分子(ポリヒスチジン標識及び商標「S-TAG」)を輸送可能である。

【０１５５】

実施例３２(MDCK細胞中の頂端面から基底面への商標「S-TAG」－５０ｋＨＣのトランスサイトーシス)

商標「S-TAG」－５０ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度商標「S-TAG」－５０ｋＨＣを上部室へ添加して開始した

。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスされた分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法により確認した。

結果は、商標「S-TAG」－５０ｋＨＣは、細胞の基底面から採取した媒体中には検知されなかったことを示した。従って、商標「S-TAG」－５０ｋＨＣは効率良くMDCK細胞を通過しなかった。商標「S-TAG」－５０ｋＨＣは、極性化したMDCK細胞による、結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出は不充分になされた。

【０１５６】

実施例３３(T-84細胞中の頂端面から基底面へのグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ(GST)－８８ｋＨＣ結合体のトランスサイトーシス)

GST－８８ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してヒト消化管上皮(T-84)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度GST－８８ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスされた分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法及びコピーしたブロットを抗GST抗体でプローブすることによりにより確認した。

結果は、GST－８８ｋＨＣは細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを確認した。GST－８８ｋＨＣは効率良くT-84細胞を通過するだけではなく、分子の分子量は変化しなかった。

【０１５７】

実験結果から６つの主要な結論が得られた。GST－８８ｋＨＣは分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により、結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、GST添加による８８ｋＨＣの改質は、これら性質を示す８８ｋＨＣの能力を変化させない。第３に、９９ｋＨＣはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へGSTを輸送可能である。第４に、輸送されたGST分子はその酵素的性質を保持する。第５に、８８ｋＨＣはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ６×－ヒスチジン標識を輸送可能である。第６に、８８ｋＨＣはヒト消化管上皮細胞通過時に１を超える分子(ポリヒスチジン標識及びGST)を輸送可能である。

【０１５８】

実施例３４(MDCK細胞中の頂端面から基底面へのGST－８８ｋＨＣのトランスサイトーシス)

GST－８８ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMDCK細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度GST－８８ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスされた分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法及びコピーしたブロットを抗GST抗体でプローブすることにより確認した。結果は細胞の頂端面から基底面へGST－８８ｋＨＣを効率良く輸送しなかったことを示した。

【０１５９】

実施例３５(T-84細胞中のGST－６６ｋＨＣの頂端面から基底面へのトランスサイトーシス)

GST－６６ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してヒト消化管上皮(T-84)細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度GST－６６ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、

３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスされた分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法及びコピーしたブロットを抗GST抗体でプローブすることによりにより確認した。

結果は、GST－６６ｋＨＣは細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを確認した。GST－６６ｋＨＣは効率良くT-84細胞を通過するだけではなく、分子の分子量は変化しなかった。

【０１６０】

実験結果から６つの主要な結論が得られた。第１に、GST－６６ｋＨＣは分化し、極性化したヒト消化管上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、GSTの添加による６６ｋＨＣの改質は、これら性質を示す６６ｋＨＣの能力を変化させない。第３に、６６ｋＨＣはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へGSTを輸送可能である。第４に、輸送されたGST分子はその酵素的性質を保持する。第５に、６６ｋＨＣはヒト消化管上皮細胞の頂端面から基底面へ６×－ヒスチジン標識を輸送可能である。第６に、６６ｋＨＣはヒト消化管上皮細胞通過時に１を超える分子(ポリヒスチジン標識及びGST)を輸送可能である。

【０１６１】

実施例３６(MDCK細胞中のGST－６６ｋＨＣの頂端面から基底面へのトランスサイトーシス)

GST－６６ｋＨＣ、セロタイプＡのトランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してMDCK細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度GST－６６ｋＨＣを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの試験の最後に、１条件当り３個の底部室の内容物を集め、商標「CENTRICON」ミクロ濃縮機中で濃縮した。得られた溶液を７．５％(ｗ／ｖ)SDS-PAGE上に流し、続いてニトロセルロース膜へ移した。トランスサイトーシスされた分子の実体及び分子量は、抗ＨＣ抗体を使用したウェスタンブロット法及びコピーしたブロットを抗GST抗体でプローブすることにより確認した。

結果は、GST－６６ｋＨＣは細胞の頂端面から基底面へ効率良く輸送されなかったことを示した。精製GST－６６ｋＨＣは効率良くMDCK培養物を通過しなかった。GST－６６ｋＨＣは、極性化したイヌ腎臓上皮細胞による、結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出は不充分になされた。

【０１６２】

実施例３７(Calu－３細胞中の頂端面から基底面へのBoNT Aのトランスサイトーシス)

トランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してCalu－３細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－BoNT Aを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの段階で実験の底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量を標識化毒素の特定の活性に基づいて計算した。

結果は、BoNT Aは細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを示した。精製神経毒は効率良くCalu－３細胞を通過した。トランスサイトーシス率は０．４２３±０．０７６フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}と定量された。

【０１６３】

実験結果から５つの主要な結論が得られた。第１に、精製ボツリヌス菌神経毒は分化し、極性化したヒト肺胞上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、リシン残基の修飾はこれら性質を示すホロトキシンの能力を変えない。第３に、ホロトキシンはヒト肺胞上皮細胞の頂端面から基底面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。第４に、ＨＣはヒト肺胞上皮細胞の頂端面から基底面へＬＣを輸送可能である。第５に、ＨＣはヒト肺胞上皮細胞を通過する時に１を超える分子

(ＬＣ及びボルトンハンター試薬)を輸送可能である。

【０１６４】

実施例３８(Calu－３細胞中の基底面から頂端面へのBoNT Aのトランスサイトーシス)

トランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してCalu－３細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－BoNT Aを底部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの段階で実験の上部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化BoNT Aの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、BoNT Aは細胞の基底面から頂端面への側面へ輸送されたことを示した。精製神経毒は効率良くCalu－３細胞を通過した。又、トランスサイトーシス率は０．２０６±０．０３７フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}と定量された。

【０１６５】

実験結果から５つの主要な結論が得られた。第１に、精製ボツリヌス菌神経毒は分化し、極性化したヒト肺胞上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。このプロセスは、基底面から頂端面への方向では反対の方向よりも幾分効率が良くない。第２に、リシン残基の修飾はこれら性質を示すホロトキシンの能力を変えない。第３に、ホロトキシンは^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬をヒト消化管上皮細胞の基底面から頂端面へ輸送可能である。第４に、ＨＣはヒト消化管上皮細胞の基底面から頂端面へＬＣを輸送可能である。第５に、ＨＣはヒト肺胞上皮細胞を通過する時に１を超える分子(ＬＣ及びボルトンハンター試薬)を輸送可能である。

【０１６６】

実施例３９(Calu－３細胞中の頂端面から基底面へのＡＨＣのトランスサイトーシス)

トランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してCalu－３細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－ＨＣ(セロタイプＡ)を上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの段階で実験の底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化ＨＣの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、ＨＣは細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを示した。ＨＣが効率良くCalu－３細胞を通過しただけでなく、得られたトランスサイトーシス率(０．１９８±０．００７フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2})は精製ホロトキシンのトランスサイトーシス率(０．４２３フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2})に匹敵した。

【０１６７】

３つの主要な結論が得られた。第１に、ボツリヌス菌神経毒のＨＣフラグメントは分化し、極性化したヒト肺胞上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、リシン残基の修飾は、これら性質を示すＨＣの能力を変化させない。第３に、ＨＣはヒト肺胞上皮細胞の頂端面から基底面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。

【０１６８】

実施例４０(Calu－３細胞中の基底面から頂端面へのＨＣのトランスサイトーシス)

トランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してCalu－３細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－ＨＣ(セロタイプＡ)を底部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの段階で実験の上部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化ＨＣの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、ＨＣは細胞の基底面から頂端面への側面へ輸送されたことを示した。ＨＣが効率良くCalu－３細胞を通過しただけでなく、得られたトランスサイトーシス率(０．１１２±０．０３３フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2})は精製ホロトキシンのトランスサイトーシス

率(０．２０６フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^2)に匹敵した。

【０１６９】

３つの主要な結論が得られた。第１に、ボツリヌス菌神経毒のＨＣフラグメントは分化し、極性化したヒト肺胞上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。この現象は頂端面から基底面方向及び基底面から頂端面方向の両方で発生するが、前者がより効率が良い。第２に、リシン残基の修飾は、これら性質を示すＨＣの能力を変化させない。第３に、ＨＣはヒト肺胞上皮細胞の基底面から頂端面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。

【０１７０】

実施例４１(ラット肺胞上皮細胞中の頂端面から基底面へのBoNT Aのトランスサイトーシス)

トランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してラット肺胞上皮細胞(RAEC)をインキュベートして分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－BoNT Aを上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの段階で実験の底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化BoNT Aの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、BoNT Aは細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを示した。精製神経毒は効率良くラット肺胞上皮細胞を通過し、トランスサイトーシス率は０．３７６±０．０１４フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}と定量された。

【０１７１】

実験結果から５つの主要な結論が得られた。第１に、精製ボツリヌス菌神経毒は分化し、極性化したラット肺胞上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、リシン残基の修飾はこれら性質を示すホロトキシンの能力を変えない。第３に、ホロトキシンはラット肺胞上皮細胞の頂端面から基底面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。第４に、ＨＣはラット肺胞上皮細胞の頂端面から基底面へＬＣを輸送可能である。第５に、ＨＣはラット肺胞上皮細胞を通過する時に１を超える分子(ＬＣ及びボルトンハンター試薬)を輸送可能である。

【０１７２】

実施例４２(RAEC中の基底面から頂端面へのBoNT Aのトランスサイトーシス)

トランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してラット肺胞上皮細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－BoNT Aを底部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの段階で実験の上部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化BoNT Aの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、BoNT Aは細胞の基底面から頂端面への側面へ輸送されたことを示した。精製神経毒は効率良くラット肺胞上皮細胞を通過し、トランスサイトーシス率は０．１５９±０．０２７フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^{2}と定量された。

【０１７３】

実験結果から５つの主要な結論が得られた。第１に、精製ボツリヌス菌神経毒は分化し、極性化したラット肺胞上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。この現象は頂端面から基底面方向及び基底面から頂端面方向の両方で発生するが、前者がより効率が良い。第２に、リシン残基の修飾はこれら性質を示すホロトキシンの能力を変えない。第３に、ホロトキシンはラット肺胞上皮細胞の基底面から頂端面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。第４に、ＨＣはラット肺胞上皮細胞の基底面から頂端面へＬＣを輸送可能である。第５に、ＨＣはラット肺胞上皮細胞を通過する時に１を超える分子(ＬＣ及びボルトンハンター試薬)を輸送可能である。

【０１７４】

実施例４３(RAEC中の頂端面から基底面へのＨＣのトランスサイトーシス)

トランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してラット肺胞上皮細胞(RAEC)をインキュベートして分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－ＨＣ(セロタイプＡ)を上部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの段階で実験の底部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化ＨＣの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、ＨＣは細胞の頂端面から基底面へ輸送されたことを示した。ＨＣは効率良くラット肺胞上皮細胞を通過するだけではなく、トランスサイトーシス率(０．１４０±０．０５０フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^2)はボツリヌス菌神経毒タイプＡのトランスサイトーシス率(０．３７６フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^2)に匹敵した。

【０１７５】

３つの主要な結論が得られた。第１に、ボツリヌス菌神経毒のＨＣフラグメントは分化し、極性化したラット肺胞上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、リシン残基の修飾は、これら性質を示すＨＣの能力を変化させない。第３に、ＨＣはヒト肺胞上皮細胞の頂端面から基底面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。

【０１７６】

実施例４４(RAEC中の基底面から頂端面へのＨＣのトランスサイトーシス)

トランスサイトーシスを商標「TRANSWELL」装置アッセイシステムを使用してラット肺胞上皮細胞培養物を分析した。アッセイを１×１０$^{-8}$モル濃度(^{125}Ｉ)－ＨＣ(セロタイプＡ)を底部室へ添加して開始した。続いて培養物を１８時間、３７℃でインキュベートした。それぞれの段階で実験の上部室の内容物を集め、ゲルろ過した。空隙容量フラクションを放射能アッセイし、毒素ピークを合計して合計数を決定した。トランスサイトーシスの量は、標識化ＨＣの特定の活性を基礎にして計算した。

結果は、ＨＣは細胞の基底面から頂端面への側面へ輸送されたことを示した。ＨＣは効率良くラット肺胞上皮細胞を通過するだけではなく、トランスサイトーシス率(０．１３２±０．０２６フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^2)はボツリヌス菌神経毒タイプＡのトランスサイトーシス率(０．１５９フェムトモル／ｈｒ／ｃｍ^2)に匹敵した。

【０１７７】

３つの主要な結論が得られた。第１に、ボツリヌス菌神経毒のＨＣフラグメントは分化し、極性化したラット肺胞上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。この現象は頂端面から基底面方向及び基底面から頂端面方向の両方で発生するが、前者がより効率が良い。第２に、リシン残基の修飾は、これら性質を示すＨＣの能力を変化させない。第３に、ＨＣはラット肺胞上皮細胞の基底面から頂端面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。

【０１７８】

実施例４５(マウスの気道からのBoNT Aの吸収)

この実施例は、ボツリヌス菌毒素は、生きている動物の上皮細胞の頂端面上に受容体が結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、及び上皮細胞の基底面に放出されるために必要な全ての情報を含有することを示した。これら実験は均一なBoNT及びスイス・ウェブスターメスマウス(２５～３０グラム体重)を使用して行った。

BoNT Aを鼻内経路で投与した。マウスをイソフルラン(商標「ISO-THESIA」、Abbott Laboratories North社製、シカゴ、IL、米国)で軽く麻酔した後、３６．４μｇ／ｋｇ体重(^{125}Ｉ)－BoNT Aを２０μｌ溶液の外鼻孔への単回投与で投与した。動物の頭部は後部咽頭中へのドレナージを最小化するために垂直位置で保持した。個々の集団はそれぞれ１、２、又は３時間後にCO_2ガスで犠牲にされ、心臓穿刺により血液を採取した。血漿を１０分間の３０００×ｇで遠心分離して血液から分離し、アッセイするまで－２０℃で貯蔵した。続いて血漿サンプル(１００μｌ)をＰＢＳ(４００μｌ)と混合し、商標「SEPHADEX」Ｇ－２５カラムを通してろ過した。フラクション(０．５ｍｌ)を集め、ガンマカウンターでフラクション中の放射性量を測定した。空隙容量で溶離した標識化BoNT A、及び空隙容

量フラクション中に含有された放射能を、存在する蛋白質の合計量を決定するために合計した。

【０１７９】

図２３に示される結果は、ボツリヌス菌毒素は気道から吸収されたことを表す。血液中の蛋白質濃度最大値の時点は、約２時間であり、ピーク値の達成後急速に浄化された。

実験結果から５つの主要な結論が得られた。第１に、精製ボツリヌス菌神経毒はin vivoの気道上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、リシン残基の修飾はこれら性質を示すホロトキシンの能力を変えない。第３に、ホロトキシンはin vivoのマウス気道上皮細胞の頂端面から基底面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。第４に、ＨＣはin vivoのマウス気道上皮細胞の頂端面から基底面へＬＣを輸送可能である。第５に、ＨＣはin vivoのマウス気道上皮細胞を通過する時に１を超える分子(ＬＣ及びボルトンハンター試薬)を輸送可能である。

【０１８０】

実施例４６(マウスの気道からの天然ＨＣの吸収)

この実施例は、ＨＣ(セロタイプＡ)は、生きている動物の上皮細胞の頂端面上に受容体が結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、及び上皮細胞の基底面に放出されるために必要な全ての情報を含有することを示した。これら実験は均一に単離したBoNTのＨＣ及びスイス・ウェブスターメスマウス(２５～３０グラム体重)を使用して行った。

ＨＣを鼻内経路で投与した。マウスをイソフルラン(商標「ISO-THESIA」、Abbott Laboratories North社製、シカゴ、IL、米国)で軽く麻酔した後、２４．４μｇ／ｋｇ体重(^{125}Ｉ)－ＨＣを２０μｌ溶液の外鼻孔への単回投与で投与した。動物の頭部は後部咽頭中へのドレナージを最小化するために垂直位置で保持した。個々の集団はそれぞれ１、２、４又は６時間後にCO_2ガスで犠牲にされ、心臓穿刺により血液を採取した。血漿を１０分間の３０００×ｇで遠心分離して血液から分離し、アッセイするまで－２０℃で貯蔵した。続いて血漿サンプル(１００μｌ)をＰＢＳ(４００μｌ)と混合し、商標「SEPHADEX」Ｇ－２５カラムを通してろ過した。フラクション(０．５ｍｌ)を集め、ガンマカウンターでフラクション中の放射性量を測定した。空隙容量で溶離した標識化ＨＣ、及び空隙容量フラクション中に含有された放射能を存在するＨＣの合計量を決定するために合計した。

【０１８１】

ＨＣを投与した動物を６時間監視した。図２４に示される結果はＨＣは気道から吸収されたことを表す。血液中の蛋白質濃度最大値の時点は約２時間であり、ピーク値の達成後急速に浄化された。

３つの主要な結論が得られた。第１に、ボツリヌス菌神経毒のＨＣフラグメントはin vivoの気道上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、リシン残基の修飾は、これら性質を示すＨＣの能力を変化させない。第３に、ＨＣはin vivoのマウス気道上皮細胞の頂端面から基底面へ^{125}Ｉ－ボルトンハンター試薬を輸送可能である。

【０１８２】

実施例４７(マウスの気道からの組み換え型５０ｋＨＣの吸収)

この実施例は、５０ｋＨＣは、生きている動物の上皮細胞の頂端面上に受容体が結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、及び上皮細胞の基底面に放出されるために必要な全ての情報を含有することを示した。これら実験は精製６×ｈｉｓ標識融合型組み換え型５０ｋＨＣ及びスイス・ウェブスターメスマウス(それぞれ２５～３０グラム体重)を使用して行った。

５０ｋＨＣを鼻内経路で投与した。マウスをイソフルラン(商標「ISO-THESIA」、Abbott Laboratories North社製、シカゴ、IL、米国)で軽く麻酔した後、０．４ｍｇ／ｋｇ体重の蛋白質を２０μｌ溶液の外鼻孔への単回投与で投与した。動物の頭部は後部咽頭中へのドレナージを最小化するために垂直位置で保持した。個々の集団はそれぞれ０．５、１、２、又は４時間後にCO_2ガスで犠牲にされ、心臓穿刺により血液を採取した。血漿を１０分間の３０００×ｇで遠心分離して血液から分離し、アッセイするまで－２０℃で貯

蔵した。ＨＣフラグメントの血漿中濃度を捕獲ELISAにより決定した。

【０１８３】

５０ｋＨＣを投与した動物を４時間監視した。図２５に示される結果から、５０ｋＨＣは気道から吸収され、血液中の蛋白質濃度最大値の時点は約１時間であり、ピーク値の達成後急速に浄化された。

実験結果から２つの主要な結論が得られた。第１に、ボツリヌス菌神経毒の５０ｋＨＣフラグメントはin vivoのマウス気道上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、５０ｋＨＣはin vivoのマウス気道上皮細胞の頂端面から基底面へ６×－ヒスチジン標識を輸送可能である。

【０１８４】

実施例４８(マウスの気道からのGST－５０ｋＨＣの吸収)

この実施例は、５０ｋＨＣは、生きている動物の上皮細胞の頂端面上に受容体が結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、及び上皮細胞の基底面に放出されるために必要な全ての情報を含有することを示した。更に、５０ｋＨＣは上皮細胞を通過してGSTを輸送できる。これら実験は精製組み換え型GST－５０ｋＨＣ及びスイス・ウェブスターメスマウス(それぞれ２５～３０グラム体重)を使用して行った。

GST－５０ｋＨＣ融合蛋白質を鼻内経路で投与した。マウスをイソフルラン(商標「ISO-THESIA」、Abbott Laboratories North社製、シカゴ、IL、米国)で軽く麻酔した後、０．６μｇ／ｋｇ体重の蛋白質を２０μｌ溶液の外鼻孔への単回投与で投与した。動物の頭部は後部咽頭中へのドレナージを最小化するために垂直位置で保持した。個々の集団はそれぞれ１，２，４又は６時間後にCO_2ガスで犠牲にされ、心臓穿刺により血液を採取した。血漿を１０分間の３０００×ｇで遠心分離して血液から分離し、アッセイするまで－２０℃で貯蔵した。GST－５０ｋＨＣの血漿中濃度を捕獲ELISAにより決定した。

【０１８５】

GST－５０ｋＨＣを投与した動物を６時間監視した。図２６に示される結果は、GST－５０ｋＨＣは気道から吸収されたことを表す。血液中の蛋白質濃度最大値の時点は約２時間であり、ピーク値の達成後急速に浄化された。

実験結果から４つの主要な結論が得られた。第１に、GST－５０ｋＨＣはin vivoのマウス気道上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、５０ｋＨＣはin vivoのマウス気道上皮細胞の頂端面から基底面へGSTを輸送可能である。第３に、５０ｋＨＣはin vivoのマウス気道上皮細胞の頂端面から基底面へ６×－ヒスチジン標識を輸送可能である。第４に、５０ｋＨＣはin vivoのマウス気道上皮細胞を通過する時に１を超える分子(GST及び６×－ヒスチジン標識)を輸送可能である。

【０１８６】

実施例４９(GST－５０ｋＨＣでのマウスの鼻内免疫)

この実施例は、５０ｋＨＣは、生きている動物の上皮細胞の頂端面上に受容体が結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、及び上皮細胞の基底面に放出されるために必要な全ての情報を含有することを示した。更に、５０ｋＨＣは免疫反応を発現するために適切な構造の異種の分子を輸送できる。これら実験は精製組み換え型GST－５０ｋＨＣ及びスイス・ウェブスターメスマウス(それぞれ２５－３０グラム体重)を使用して行った。

鼻内免疫のために、マウスへ０．６ｍｇ／ｋｇ体重のGST－５０ｋＨＣを２０μｌのＰＢＳ溶液で投与した。マウスをイソフルラン(商標「ISO-THESIA」、Abbott Laboratories North社製、シカゴ、IL、米国)で軽く麻酔した。蛋白質を２０μｌ溶液の外鼻孔への単回投与で投与した。動物の頭部は後部咽頭中へのドレナージを最小化するために垂直位置で保持した。５回投薬を７日間隔で投与した。第５回の免疫後、マウスを１０日間飼育し、試験体を、GST、５０ｋＨＣ、及びGST－５０ｋＨＣへの免疫反応性用免疫ブロット法で分析した。

【０１８７】

GST－５０ｋＨＣで免疫化された動物の特定の抗体の存在を監視した。図２７の免疫化

されたマウス血清のウェスタンブロットに示される結果は、これら動物はGST及びBoNT AＨＣの両方に対する抗体、次ぎにGST－５０ｋＨＣ鼻内免疫を発達させたことを示す。これら結果は、鼻内免疫により、５０ｋＨＣはin vivoで気道から血流へGST分子を運搬し、GST及び５０ｋＨＣに対する特定の免疫反応を引き起こしたことを表す。

実験結果から５つの主要な結論が得られた。第１に、GST－５０ｋＨＣはin vivoのマウス気道上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、放出される。第２に、５０ｋＨＣはin vivoのマウス気道上皮細胞の頂端面から基底面へGSTを輸送可能である。第３に、５０ｋＨＣはin vivoのマウス気道上皮細胞の頂端面から基底面へ６×－ヒスチジン標識を輸送可能である。第４に、５０ｋＨＣはin vivoのマウス気道上皮細胞を通過する時に１を超える分子(GST及び６×－ヒスチジン標識)を輸送可能である。第５に、トランスサイトーシスしたGST－５０ｋＨＣはin vivoでGST及び５０ｋＨＣに対する特定の免疫反応を発現することが可能である。

【０１８８】

実施例５０(BoNT A４８キロドルトンＨＣ部分でのマウスの鼻内免疫)

この実施例はＨＣカルボキシ末端の２キロドルトンセグメントは、生きている動物の上皮細胞の頂端面上に受容体が結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、及び上皮細胞の基底面に放出されるために必要な情報を含有することを示した。これを示すため、ＨＣの４８キロドルトン部分を、トリプシン消化で５０ｋＨＣのカルボキシ末端の２キロドルトンフラグメントを削除して生成した。

この試験は、精製組み換え型４８ｋＨＣ及びスイス・ウェブスターメスマウス(２５～３０グラム体重)を使用して行った。

【０１８９】

鼻内免疫のために、マウスへ０．４ｍｇ／ｋｇの４８ｋＨＣを含む１０μｌのＰＢＳ溶液で投与した。マウスをイソフルラン(商標「ISO-THESIA」、Abbott Laboratories North社製、シカゴ、IL、米国)で軽く麻酔した。蛋白質を１０μｌ溶液の外鼻孔への単回投与で投与した。動物の頭部は後部咽頭中へのドレナージを最小化するために垂直位置で保持した。３回投薬を２週間隔で投与した。第３回の免疫後、マウスを７日間飼育し、試験体をELISAでボツリヌス菌毒素Ａへの免疫反応性を分析した。又、マウスは第３免疫１０日後、致死量のボツリヌス菌毒素Ａ(１μｇ／マウス)の負荷をかけ、生存率を２週間観察した。

すべての動物は、ボツリヌス菌毒素の致死量負荷後２４時間以内に死亡した(即ち、保護効果はほとんど無かった。)。更に、抗原に対する血清ＩｇＧの濃度はほんの僅かだった。これらの結果は切除したＨＣのカルボキシ末端の２キロドルトンフラグメントはin vivoのマウス気道上皮細胞による結合、内在化、トランスサイトーシス、及び放出に関する重要な作用を有することを示した。

【０１９０】

実施例５１(５０ｋＨＣ及びコレラ毒素Ｂサブユニットを使用したマウスの鼻内免疫)

この実施例は、鼻内経路により５０ｋＨＣを共投与した時、コレラ毒素Ｂサブユニット(CTB)はBoNTに対する全身性免疫反応及び粘膜性免疫反応を発現することを示した。これら実験は精製組み換え型５０ｋＨＣ、コレラ毒素Ｂサブユニット(sigma)及びスイス・ウェブスターメスマウス(それぞれ２５～３０グラム体重)を使用して行った。

マウスへ０．１ｍｇ／ｋｇ体重のCTBを含む１０μｌのＰＢＳ溶液、４０μｇ／ｋｇ体重の５０ｋＨＣを含む１０μｌのＰＢＳ溶液、又は５０ｋＨＣ及びCTBを含む１０μｌのＰＢＳ溶液を鼻内経路で投与した。マウスをイソフルラン(商標「ISO-THESIA」、Abbott Laboratories North社製、シカゴ、IL、米国)で軽く麻酔した。蛋白質を１０μｌ溶液の外鼻孔への単回投与で投与した。動物の頭部は後部咽頭中へのドレナージを最小化するために垂直位置で保持した。３回投薬を２週間隔で投与した。第３回の免疫後、マウスを７日間飼育し、試験体をELISAでボツリヌス菌毒素Ａへの免疫反応性を分析した。又、マウスは第３免疫１０日後、致死量のボツリヌス菌毒素Ａ(１μｇ／マウス)の負荷をかけ、生存率を２週間観察した。

【０１９１】
CTBで免疫化された動物は、ボツリヌス菌毒素の致死量負荷後２時間以内に死亡した。低投薬量の５０ｋＨＣで免疫化された動物はBoNT Aに対する負荷及び中程度のレベルの血清Ｉｇ応答に対する４０％の保護作用を示した(図２８)。５０ｋＨＣ及びCTBで免疫化された動物は、顕著な高レベルの血清Ｉｇ応答及び粘膜性ＩｇＧ応答を発展させ、すべての動物はBoNT Aの致死量負荷に対して保護された。
これらの結果は、５０ｋＨＣの鼻内投与は、０．４ｍｇ／ｋｇ(体重)の高い投薬量でさえ、BoNT Aの致死量負荷に対する、中程度のレベルの血清Ｉｇ応答及び僅か４０％の動物の保護を発現するが粘膜性免疫反応を引き起こさないことを示した。しかし、粘膜性ＩｇＧ応答はCTBの共投与により誘発されることができ、毒素の複合的致死量(multilethal dose;１μｇ／マウス)に対する保護を達成した。

【０１９２】
実施例５２(精製セロタイプＡＨＣ(１００ｋＤａＨＣ)でのマウスの経口免疫)
この実施例は、１００ｋＤａＨＣは、生きている動物の、腸内細胞の頂端面上に受容体が結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ、及び上皮細胞の基底面に放出されるために必要な全ての情報を含有することを示した。これら実験は天然ボツリヌス菌神経毒セロタイプＡから精製ＨＣを使用して、スイス・ウェブスターメスマウス(体重２５－３０グラム)へ(栄養)補給管を経由して投与して行った。
経口免疫のために、マウス当り１０μｇの１００ｋＤａＨＣを２００μｌのＰＢＳ溶液でマウスへ投与した。ＨＣを含む２００μｌのＰＢＳ溶液をそれぞれのマウスへ栄養(補給)針を使用して投与した。最初の投薬の次に３個のブースターを２週間隔で与えた。マウスをイソフルラン(商標「ISO-THESIA」、Abbott Laboratories North社製、シカゴ、IL、米国)で麻酔し、それぞれのブースターの７日後、眼窩後部洞(sinus)から血液を採取した。抗体の生成はELISAによりアッセイされ、タイターを計算した。

【０１９３】
それぞれのブースターに続く抗体タイターを図２９に示す。これらの結果は経口で１００ｋＤａＨＣで免疫化されたマウスは毒素ＨＣへの抗体を産生したことを示した。これらの結果は、１００ｋＤａＨＣがin vivoで胃腸システムから循環系へ吸収され、特定の免疫反応が１００ｋＤａＨＣでの経口免疫により引き起こされたことを表す。更に、結果は精製１００ｋＤａＨＣはボツリヌス菌神経毒に対する経口用ワクチンであることを示した。

【０１９４】
実施例５３(In vitro及びIn vivoの上皮細胞を通過する異なる分子サイズ及び異なる分子の機能を有する種々の分子の輸送)
この実施例はボツリヌス菌毒素のＨＣ及びＨＣのフラグメントは、上皮細胞を通過して分子を広い範囲で輸送できることを示した。
これは輸送分子(即ち、ＨＣ又はＨＣのフラグメント)は、上皮細胞の表面へ結合されてエンドサイトーシス及びトランスサイトーシスを受けることで、豊富な積載分子(リガンド、酵素、抗原等)を全身循環系中へ運搬し、次に血液及びリンパ液中へ放出できることを意味する。
In vitro実験及びin vivo実験は実施例１～５２で記載したとおり行った。これら実験の結果は、ＨＣ又はそのフラグメントは、広く異なる分子量(下記表２に示すように)及び広く異なる機能(下記表２に示すように)を有する分子を輸送し、上皮細胞を通過可能なことを示した。

【０１９５】

【表２】

種々のサイズの分子	
分子	サイズ（キロドルトン）
ビオチン	２４４
ボルトンハンター試薬（^{125}Ｉ）	３８７
Ａｌｅｘａ５６８	７９２
６×ヒスチジン標識	８４０
S-TAG	１、７４８
グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（GST）	２６０００
緑色蛍光蛋白質（GST）	２７０００
BoNTＬＣ	５００００

【０１９６】

【表３】

異なる機能の分子	
分子	機能的性質
ビオチン	リガンド結合
ホースラディッシュペルオキシダーゼ	触媒的活性を示す。
ボルトンハンター試薬（^{125}Ｉ）	電離放射線発光する。
Ａｌｅｘａ５６８	蛍光（信号）発光する。
種々の抗原	抗体応答を発現する。
BoNTＬＣ	触媒的活性を示す。

【０１９７】

実験結果から８つの主要な結論が得られた。第１に、ボツリヌス毒素のＨＣは体外及び全身循環間の境界を形成する上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ放出される。第２に、ボツリヌス菌毒素のＨＣのフラグメントは体外及び全身循環間の境界を形成する上皮細胞により結合され、内在化され、トランスサイトーシスされ放出される。第３に、ＨＣ及びそのフラグメントは、個々の分子の付着が可能となるように改変された場合でも、上皮バリアを通過するために必要な全ての性質を保持する。第４に、ＨＣ及びそのフラグメントは種々の分子を上皮細胞を個別的に通過して輸送できる。第５に、１を超える分子の付着が可能となるように改変された場合でも、ＨＣ及びそのフラグメントは上皮細胞を通過するために必要な全ての性質を保持する。第６に、ＨＣ及びそのフラグメントは上皮細胞を通過する時に１を超える分子を輸送できる。第７に、ＨＣ及びそのフラグメントは同時に異なる分子量の分子を輸送できる。第８に、ＨＣ及びそのフラグメントは同時に異なる機能の分子を輸送できる。

【０１９８】

上記記載の態様は、本発明の範囲を逸脱しない限り変更できることは、当業者により理解されるとおりである。従って、本明細書は本発明を制限するものではない特定の態様を開示したが、それらは特許請求の範囲で定義される本発明の変更を含むものであることは当然である。

【図面の簡単な説明】

【０１９９】

上記本発明の開示は添付図面を参照することにより更に容易に理解できる。本発明の例示のために、好ましいと思われる例を図に示す。しかし、本発明は、示された配列、配列、化合物、及び手段のみに厳格に制限されない。

【図１】図１Ａ～１ＢＢで構成される図１は、ボツリヌス菌神経毒のアミノ酸配列の配列である：(i)セロタイプAHC(SEQ ID NO：1、商標「GENBANK」登録番号Q45894より得られる。)；(ii)セロタイプBHC(SEQ ID NO：2、商標「GENBANK」登録番号P10844より得られる。

)；(iii)セロタイプCHC(SEQ ID NO：3、商標「GENBANK」登録番号P18640より得られる。)；(iv)セロタイプDHC(SEQ ID NO：4、商標「GENBANK」登録番号P19321より得られる。)；(v)セロタイプEHC(SEQ ID NO：5、商標「GENBANK」登録番号P30995より得られる。)；(vi)セロタイプFHC(SEQ ID NO：6、商標「GENBANK」登録番号P30996より得られる。)；及び(vii)セロタイプGHC(SEQ ID NO：7、商標「GENBANK」登録番号Q60393より得られる。)。
配列中、ＨＣの８８キロドルトンフラグメントのアミノ酸配列(セロタイプＡ)(SEQ ID NO：8)(即ち、ここで表される「８８ｋＨＣ」のフラグメント、開始点は残基５２４の位置)は太字で示される。ＨＣ(セロタイプＡ)(SEQ ID NO：9)(即ち、ここで表される「６６ｋＨＣ」のフラグメント、開始点は残基７１４の位置)の６６キロドルトンフラグメントのアミノ酸配列は下線(その一部は二重下線)部で示される。ＨＣ(セロタイプＡ)(SEQ ID NO：10)の５０キロドルトンフラグメントのアミノ酸配列(即ち、ここで表される「５０ｋＨＣ」のフラグメント、開始点は残基８８６の位置)は二重下線部で示される。又、ＨＣ(セロタイプＡ)の４８キロドルトン部分のアミノ酸配列(SEQ ID NO：169)(即ち、５０ｋＨＣフラグメントからそのカルボキシ末端の２キロドルトンを引いたものは、「４８ｋＨＣ」で表され、開始点は残基８８６の位置であり、終了点は残基１３４３の位置)は斜字体で示される。
【図２】天然ボツリヌス菌(セロタイプＡ)、そのＨＣ；８８ｋＨＣ、６６ｋＨＣ及び５０ｋＨＣを表すそれぞれのフラグメント、並びに４８ｋＨＣを表す部分の関連する位置の構造を示す概略図である。
【図３】極性化した消化管上皮細胞培養物(T-84)中でトランスサイトーシスした天然ボツリヌス菌神経毒タイプＡ(BoNT A)のウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)天然毒素のトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)T-84細胞を通してトランスサイトーシスした天然毒素(底部室から回収した。)。
【図４】極性化したイヌ腎臓上皮細胞培養物(MDCK)中でトランスサイトーシスした天然ボツリヌス菌神経毒タイプＡのウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)天然毒素のトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)MDCK細胞を通してトランスサイトーシスした天然毒素(底部室から回収した。)。
【図５】極性化した上皮細胞培養物(T-84)中でトランスサイトーシスしたＨＣ(ＨＣ)のウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)ＨＣのトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)T-84細胞を通してトランスサイトーシスしたＨＣ(底部室から回収した。)。
【図６】極性化したイヌ腎臓上皮細胞培養物(MDCK)中でトランスサイトーシスしたＨＣのウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)ＨＣのトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)MDCK細胞を通してトランスサイトーシスしたＨＣ(底部室から回収した。)。
【図７】極性化した上皮細胞培養物(T-84)中でトランスサイトーシスした６６ｋＤａＨＣカルボキシ末端フラグメント(６６ｋＨＣ)のウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)６６ｋＨＣのトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)T-84細胞を通してトランスサイトーシスした６６ｋＨＣ(底部室から回収した。)。
【図８】極性化したイヌ腎臓上皮細胞培養物(MDCK)中でトランスサイトーシスした６６ｋＤａＨＣカルボキシ末端フラグメント(６６ｋＨＣ)のウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)６６ｋＨＣのトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)MDCK細胞を通してトランスサイトーシスした６６ｋＨＣ(底部室から回収した。)。
【図９】極性化した上皮細胞培養物中でトランスサイトーシスした５０ｋＤａＨＣフラグメント(５０ｋＨＣ)のウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)５０ｋＨＣのトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)T-84細胞を通してトランスサイトーシスした５０ｋＨＣ(底部室から回収した。)。
【図１０】極性化したイヌ腎臓上皮細胞培養物中でトランスサイトーシスした５０ｋＨＣフラグメントのウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)５０ｋＨＣのトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)MDCK細胞を通してトランスサイトーシスした５０ｋＨＣ(底部室から回収した。)。

【図１１】極性化した上皮細胞培養物(T-84)中でトランスサイトーシスされたＡｌｅｘａ５６８～ボツリヌス菌毒素タイプＡの蛍光発光スペクトルである。図中：◆＝Ａｌｅｘａ５６８～毒素；■＝インキュベート媒体。
【図１２】極性化したMDCK上皮細胞培養物中でトランスサイトーシスされたＡｌｅｘａ５６８～ボツリヌス菌毒素タイプＡの蛍光発光スペクトルである。図中：◆＝Ａｌｅｘａ５６８～毒素；■＝インキュベート媒体。
【図１３】極性化したT-84上皮細胞培養物中でトランスサイトーシスされたビオチン～５０ｋＨＣのウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)ビオチン～５０ｋＨＣのトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)T-84細胞を通してトランスサイトーシスしたビオチン～５０ｋＨＣ(底部室から回収した。)。
【図１４】極性化したMDCK上皮細胞培養物中でトランスサイトーシスされたビオチン～５０ｋＨＣのウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)ビオチン～５０ｋＨＣのトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)MDCK細胞を通してトランスサイトーシスしたビオチン～５０ｋＨＣ(底部室から回収した。)。
【図１５】極性化したT-84上皮細胞培養物中でトランスサイトーシスされたＧＦＰ～６６ｋＨＣの蛍光発光スペクトルである。図中：●＝ＧＦＰ～６６ｋＨＣ；○＝インキュベート媒体。
【図１６】極性化したMDCK上皮細胞培養物中でトランスサイトーシスされたＧＦＰ～６６ｋＨＣの蛍光発光スペクトルである。図中：●＝ＧＦＰ～６６ｋＨＣ；○＝インキュベート媒体。
【図１７】極性化した上皮細胞培養(T-84)中でトランスサイトーシスされたS-TAG～５０ｋＨＣ結合体のウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)S-TAG～５０ｋＨＣのトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)T-84細胞を通してトランスサイトーシスしたS-TAG～５０ｋＨＣ(底部室から回収した。)。
【図１８】極性化したイヌ腎臓上皮細胞培養物(MDCK)中でトランスサイトーシスされたS-TAG～５０ｋＨＣ結合体のウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)S-TAG～５０ｋＨＣのトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)MDCK細胞を通してトランスサイトーシスしたS-TAG～５０ｋＨＣ(底部室から回収した。)。
【図１９】極性化したT-84上皮細胞培養物中でトランスサイトーシスされたGST～８８ｋＨＣのウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)GST～８８ｋＨＣのトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)T-84細胞を通してトランスサイトーシスしたGST～８８ｋＨＣ(底部室から回収した。)。
【図２０】極性化したMDCK上皮細胞培養物中でトランスサイトーシスされたGST～８８ｋＨＣのウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)GST～８８ｋＨＣのトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)融合MDCK細胞を通してトランスサイトーシスしたGST～８８ｋＨＣフラグメント(底部室から回収した。)。
【図２１】極性化したT-84上皮細胞培養物中でトランスサイトーシスされたGST～６６ｋＨＣのウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)GST～６６ｋＨＣのトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)T-84細胞を通してトランスサイトーシスしたGST～６６ｋＨＣ(底部室から回収した。)。
【図２２】極性化したMDCK上皮細胞培養物中でトランスサイトーシスされたGST～６６ｋＨＣのウェスタンブロットである。線は下記を表す：(Ａ)GST～６６ｋＨＣのトランスサイトーシス前のコントロール。(Ｂ)MDCK細胞を通してトランスサイトーシスしたGST～６６ｋＨＣ(底部室から回収した。)。
【図２３】マウスへの鼻内投与後のボツリヌス菌神経毒セロタイプＡの血液中濃度を示すグラフである。
【図２４】マウスへの鼻内投与後のセロタイプＡＨＣの血液中濃度を示すグラフである。
【図２５】マウスへの鼻内投与後の６×ｈｉｓ－５０ｋＨＣの血液中濃度を示すグラフである。
【図２６】マウスへの鼻内投与後のGST～５０ｋＨＣの血液中濃度を示すグラフである。

【図２７】GST～５０ｋＨＣで鼻内免疫化したマウスから得られた免疫血清でプローブされたGST～５０ｋＨＣフラグメントのウェスタンブロットである。
【図２８】コレラ毒素Ｂサブユニット(CTB)を共投与した、５０ｋＨＣの鼻内投与の強化された免疫反応を示すグラフである。図中：■＝５０ｋＨＣ；□＝５０ｋＨＣ＋CTB
【図２９】マウスへの経口免疫後の１００ｋＤａＨＣへの特定の抗体応答の発達を示す。１００ｋＤａＨＣの第２(ブースター１)、第３(ブースター２)、及び第４(ブースター３)投与の７日後に得られたELISAタイターを示すグラフである。
【図３０】図３０Ａ～３０Ｃで構成される図３０は、種々のセロタイプのボツリヌス菌毒素と関連する、いくつかの１７キロドルトン(１７ｋＤａ)赤血球凝集素(「ＨＡ」)蛋白質のアミノ酸配列の配列である：(１)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA44260、SEQ ID NO：20；(２)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAA75081、SEQ ID NO：21；(３)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号P46083、SEQ ID NO：22；(４)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAA90658、SEQ ID NO：23；(５)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAB71742、SEQ ID NO：24；(６)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAA89710、SEQ ID NO：25；(７)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号S49104、SEQ ID NO：26；(８)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号AAA99056、SEQ ID NO：27；(９)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA70496、SEQ ID NO：28；(１０)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号AAB42188、SEQ ID NO：29；(１１)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA61226、SEQ ID NO：30；(１２)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号B44644、SEQ ID NO：31；(１３)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号AAB21357、SEQ ID NO：32；(１４)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号S67990、SEQ ID NO：33；及び(１５)17kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号AAB21356、SEQ ID NO：34。
【図３１】図３１Ａ～３１Ｄで構成される図３１は、種々のセロタイプのボツリヌス菌毒素と関連する、いくつかの２１キロドルトン(２１ｋＤａ)赤血球凝集素(「ＨＡ」)蛋白質のアミノ酸配列の配列である：(１)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA55717、SEQ ID NO：35；(２)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号S68219、SEQ ID NO：36；(３)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号AAB42190、SEQ ID NO：37；(４)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号S58864、SEQ ID NO：38；(５)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号AAB64349、SEQ ID NO：39；(６)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号S58856、SEQ ID NO：40；(７)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号NB_783832、SEQ ID NO：41；(８)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA07094、SEQ ID NO：42；(９)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA61227、SEQ ID NO：43；(１０)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA73969、SEQ ID NO：44；(１１)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA65350、SEQ ID NO：45；(１２)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA65347、SEQ ID NO：46；(１３)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA65345、SEQ ID NO：47；(１４)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAA90656、SEQ ID NO：48；(１５)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAA89708、SEQ ID NO：49；(１６)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号S46426、SEQ ID NO：50；(１７)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA65346、SEQ ID NO：51；(１８)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAA75074、SEQ ID NO：52；(１９)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAB71744、SEQ ID NO：53；(２０)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAC19890、SEQ ID NO：54；(２１)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号NP_781286、SEQ ID NO：55；(２２)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号JC5340、SEQ ID NO：56；及び(２３)21kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号AAK17956、SEQ ID NO：57。
【図３２】図３２Ａ～３２Ｉで構成される図３２は、種々のセロタイプのボツリヌス菌毒素と関連する、いくつかの３５キロドルトン(３５ｋＤａ)赤血球凝集素(「ＨＡ」)蛋白質のアミノ酸配列の配列である：(１)35kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号AAA99055、SEQ ID NO：58；(２)35kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号S58865、SEQ ID NO：59；(３)35kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA73965、SEQ ID NO：60；(４)35kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号H44644、SEQ ID NO：61；(５)35kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号S58857、SEQ ID NO：62；(６)35kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号AAB42189、SEQ ID NO：63；(７)3

5kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA74632、SEQ ID NO：64；(８)35kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAB71747、SEQ ID NO：65；(９)35kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAA75077、SEQ ID NO：66；(１０)35kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号S46429、SEQ ID NO：67；(１１)35kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号P46084、SEQ ID NO：68；(１２)35kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAA90659、SEQ ID NO：69；(１３)35kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAA89711、SEQ ID NO：70；及び(１４)35kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA61226、SEQ ID NO：71。

【図３３】図３３Ａ～３３Ｊで構成される図３３は、種々のセロタイプのボツリヌス菌毒素と関連する、いくつかの７０キロドルトン(７０ｋＤａ)赤血球凝集素(「ＨＡ」)蛋白質のアミノ酸配列の配列である：(１)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAA89709、SEQ ID NO：72；(２)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAA90657、SEQ ID NO：73；(３)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号AAB42187、SEQ ID NO：74；(４)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号AAM75949、SEQ ID NO：75；(５)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA70495、SEQ ID NO：76；(６)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA73963、SEQ ID NO：77；(７)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA61225、SEQ ID NO：78；(８)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA75931、SEQ ID NO：79；(９)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号QLCLBF、SEQ ID NO：80；(１０)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号AAA72120、SEQ ID NO：81；(１１)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA04327、SEQ ID NO：82；(１２)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号CAA57443、SEQ ID NO：83；(１３)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号AAA99057、SEQ ID NO：84；(１４)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号P01558、SEQ ID NO：85；(１５)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAA07575、SEQ ID NO：170；(１６)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号P46085、SEQ ID NO：171；及び(１７)70kDaHA、商標「GENEBANK」登録番号BAA75075、SEQ ID NO：188。

【図３４】図３４Ａｉ～３４ＡＡｉで構成される図３４は、種々のセロタイプのボツリヌス菌毒素と関連する、いくつかの非毒素、非赤血球凝集素蛋白質(「NTNH」)蛋白質のアミノ酸配列の配列である：(１)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA55073、SEQ ID NO：86；(２)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA73967、SEQ ID NO：87；(３)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA55074、SEQ ID NO：88;(４)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAB64350、SEQ ID NO：89；(５)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA61125、SEQ ID NO：90；(６)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA74634、SEQ ID NO：91；(７)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号S68218、SEQ ID NO：92；(８)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA63550、SEQ ID NO：93；(９)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAB42191、SEQ ID NO：94；(１０)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA61228、SEQ ID NO：95；(１１)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BAA90660、SEQ ID NO：96；(１２)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BAA89712、SEQ ID NO：97；(１３)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BAB71748、SEQ ID NO：98；(１４)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BAA75083、SEQ ID NO：99；(１５)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号S46430、SEQ ID NO：100；(１６)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAB36016、SEQ ID NO：101；(１７)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号P46081、SEQ ID NO：102；(１８)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号JC4901、SEQ ID NO：103；(１９)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BAA12299、SEQ ID NO：104；(２０)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA74630、SEQ ID NO：105；(２１)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA61123、SEQ ID NO：106；(２２)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA67511、SEQ ID NO：107；(２３)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA61233、SEQ ID NO：108；(２４)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAC60474、SEQ ID NO：109；(２５)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号I40644、SEQ ID NO：110；(２６)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA73971、SEQ ID NO：111；(２７)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA72807、SEQ ID NO：112；(２８)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号P46082、SEQ ID NO：113；(２９)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号A47708、SEQ ID NO：114；(３０)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号Q06366、SEQ ID NO：115；(３１)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAM75953、SEQ ID NO：116；(３２)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号I40631、SEQ ID NO：117；(３３)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号P1084

4、SEQ ID NO：118；(３４)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号1EPWA、SEQ ID NO：119；(３５)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BAA75078、SEQ ID NO：120；(３６)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAL11498、SEQ ID NO：121；(３７)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAK97132、SEQ ID NO：122；(３８)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA73968、SEQ ID NO：123；(３９)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号P30995、SEQ ID NO：124；(４０)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BAC05434、SEQ ID NO：125；(４１)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BAB12249、SEQ ID NO：126；(４２)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BAB03512、SEQ ID NO：127；(４３)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号S21178、SEQ ID NO：128；(４４)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号Q00496、SEQ ID NO：129；(４５)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号Q45894、SEQ ID NO：130；(４６)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA65352、SEQ ID NO：131；(４７)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA65348、SEQ ID NO：132；(４８)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAB22656、SEQ ID NO：133；(４９)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA71744、SEQ ID NO：134；(５０)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号A49777、SEQ ID NO：135；(５１)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号P18640、SEQ ID NO：136；(５２)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号1F83A、SEQ ID NO：137；(５３)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号IF82A、SEQ ID NO：138；(５４)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BAA89713、SEQ ID NO：139；(５５)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BAA08418、SEQ ID NO：140；(５６)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号A49928、SEQ ID NO：141；(５７)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BAC22064、SEQ ID NO：142；(５８)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号1906297A、SEQ ID NO：143；(５９)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAC37720、SEQ ID NO：144；(６０)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号NP_783831、SEQ ID NO：145；(６１)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号S39791、SEQ ID NO：146；(６２)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号1906297B、SEQ ID NO：147；(６３)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA37321、SEQ ID NO：148；(６４)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAK72964、SEQ ID NO：149；(６５)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号Q60393、SEQ ID NO：150；(６６)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AA021363、SEQ ID NO：151；(６７)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAA23210、SEQ ID NO：152;(６８)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA61124、SEQ ID NO：153；(６９)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAL66183、SEQ ID NO：154；(７０)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号1717342A、SEQ ID NO：155；(７１)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号S33411、SEQ ID NO：156；(７２)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号3BTAA、SEQ ID NO：157；(７３)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA36289、SEQ ID NO：158；(７４)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号P10845、SEQ ID NO：159；(７５)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BTCLAB、SEQ ID NO：160；(７６)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAD09563、SEQ ID NO：161；(７７)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA73972、SEQ ID NO：162；(７８)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA77991、SEQ ID NO：163；(７９)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAB24244、SEQ ID NO：164；(８０)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BAA90661、SEQ ID NO：165；(８１)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号S70582、SEQ ID NO：166；(８２)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号BAA75084、SEQ ID NO：167；(８３)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号P19321、SEQ ID NO：168；(８４)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号S48110、SEQ ID NO：173；(８５)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号S48109、SEQ ID NO：174；(８６)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA50145、SEQ ID NO：175；(８７)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAA50150、SEQ ID NO：176；(８８)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAA23282、SEQ ID NO：177；(８９)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAG01403、SEQ ID NO：178；(９０)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAA80610、SEQ ID NO：179；(９１)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号1DIWA、SEQ ID NO：180；(９２)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号1FV2A、SEQ ID NO：181；(９３)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号1D0HA、SEQ ID NO：182；(９４)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号1DLLA、SEQ ID NO：183；(９５)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号1AF9、SEQ ID NO：184；(９６)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号1DFQA、SEQ ID NO：185；(９７)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAF73267、SEQ ID NO：186；(９８)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号AAA230209、SEQ ID NO：187；及

び(９９)NTNH、商標「GENEBANK」登録番号CAB43706、SEQ ID NO：188。

```
                1                                                  50
BoNT A          MPFVNKQFNY KDPVNGVDIA YIKIPNAGQM QPV.KAFKIH NKIWVIPERD
BoNT B          MPVTINNFNY NDPIDNDNII MMEPPFARGT GRYYKAFKIT DRIWIIPERY
BoNT C1         MPITINNFNY SDPVDNKNIL YLDTHLNTLA NEPEKAFRIT GNIWVIPDR.
BoNT D          MTWPVKDFNY SDPVNDNDIL YLRIPQNKLI TTPVKGFMIT QNIWVIPER.
BoNT E          MPK.INSFNY NDPVNDRTIL YIK...PGGC QEFYKSFNIM KNIWIIPERN
BoNT F          MPVAINSFNY NDPVNDDTIL YMQIPYEEKS KKYYKAFEIM RNVWIIPERN
BoNT G          MPVNIKNFNY NDPINNDDII MMEPPFNDPG TTYYKDFRII DRIWIVPERF
TeTx            MPITINNFRY SDPVNNDTII MMEPPYCKGL DIYYKAFKIT DRIWIVPERY
Consensus       MP--I--FNY -DPVN---I- --M-------- ----KAF-I- --IWIIPER-

                Figure 1A

                51                                                 100
BoNT A          TFTNFEEGDL NPPPEAKQVP VSYYDSTYLS TDNEKDNYLK GVTKLFERIY
BoNT B          TFGYKPEDFN KSSGIFNRDV CEYYDPDYLN TNDKKNIFFQ TLIKLFNRIK
BoNT C1         .FSRNSNPNL NKPPRVTSPK SGYYDPNYLS TDSDKDTFLK EIIKLFKRIN
BoNT D          .FSSDTNPSL SKPPRPTSKY QSYYDPSYLS TDEQKDTFLK GIIKLFKRIN
BoNT E          VI.GTTPQDF HPPTSLKNGD SSYYDPNYLQ SDEEKDRFLK IVTKIFNRIN
BoNT F          TI.GINPSDF DPPASLKNGS SAYYDPNYLT TDAEKDRYLK TTIKLFKRIN
BoNT G          TYGFQPDQFN ASTGVFSKDV YEYYDPTYLK TDAEKDKFLK TMIKLFNRIN
TeTx            EPGTKPEDFN PPSSLIE.GA SEYYDPNYLR TDSDKDRFLQ TMVKLFNRIK
Consensus       -P-------- ---------- --YYDP-YL- TD-EKD-FLK --IKLF-RI-

                FIGURE 1B
```

```
                201                                                  250
BoNT A          SPDFTFGFEE SLEVDTNPLL GAGKFATDPA VTLAHELIHA EHRLYGIAIN
BoNT B          CPEYVSVFNN VQENKGASIF NRRGYFSDPA LILMHELIHV LHGLYGIK.V
BoNT C1         SPRFMLTYSN ATNDVGEGRF SKSEFCMDPI LILMHELNHA MHNLYGIAIP
BoNT D          APEFLLTFSD VTSNQSSAVL GKSIFCMDPV IALMHELTHS LHQLYGINIP
BoNT E          SPEYSFRFND ......NSM. ..NEFIQDPA LTLMHELIHS LHGLYGAKGI
BoNT F          SPEYEYTFND ISGGHNSST. ..ESFIADPA ISLAHELIHA LHGLYGARGV
BoNT G          CPSCLNVFNN VQENKDTSIF SRRAYFADPA LTLMHELIHV LHGLYGIK.I
TeTX            CPEYVPTFDN VIENITSLTI GKSKYFQDPA LLLMHELIHV LHGLYGMQ.V
Consensus       -PEY---F-- ---------- ----F--DPA --LMHELIH- LH-LYG----
```

FIGURE 1E

```
                101                                                  150
BoNT A          STDLGRMLLT SIVRGIPFWG G..STIDTEL KVIDTNCINV IQPDGSY...
BoNT B          SKPLGEKLLE MIINGIPYLG DRRVPLEEFN TNIASVTVNK LISNPGEVER
BoNT C1         SREIGEELIY RLSTDIPFPG NNNTPINTFD FDVDFNSVDV KTRQGNNWVK
BoNT D          ERDIGKKLIN YLVVGSPFMG DSSTPEDTFD FTRHTTNIAV EKFENGSWKV
BoNT E          NNLSGGILLE ELSKANPYLG NDNTPDNQF. HIGDASAVEI KFSNGSQ...
BoNT F          SNPAGKVLLQ EISYAKPYLG NDHTPIDEFS PVTRTTSVNI KLSTNVE...
BoNT G          SKPSGQRLLD MIVDAIPYLG NASTPPDKFA ANVANVSINK KIIQPGAEDQ
TeTX            NNVAGEALLD KIINAIPYLG NSYSLLDKFD TNSNSVSFNL LEQDPSGATT
Consensus       ----G--LL- ------PYLG ----P-D-F- -------V-- ----------
```

FIGURE 1C

```
                251                                                  300
BoNT A          PNRVFKVNTN A.YYEMSGLE VSFEELRTFG GHDAKFIDSL QENEFRLYYY
BoNT B          DDLPIVPNEK K.FFMQSTDT IQAEELYTFG GQDPSIISPS TDKSIYDKVL
BoNT C1         NDQTISSVTS NIFYSQYNVK LEYAEIYAFG GPTIDLIPKS ARKYFEEKAL
BoNT D          SDKRIRPQVS EGFFSQDGPN VQFEELYTFG GLDVEIIPQI ERSQLREKAL
BoNT E          TTKYTITQKQ N.PLITNIRG TNIEEFLTFG GTDLNIITSA QSNDIYTNLL
BoNT F          TYEETIEVKQ A.PLMIAEKP IRLEEFLTFG GQDLNIITSA MKEKIYNNLL
BoNT G          SNLPITPNTK E.FFMQHSDP VQAEELYTFG GHDPSVISPS TDMNIYNKAL
TeTX            SSHEIIPSKQ E.IYMQHTYP ISAEELFTFG GQDANLISID IKNDLYEKTL
Consensus       ---------- ---------- ---EELYTFG G-D---I--- ---------L
```

FIGURE 1F

```
                151                                                  200
BoNT A          .RSEELNLVI IGPSADIIQF ECKSF..... GHDVLNLTRN GYGSTQYIRF
BoNT B          KKGIFANLII FGPGPVLNEN ETIDIGI... .QNHF.ASRE GFGGIMQMKF
BoNT C1         TGSINPSVII TGPRENIIDP ETSTFKL... .TNNTFAAQE GFGALSIISI
BoNT D          TNIITPSVLI FGPLPNILDY TASLTLQ... .GQQSNPSFE GFGTLSILKV
BoNT E          .DILLPNVII MGAEPDLFET NS....SNIS LRNNYMPSNH GFGSIAIVTF
BoNT F          .SSMLLNLLV LGAGPDIFES CCYPVRKLID PDVVYDPSNY GFGSINIVTF
BoNT G          IKGLMTNLII FGPGPVLSDN FTDSMIM... .NGHS.PISE GFGARMMIRF
TeTX            KSAMLTNLII FGPGPVLNKN EVRGIVLRVD NKNYF.PCRD GFGSIMQMAF
Consensus       ------N-II FGP-P----- ---------- ---------- GFG------F
```

FIGURE 1D

```
           401                                                  450
BoNT A     TIKDGFNLKG ANLSTNFNGQ NTEINSRNFT RLKNFTGL.. .FEFYKLLCV
BoNT B     TIEEGFNISD KNMGKEYRGQ NKAINKQAYE EISKEHLAVY KIQMCKSVKV
BoNT C1    DIQNGFNIPK SNLNVLFMGQ NLSRNP.ALR KVNPENMLYL FTKFCHKAID
BoNT D     TIRDGFNLTN KGFNIENSGQ NIERNP.ALQ KLSSESVVDL FTKVCLRLTK
BoNT E     NISEGYNI.. NNLKVNFRGQ NANLNPRIIT PITGRGL... .........V
BoNT F     TVSEGFNI.. GNLAVNNRGQ SIKLNPKIID SIPDKGL... .........V
BoNT G     TQNEGFNIAS KNLKTEFNGQ NKAVNKEAYE EISLEHLVIY RIAMCKPVMY
TeTX       NDTEGFNIES KDLKSEYKGQ NMRVNTNAFR NVDGSGLVSK LIGLCKKIIP
Consensus  -I-EGFNI-- -NL---F-GQ N---N----- -I----L--- ----C-----
```

FIGURE 1I

```
           301                                                  350
BoNT A     NKFKDVASTL NKA.KSIIGT .TASLQYMKN VFKEKYLLSE DTSGKFSVDK
BoNT B     QNFRGIVDRL NKVLVCISDP .NININIYKN KFKDKYKFVE DSEGKYSIDV
BoNT C1    DYYRSIAKRL NSITTANPSS FNKYIGEYKQ KLIRKYRFVV ESSGEVTVNR
BoNT D     GHYKDIAKRL NNINKTIPSS WISNIDKYKK IFSEKYNFDK DNTGNFVVNI
BoNT E     ADYKKIASKL SKV.QV.SNP .L..LNPYKD VFEAKYGLDK DASGIYSVNI
BoNT F     ANYEKIATRL SEV.NS.APP .EYDINEYKD YFQWKYGLDK NADGSYTVNE
BoNT G     QNFQDIANRL N.IVSSAQGS .GIDISLYKQ IYKNKYDFVE DPNGKYSVDK
TeTX       NDYKAIANKL SQVTSC.NDP .NIDIDSYKQ IYQQKYQFDK DSNGQYIVNE
Consensus  --Y--IA--L --V------- ----I--YK- -F--KY-F-- D--G-Y-V--
```

FIGURE 1G

```
           451                                                  500
BoNT A     RGIIPFKTKS LDEGYNKALN DLCIKVNNWD LFFSPSEDNF TNDLDKVEEI
BoNT B     PGI....... .......... ..CIDVDNEN LFFIADKNSF SDDLSKNERV
BoNT C1    GRSL...... ....YNKTLD CRELLVKNTD LPFIGDISDV KTDIFLRKDI
BoNT D     .......... .....NSRDD STCIKVKNNR LPYVADKDSI SQEIFENKII
BoNT E     KKIIRFCKNI VSVKGIRKS. .ICIEINNGE LFFVASENSY NDDNINTPKE
BoNT F     EKIVKFCKSV IPRKGTKAPP RLCIRVNNSE LFFVASESSY NENDINTPKE
BoNT G     KNTGK..... .........S EQCIIVNNED LFFIANKDSF SKDLAKAETI
TeTX       PTNIRENLYN RTASLTDLGG ELCIKIKNED LTFIAEKNSF SEEPFQDEIV
Consensus  ---------- ---------- --CI-V-N-D L-FIA---SF --D------I
```

FIGURE 1J

```
           351                                                  400
BoNT A     LKFDKLYKML TEIYTEDNFV NFFKVINRKT YLNFD.KAVF RINIVPDENY
BoNT B     ESFNKLYKSL MLGFTEINIA ENYKIKTRAS YFSDSLPPVK IKNLLDNEIY
BoNT C1    NKFVELYNEL TQIFTEFNYA KIYNVQNRKI YLSNVYTPV. TANILDDNVY
BoNT D     DKFNSLYSDL TNVMSEVVYS SQYNVKNRTH YFSRHYLPV. FANILDDNIY
BoNT E     NKFNDIFKKL YS.FTEFDLA TKFQVKCRQT YIGQY.KYFK LSNLLNDSIY
BoNT F     NKFNEIYKKL YS.FTESDLA NKFKVKCRNT YFIKY.EFLK VPNLLDDDIY
BoNT G     DKFDKLYKAL MFGFTETNLA GEYGIKTRYS YFSEYLPPIK TEKLLDNTIY
TeTX       DKFQILYNSI MYGFTEIELG KKFNIKTRLS YFSMNHDPVK IPNLLDDTIY
Consensus  -KF--LY--L ---FTE--L- ----VK-R-- YF------V- --N-LDD-IY
```

FIGURE 1H

```
            601                                                  650
BoNT A      AYTFFSSKYV KKINKAVEAF MFLNWAEELV YDFTDETNEV TTMDKIADIT
BoNT B      VYSFFSMDYI KTANKVVEAG LFAGWVKQIV DDFVIEANKS STMDKIADIS
BoNT C1     VYTYFPT.LA NKVNAGVQGG LFLMWANDVV EDFTTNILRK DTLDKISDVS
BoNT D      IYTFLPS.LA EKVNKGVQAG LFLNWANEVV EDFTTNIMKK DTLDKISDVS
BoNT E      IYTFFSSEFI NNVNKPVQAA LFVSWIQQVL VDFTTEANQK STVDKIADIS
BoNT F      D.IFFSSEFI DTINKPVNAA LFIDWISKVI RDFTTEATQK STVDKIADIS
BoNT G      VYTFFSTNLV EKANTVVGAS LFVNWVKGVI DDFTSESTQK STIDKVSDVS
TeTX        IYSYFP.SVI SKVNQGAQGI LFLQWVRDII DDFTNESSQK TTIDKISDVS
Consensus   -Y-FF---LI --VN--V-A- LF--W---VV -DFT-E---K -T-DKI-D-S
```

FIGURE 1M

```
            501                                                  550
BoNT A      TADTNIEAAE ENISLDLIQQ YYLTFDFDNE PENISIENLS SDIIGQLEPM
BoNT B      EYNTQNNYIG NDFPIN...E LILDTDLISK IELPSENTES LTDF.NVDVP
BoNT C1     NEETEVIYYP DNVSVD...Q VILSKNTSEH GQ.L.DLLYP SIDSESEILP
BoNT D      TDETNVQNYS DNFSLD...E SILDGQVPIN PEIV.DPLLP NVNMEPLNLP
BoNT E      IDDTVTSNNN YENDLD...Q VILNFNSESA PGLSDEKLNL TIQNDAYIPK
BoNT F      IDDTTNLNNN YRNNLD...E VILDYNSQTI PQISNRTLNT LVQDNSYVPR
BoNT G      AYNTQNNTIE NNFSID...Q LILDNDLSSG IDLPNENTEP FTNFDDIDIP
TeTX        SYNTKNKPLN FNYSLD...K IIVDYNLQSK ITLPNDRTTP VTKGIPYAPE
Consensus   ---T------ -----D---- -IL------- ---------- ----------
```

FIGURE 1K

```
            651                                                  700
BoNT A      IIVPYIGPAL NIGNMLSKGE FVEAIIFTGV VAMLEFIPEY ALPVFGTFAI
BoNT B      LIVPYIGLAL NVGDETAKGN FESAFEIAGS SILLEFIPEL LIPVVGVFLL
BoNT C1     AIIPYIGPAL NISNSVRRGN FTEAFAVTGV TILLEAFPEF TIPALGAFVI
BoNT D      VIIPYIGPAL NIGNSALRGN FKQAFATAGV AFLLEGFPEF TIPALGVFTF
BoNT E      IVVPYIGLAL NIGNEAQKGN FKDALELLGA GILLEFEPEL LIPTILVFTI
BoNT F      LIVPYVGLAL NIIIEAEKGN FEEAFELLGV GILLEFVPEL TIPVILVFTI
BoNT G      IIIPYIGPAL NVGNETAKEN FKNAFEIGGA AILMEFIPEL IVPIVGFFTL
TeTX        TIVPYIGPAL NIVKQGYEGN FIGALETTGV VLLLEYIPEI TLPVIAALSI
Consensus   -IVPYIG-AL NI------GN F--AF---G- --LLEF-PEL -IP----F--
```

FIGURE 1N

```
            551                                                  600
BoNT A      PNIERFPNGK KYELDKYTMF HYLRAQEFEH GDSRIILTNS AEEALLKPNV
BoNT B      VYEKQPAIKK VF.TDENTIF QYLYSQTFPL NIRDISLTSS FDDALLVSSK
BoNT C1     GENQVFYDNR TQNVDYLNSY YYLESQKLSD NVEDFTFTRS IEEALDNSAK
BoNT D      GEEIVFYDDI TKYVDYLNSY YYLESQKLSN NVENITLTTS VEEALGYSNK
BoNT E      YDSNGTSDIE QHDVNELNVF FYLDAQKVPE GENNVNLTSS IDTALLEQPK
BoNT F      YDSNGTSEIE EYDVVDFNVF FYLHAQKVPE GETNISLTSS IDTALLEESK
BoNT G      VYIKQSALKK IF.VDGDSLF EYLHAQTFPS NIENLQLTNS LNDALRNNNK
TeTX        YKSNAASTIE IHNIDDNTIY QYLYAQKSPT TLQRITMTNS VDDALINSTK
Consensus   ---------- ---VD----F -YL--Q---- ----I-LT-S -D-AL----K
```

FIGURE 1L

```
            801                                                  850
BoNT A      INSAMININK FLDQCSVSYL MNSMIPYAVK RLKDFDASVR DVLLKYIYDN
BoNT B      INQAMDNIND FINECSVSYL MKKMIPLAVK KLLDFDNTLK KNLLNYIDEN
BoNT C1     ISEAMNNINK FIRECSVTYL FKNMLPKVID ELNEFDRNTK AKLINLIDSH
BoNT D      ISEAMNNINK FIRECSVTYL FKNMLPKVID ELNKFDLRTK TELINLIDSH
BoNT E      VSIAMNNIDR FLTESSISYL MKLINEVKIN KLREYDENVK TYLLNYIIQH
BoNT F      VSLAMKNIER FMTESSISYL MKLINEAKVG KLKKYDNHVK SDLLNYILDH
BoNT G      INLAINNIDD FINQCSISYL MNRMIPLAVK KLKDFDDNLK RDLLEYIDTN
TeTX        ANKAMININI FMRESSRSFL VNQMINEAKK QLLEFDTQSK NILMQYIKAN
Consensus   I--AM-NI-- F--E-SVSYL ---M----V- -L--FD---K --LL-YI---
```

FIGURE 1Q

```
            701                                                  750
BoNT A      VSYIA...NK VLTVQTINNA LSKRNEKWDE VYKYTVTNWL AKVNTQIDLI
BoNT B      ESYID...NK NKIIKTIDNA LTKRVEKWID MYGLIVAQWL STVNTQFYTI
BoNT C1     YSKVQ...ER NEIIKTIDNC LEQRIKRWKD SYEWMMGTWL SRIITQFNNI
BoNT D      YSSIQ...ER EKIIKTIENC LEQRVKRWKD SYQWMVSNWL SRITTQFNHI
BoNT E      KSFLGSSDNK NKVIKAINNA LKERDEKWKE VYSFIVSNWM TKINTQFNKR
BoNT F      KSYIDSYENK NKAIKAINNS LIEREAKWKE IYSWIVSNWL TRINTQFNKR
BoNT G      ESYVG...NK GHIIMTISNA LKKRDQKWTD MYGLIVSQWL STVNTQFYTI
TeTX        AESST...QK EKIIKTIDNF LEKRYEKWIE VYKLVKAKWL GTVNTQFQKR
Consensus   -S-I-----K --IIKTI-N- L--R--KW-- -Y---V--WL ---NTQF---
```

FIGURE 1O

```
            851                                                  900
BoNT A      RGTLV.LQVD RLKDEVNNTL SADIPFQLSK YVDNKKLLST FTEYIKNIVN
BoNT B      KLYL.IGSVE DEKSKVDKYL KTIIPFDLST YSNIEILIKI FNKYNSEILN
BoNT C1     NIIL.VGEVD KLKAKVNNSF QNTIPFNIFS YTNNSLLKDI INEYFNNIND
BoNT D      NIIL.VGEVD RLKAKVNESF ENTMPFNIFS YTNNSLLKDI INEYFNSIND
BoNT E      GSILG.ESQQ ELNSMVTDTL NNSIPFKLSS YTDDKILISY FNKFFKRIKS
BoNT F      RSILG.EQTN ELSDLVTSTL NSSIPFELSS YTNDKILIIY FNRLYKKIKD
BoNT G      ELYL.LDEVN ILKSKVNRHL KDSIPFDLSL YTKDTILIQV FNNYISNISS
TeTX        SKFIGITELK KLESKINKVF STPIPFSYS. .KNLDCWVDN EEDIDVILKK
Consensus    ---L------ -L---V---L ---IPF--S- Y-----L--- -N-Y---I-
```

FIGURE 1R

```
            751                                                  800
BoNT A      REKMKKALEN QAEATKAIIN YQYNQYTEEE KNNI..NFNI DDLSSKLNES
BoNT B      KEGMYKALNY QAQALEEIIK YKYNIYSEEE KSNI..NINF NDINSKLNDG
BoNT C1     SYQMYDSLNY QAGAIKAKID LEYKKYSGSD KENIKS..QV ENLKNSLDVK
BoNT D      NYQMYDSLSY QADAIKAKID LEYKKYSGSD KENIKS..QV ENLKNSLDVK
BoNT E      KEQMYQALQN QVNAIKTIIE SKYNSYTLEE KNELTNKYDI KQIENELNQK
BoNT F      KEQMYQALQN QVDAIKTAIE YKYNNYTSDE KNRLESEYNI NNIEEELNKK
BoNT G      KERMYNALNN QSQAIEKIIE DQYNRYSEED KMNI..NIDF NDIDFKLNQS
TeTX        SYQMYRSLEY QVDAIKKIID YEYKIYSGPD KEQI..ADEI NNLKNKLEEK
Consensus   ---MY--L-- Q--AIK--I- --Y--Y---- K--I-----I ------L---
```

FIGURE 1P

```
                1001                                                1050
BoNT A          NNSGWKVSL. ...NYGEIIW TLQDNKQNIQ RVVFKYSQMV NISDYINRWI
BoNT B          NNSGWK.... ISIRGNRIIW TLIDINGKTK SVFFEYNIRE DISEYINRWF
BoNT C1         NNSGWS.... IGIISNFLVF TLKQNEDSEQ SINFSYDISN NAPGY.NKWF
BoNT D          .NSGWK.... LCIRNGNIEW ILQDVNRKYK SLIFDYSESL SHTGYINKWF
BoNT E          NNSGWKVSL. ...NHNEIIW TLQDNAGINQ KLAFNYGNAN GISDYINKWI
BoNT F          NNSGWKISLR .TVRDCEIIW TLQDTSGNKE NLIFRYEELN RISNYINKWI
BoNT G          NDSGWK.... VSIKGNRIIW TLIDVNAKSK SIFFEYSIKD NISDYINKWF
TeTX            HSLSIGSGWS VSLKGNNLIW TLKDSAGEVR QITFRDLPDK FNAYLANKWV
Consensus       NNSGWK---- -------IIW TL-D------ ---F-Y---- ----Y-NKW-
```

FIGURE 1U

```
                901                                                 950
BoNT A          TSILSIVYKK DDLIDLSRYG AKINIGDRV. YYDSIDKN.Q IKLINLESST
BoNT B          NIILNLRYRD NNLIDLSGYG AKVEVYDGVK L.ND..KN.Q FKLTSSADSK
BoNT C1         SKILSLQNRK NTLVDTSGYN AEVSEEGDVQ LNPIFPFDFK LGSSGEDRGK
BoNT D          SKILSLQNKK NALVDTSGYN AEVRVGDNVQ LNTIYTNDFK LSSSGD...K
BoNT E          SSVLNMRYKN DKYVDTSGYD SNININGDV. YKYPTNKN.Q FGIYNDKLSE
BoNT F          SSILDMRYEN NKFIDISGYG SNISINGNV. YIYSTNRN.Q FGIYNSRLSE
BoNT G          NAILSLSYRG GRLIDSSGYG ATMNVGSDVI F.NDIGNG.Q FKLNNSENSN
TeTX            STILNLDINN DIISDISGFN SSVITYPDAQ LVPGINGK.A IHLVNNESSE
Consensus       --IL-L---- --LID-SGY- --V-----V- L--------- F-------S-
```

FIGURE 1S

```
                1051                                                1100
BoNT A          FVTITNNRLT KSKIYINGRL IDQKPISNLG NIHASNKIMF KLDGCRD...
BoNT B          FVTITNN.LD NAKIYINGTL ESNMDIKDIG EVIVNGEITF KLDGDVD...
BoNT C1         FVTVTNNMMG NMKIYINGKL IDTIKVKELT GINFSKTITF EINKIPDTGL
BoNT D          FVTITNNIMG YMKLYINGEL KQSQKIEDLD EVKLDKTIVF GIDENID...
BoNT E          FVTITNDRLG DSKLYINGNL IDQKSILNLG NIHVSDNILF KIVNCSY...
BoNT F          FVTITNNRLG NSRIYINGNL IVEKSISNLG DIHVSDNILF KIVGCDD...
BoNT G          SITITNDRLG NANIYINGSL KKSEKILNLD RINSSNDIDF KLINCTD...
TeTX            FITITNDRLS SANLYINGVL MGSAEITGLG AIREDNNITL KLDRCNN...
Consensus       FVTITN--L- ----YING-L -----I--L- -I-----I-F K-----D---
```

FIGURE 1V

```
                951                                                 1000
BoNT A          IEVILKNAIV YNSMYENFST SFWIKIPKYF SK.IN..LNN EYTIINCI.E
BoNT B          IRVTQNQNII FNSMFLDFSV SFWIRIPKYR NDDIQNYIHN EYTIINCMK.
BoNT C1         VIVTQNENIV YNSMYESFSI SFWIRINKWV SN.L.....P GYTIIDSVK.
BoNT D          IIVNLNNNIL YSAIYENSSV SFWIKISKDL TNSH.....N EYTIINSIEQ
BoNT E          VNISQNDYII YDNKYKNFSI SFWVRIPNYD NKIVN..VNN EYTIINCMRD
BoNT F          VNIAQNNDII YNSRYQNFSI SFWVRIPK.H YKPMN..HNR EYTIINCMGN
BoNT G          ITAHQSKFVV YDSMFDNFSI NFWVRTPKYN NNDIQTYLQN EYTIISCIK.
TeTX            VIVHKAMDIE YNDMFNNFTV SFWLRVPKVS ASHLEQYGTN EYSIISSMKK
Consensus       --V-----I- Y---Y-NFSI SFWIRIPK-- ---------N EYTII-----
```

FIGURE 1T

```
                1101                                                1150
BoNT A          .....PRRYI MIKYFNLFDK ELNEKEIKDL YDSQSNSGIL KDFWGNYLQY
BoNT B          .....RTQFI WMKYFSIFNT QLNQSNIKEI YKIQSYSEYL KDFWGNPLMY
BoNT C1         ITSDSDNINM WIRDFYIFAK ELDGKDINIL FNSLQYTNVV KDYWGNDLRY
BoNT D          .....ENQML WIRDFNIFSK ELSNEDINIV YEGQILRNVI KDYWGNPLKF
BoNT E          .....T.RYI GIRYFNIFDK ELDETEIQTL YSNEPNTNIL KDFWGNYLLY
BoNT F          .....E.TYV GIRYFKVFNT ELDKTEIETL YSNEPDPSIL KNYWGNYLLY
BoNT G          .....TTKFV WIKDFNIFGR ELNATEVSSL YWIQSSTNTL KDFWGNPLRY
TeTX      .....    NNQYV SIDKFRIFCK ALNPKEIEKL YTSYLSITFL RDFWGNPLRY
Consensus       --------Y- -I--F-IF-- EL---EI--L Y---------L KDFWGN-L-Y
```

FIGURE 1W

```
                1151                                                1200
BoNT A          DKPYYMLNLF DPNKYVDV.N NIGIRGYMYL KGPRGSVVTT NIYLNSTLYE
BoNT B          NKEYYMFNAG NKNSYIKLVK DSSVGEILIR SKYNQNSNYI NYRNLYIGEK
BoNT C1         NKEYYMVNID YLNRYMYANS RQIVFNTRRN NNDFNEGYKI IIKRIRGNTN
BoNT D          DTEYYIINDN YIDRYIAPES NVLVLVRYPD RSKLYTGNPI TIKSVSDKNP
BoNT E          DKEYYLLNVL KPNNFIDR.R KDSTLSINN. ..IRSTILLA NRLYSGIKVK
BoNT F          NKKYYLFNLL RKDKYITL.N SGILNINQQR GVTEGSVFLN YKLYEGVEVI
BoNT G          DTQYYLFNQG MQNIYIKYFS KASMGETAPR TNFNNAA..I NYQNLYLGLR
TeTX            DTEYYLIPVA SSSKDVQLKN ITDYMYLTNA PSYTNGKLNI YYRRLYNGLK
Consensus       ---YYL-N-- ----YI---- ---------- ---------- ----------
```

FIGURE 1X

```
                1201                                                1250
BoNT A          GTKFIIKKYA .....SGNE DNIVRNNDRV YINVVV.KNK EYRLATNASQ
BoNT B          FIIRRESNSQ .....SI.N DDIVRKEDYI HLDLV.LHHE EWRVYAY..K
BoNT C1         DTRVRGGDIL YFDMTINNKA YNLFMKNETM YA.DNHSTED IYAIGLREQT
BoNT D          YSRILNGDNI ILHMLYNSRK YMIIRDTDTI YATQGGECSQ NCVYALKLQS
BoNT E          IQR..VN..N .....SSTN DNLVRKNDQV YINFVASKTH LFPLYADTAT
BoNT F          IRK..NGPID .....ISNT DNFVRKNDLA YINVVD.RGV EYRLYADT.K
BoNT G          FIIKKASNSR .....NINN DNIVREGDYI YLNIDNISDE SYRVYVL..V
TeTX            FIIKRYTPNN .....EI.. DSFVKSGDFI KLYVSYNNNE HIVGYPKDGN
Consensus       ---------- ---------- D--VR--D-I Y--------- -Y--------
```

FIGURE 1Y

```
                1251                                                1300
BoNT A          AGVE...KIL SALEIPDVGN LSQVVVMKSK DDQGIRNKCK MNLQDNNGND
BoNT B          YFKEQEEKLF LSIISDSNEF YKTIEIKEYD EQPSYSCQLL FKKDEESTDD
BoNT C1         KDINDNI.IF QIQPMNNTYY YASQIFKSNF NGENISGICS IGTYRFRLGG
BoNT D          NLGNYGIGIF SIKNIVSKNK YCSQIF.SSF RENTMLLADI YKPWRFSFKN
BoNT E          TNKE...KTI KISSSGN..R FNQVVVMNS. ....VGNNCT MNFKNNNGNN
BoNT F          SEKE...KII RTSNLND..S LGQIIVMDS. ....IGNNCT MNFQNNNGSN
BoNT G          NSKEIQTQLF LAPINDDPTF YDVLQIKKYY EKTTYNCQIL CEKDTKTFGL
TeTX            AFNNLDRILR VGYNAPGIPL YKKMEAVKLR DLKTYSVQLK LYDDKN....
Consensus       ---------- ---------- Y--------- ---------- ----------
```

FIGURE 1Z

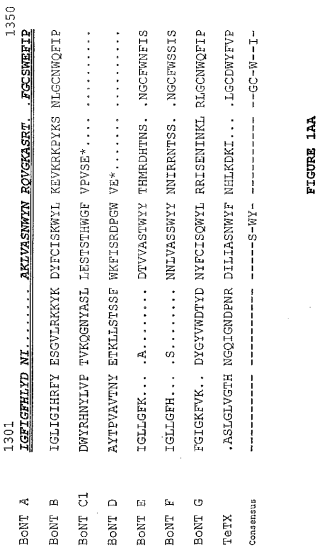


FIGURE 1AA

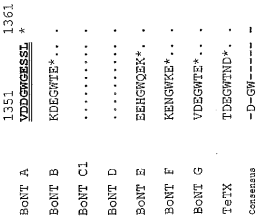
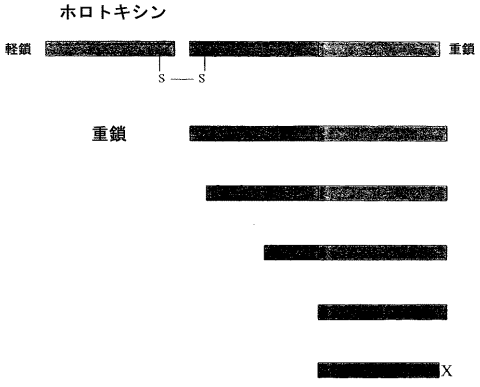
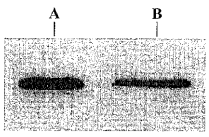


FIGURE 1AB

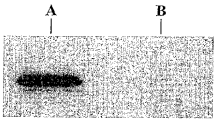
【図２】



【図３】
Figure 3



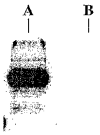
【図４】
Figure 4



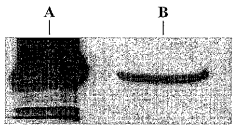
【図５】
Figure 5



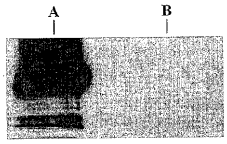
【図６】
Figure 6



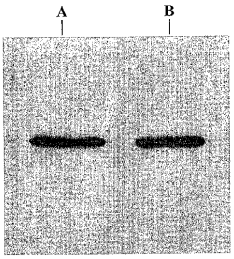
【図７】
Figure 7



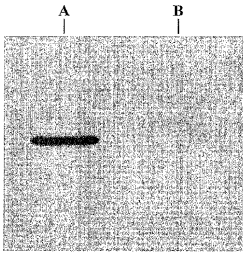
【図８】
Figure 8



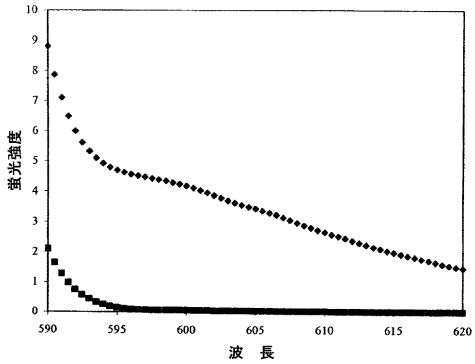
【図９】
Figure 9



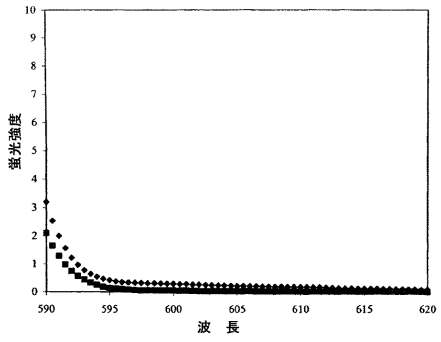
【図１０】
Figure 10



【図１１】



【図１２】



【図１３】

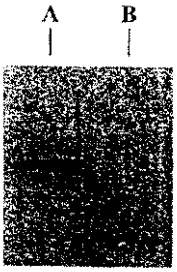


抗重鎖抗体で
プローブした

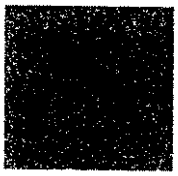


ストレプトアビジン－ＨＲＰ
でプローブした

【図１４】

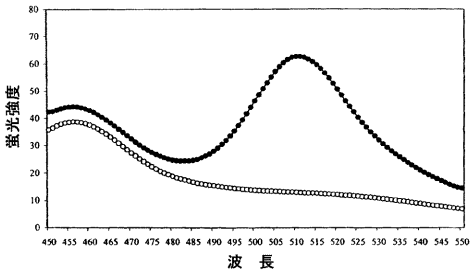


抗重鎖抗体で
プローブした

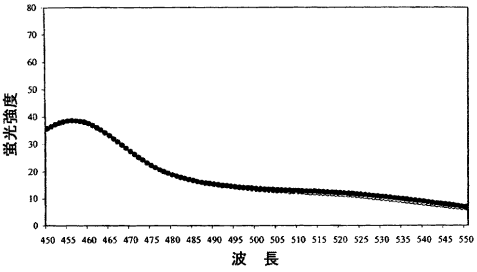


ストレプトアビジン－ＨＲＰ
でプローブした

【図１５】

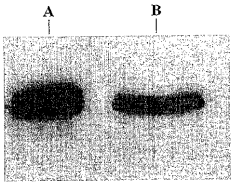


【図１６】



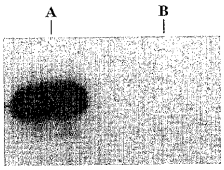
【図１７】

Figure 17

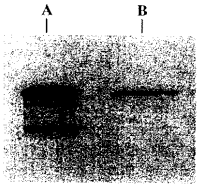


【図１８】

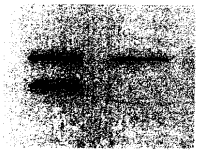
Figure 18



【図１９】

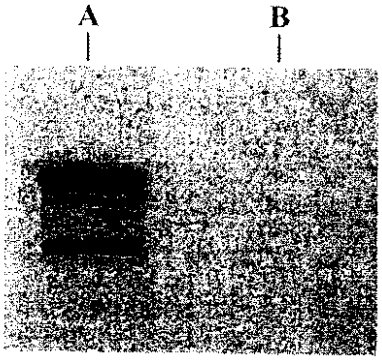


抗重鎖抗体で
プローブした

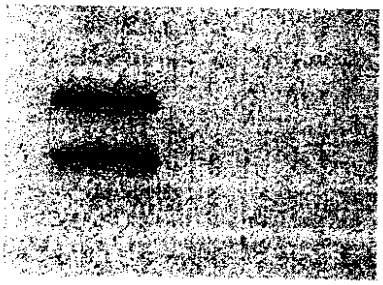


抗ＧＳＴ抗体で
プローブした

【図２０】

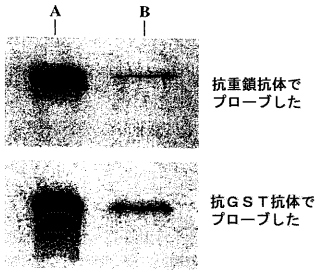


抗重鎖抗体で
プローブした

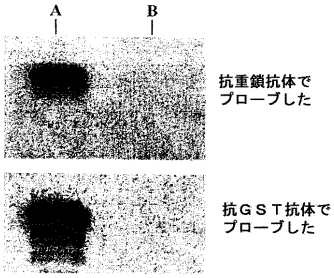


抗ＧＳＴ抗体で
プローブした

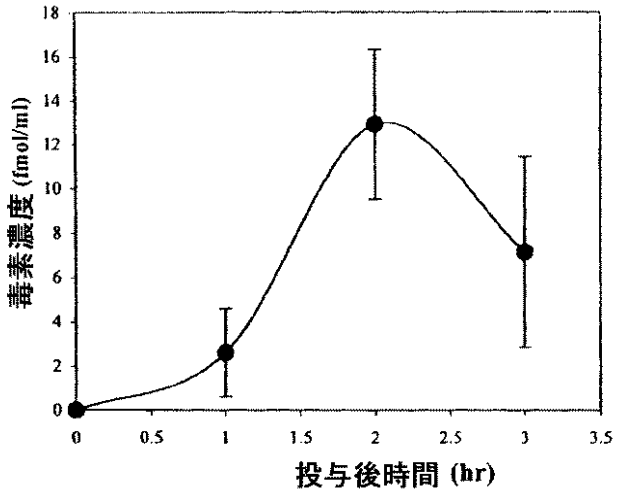
【図２１】



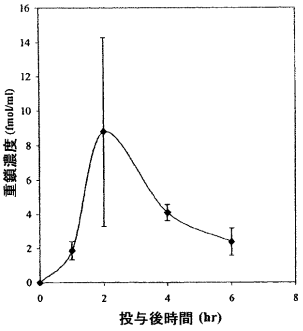
【図２２】



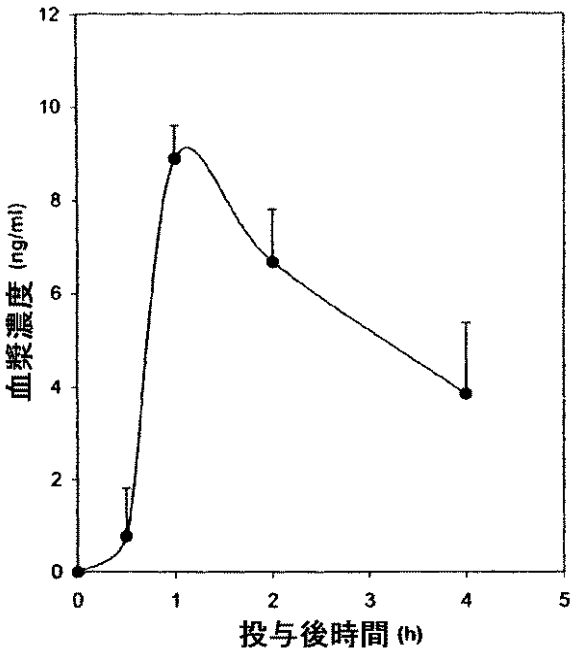
【図２３】



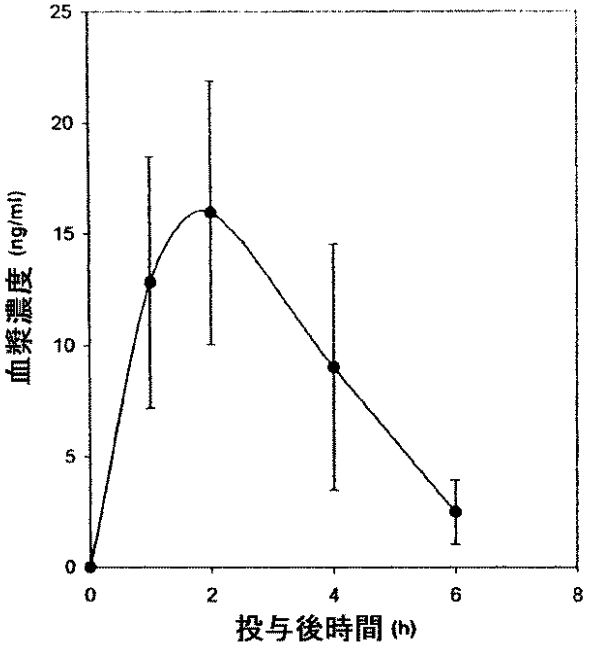
【図２４】



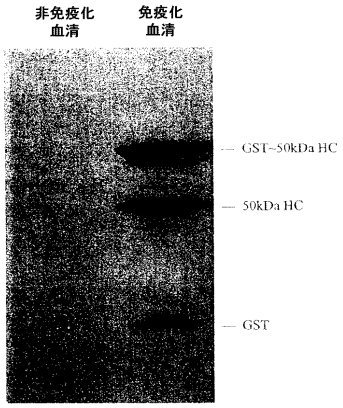
【図２５】



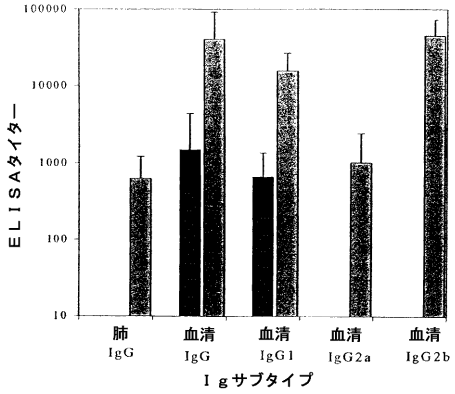
【図２６】



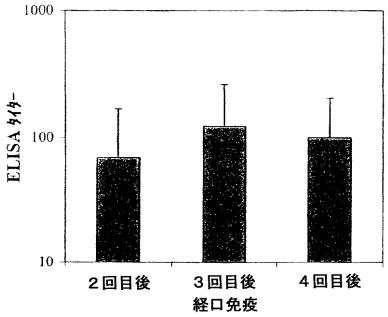
【図２７】



【図２８】



【図２９】



Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C	CAA44260	1	MSSERTFLPNGNYKIKSLFSDSLDLYTYSSGALSFSNTSSLDNQKWKLEYISSSNGFRFSN	60
D	BAA75081	1	MSSERTFLPNGNYKIKSLFSDSLDLYTYSSGALSFPNTSSLDNQKWKLEYISSSNGFRFSN	60
C	P46083	1	MSSERTFLPNGNYKIKSLFSDSLDLYTYSSGALSFSNTPSLDNQKWKLEYISSSNGFRFSN	60
D	BAA90658	1	MSSERTFLPNGNYKIKSLFSDSLDLYTYSSGSLSFLNTSSLDNQKWKLEYISSSNGFRFSN	60
C	BAB71746	1	MSSERTFLPNGNYKIKSLFSNSLDLYTYSSGALSFSNTSSLDNQKWKLEYISSSNGFRFSN	60
C	BAA89710	1	MSSERTFLPNGNYKIKSLFSNTSGLDNQKWKLEYISSSNGFRFSN	60
-	S49104	1	MSSERTFLPNGNYKIKSLFSDSLDLYTYSSGALSFSNTSSLDNQKWKLEYISSSNGFRFSN	60
B	AAA99056	1	MSAERTFLPNGNYNIKSIFSGSLDLYLSFVSGSLTFSNESSANNQKWNVEYMAENRCFKISN	60
B	CAA70496	13	MSVERTFLPDGNYNIKSIFSGSLDLYLNFVSGSLTFSSESSANNQKWNVEYMAKNRCFKISN	72
-	AAB42188	1	MSVERTFLPNGNYNIKSIFSGSLDLYLNFVSKSLTFSNESSANNQKWNVEYMAENRCFKISN	60
G	CAA61226	1	MTAERTFLPHGNYKIKSIFSDSLDLYLTPLSEITTFLNTVSENNQKWKLQYVEEKNAYKISN	60
B	B44644	1	SAERTFLPNGNYNIKSIFSGSLDLYLSFVSGNLTF	33
B	AAB21357	1	SAERTFLPNGNYNIKVIKKGSLDLYLSFVSGNLTF	33
A	S67990	1	SVERTFLPNGNYNIKSIFS	19
A	AAB21356	1	SVERTFLPNGNYNIKSIFS	19

Fig.30A

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C	CAA44260	61	VAEPNKYLAYNDYGFIY----XXXXXXXXXWNPIKTAINSYTICTLSIVNVTDYAWTIYD	116
D	BAA75081	61	VAEPNKYLAYNDYGFIY----LSSSSNNNSLWNPIKTAINSYIICTLSIVNVTDYAWTIYD	116
C	P46083	61	VAEPNKYLAYNDYGFIY----LSSSSNNSLWNPIKTAINSYIICTLSIVNVTDYAWTIYD	116
D	BAA90658	61	VAEPNKYLAYNDYGFIY----LSSSSNNSLWNPIKTAINSYIICTLSIVNVTDYAWTIYD	116
C	BAB71746	61	VAEPNKYLAYNDYGFIY----LSSSSNNSLWNPIKTAINSYIICTLSIVNVTDYAWTIYD	116
C	BAA89710	61	VAESNKYLAYNDYGFIY----LSSSSNNSLWNPIKTAINSYIICTLSIVNVTDYAWTIYD	116
-	S49104	61	VAEPNKYLAYNDYGFIY----LSSSSNNSLWNPIKTAINSYIICTLSIVNVTDYAWTIYD	116
B	AAA99056	61	VAEPNKYLSYDNFGFIS----LDSLSNRCYWFPIKTAVNTYIMLSLNKVNELDYAWDIYD	116
B	CAA70496	73	VAEPNKYLSYDNFGFIS----LDSLSNRCYWFPIKTAVNTYIMLNLNKVNELDYAWDIYD	128
-	AAB42188	61	VAEPNKYLSYDNFGFIS----LDSLSNRCYWFEIKTAVNTYIMLSLNKVNELDYAWDIYD	116
G	CAA61226	61	IAQPDKYLTYNSSQFIVLKNIGDSTALENIYWIFPYKIASNTYIITNLG--KEYDKAWDIYD	117

Fig.30B

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
A	CAA55717	58	LSNFNTQND--LERYISRTLKRYCLDICNKRKIDKKIIYNSEIVDKKLSLIANSYSSYLE	115
A/B	S68219	58	LSNFNTQND--LERYISRTLKRYCLDICNKRKIDKKIIYNSEIVDKKLSLIANSYSSYLE	115
A/B	AAB42190	58	LSNFNTQND--LERYISRTLKRYCLDICNKRKIDKKIIYNSEIADKKLSLIANSYSSYSE	115
A/B	S58864	58	LSNFNTQND--LERYISRTLKRYCLDICNKRKIDKKIIYNSEIADKKLSLIANSYSSYSE	115
B	AAB64349	58	LSNFNTQND--LERYISRTLKRYCLDICNKRKIDKKIIYNSEIADKKLSLIANSYSSYSE	115
A/B	S58846	58	LSNFNTQND--LERYISRTLKRYCLDICNKRKIDKKIIYNSEIVGEKLRLIANSYSSYSE	115
C	NP 783832	58	LNKFNTEND--LHKYISRSLKRYCLDICNKKNRDKKIIYNSEITNIKLNLMENSCSNYLN	115
Tet	CAA07094	60	LNKFNTEND--LHKYISRSLKRYCLDICNKKNRDKKIIYNSEITNIKLNLMENSCSNYLN	117
G	CAA61227	61	LNKFNTEYD--LEKYISTSLKRYCIDICNKKNRNERVIYNSEFVDINLSLIEHSFSNDLE	118
B/F	CAA73969	58	LNKFNTEND--LNKYISKCLKRYCLSICTKKNRDKKIIYNSEITDINLNLIQDNCFSDIE	115
A/B/F	CAA65350	58	LNKFNTEND--LNKYISKCLKRYCLSICMKKNRDKKIIYNSEITNINLNLIQDNCFNDIE	115
A/B/F	CAA65347	58	LNKFNTEND--LNKYISKCLKRYCLSICMKKNRDKKIIYNSEITDINLNLIQDSCFNDIE	115
A/B/F	CAA65345	15	LNKFNTEND--LNKYISKCLKRYCLSICMKKNRDKKIIYNSEITDINLNLIQDSCFNDIE	72
D	BAA90656	59	LKNFNSELD--LRKYISTSIKRYCINICKKKNRDKKIIYNSEATYKKLEAV-NVYSLYCE	115
C	BAA89708	59	LKNFNSELD--LRKYISTSIKRYCINICKKKNRDKKIIYNSEVTYKKLDAV-NVYSLYCD	115
C	S464260	59	LKNFNSELD--LRKYISTSIKRYCINICKKKNRDKKIIYNSEVTYKKLDAV-NVYSLYCD	115
A/B/F	CAA65346	15	LNKFNTEND--LNKYISKCLKRYCLSICMKKNRDKKIIYNSEITDINLNLIQDNCFNDIE	72
D	BAA75074	59	LKNFNSELD--LRKYISTSIKRYCINICKKKNRDKKIIYNSEVTYKKLDAV-NVYSLYCD	115
C	BAB71744	59	LKNFNSELD--LRKYISTSIKRYCINICKKKNRDKKIIYNSEVTYKKLDAV-NVYSLYCD	115
D*	CAC19890	60	LSSFSEKSDAIIVKYIHKSLLNKTFELSRRY---SKMKFNFVEFDENILNLKNNYQNKFV	116
Tet	NP 781286	67	IKSLNNPKC--FKAWFTKCLINNCYKIL---KNNKKIILLDEIEDKKY-----SKDEFYL	116
D*	JC5340	60	LSSFSEKSDAIIVKYIHKSLLNKTFELSRRY---SKMKFNFVEFDENILNMKNNYQSKSV	116

Fig. 31B

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C	CA44260	117	NNNNITDQPILNLPNFDINNSNQILKLEKL	146
D	BAA75081	117	NNNNITDQPILNLPNFDINNSNQILKLEKL	146
C	P46083	117	NNNNITDQPILNLPNFDINNSNQILKLEKL	146
D	BAA90658	117	NNNNITDQPILNLPNFDINNSNQILKLEKL	146
C	BAB71746	117	NNNNITDQPILNLPNFDINNSNQILKLEKL	146
C	BAA89710	117	NNNNITDQPILNLPNFDINNSNQILKLEKL	146
-	S49104	117	NNNNITD	123
B	AAA99056	117	TNENILSQPLLLLPNFDIYNSNQMFKLEKI	146
B	CAA70496	129	TNENILSQPLLLLPNFDIYNSNQMLKLEKI	158
-	AAB42188	117	TNENILSQPLLLLPNFDIYNSNQMFKLEKI	146
G	CAA61226	118	LNGDISDQPLLLQQLFYYEKSNQMFIFEKI	147

Fig.30C

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
A	CAA55717	116	-FE-----FNDLISILPDDQKKIIYMKFVEDIKEIDIAKKLNISRQSVYKNKIMALERLE	169
A/B	S68219	116	-FE-----FNDLISILPDDQKKIIYMKFVEDIKEIDIAKKLNISRQSVYKNKIMALERLE	169
A/B	AAB42190	116	-FE-----FNDLISILPDDQKKIIYMKFVEDIKEIDIAKKLNISRQSVYKNKIMALERLE	169
A/B	S58864	116	-FE-----FNDLISILPDDQKKIIYMKFVEDIKEIDIAKKLNISRQSVYKNKIMALERLE	169
B	AAB64349	116	-FE-----FNDLISILPDDQKKIIYMKFVEDIKEIDIAKKLNISRQSVYKNKIMALERLE	169
A/B	S58846	116	-VE-----FNDLISILPDDQKKIIYMKFVEDIKEIDIAKKLNISRQSVYKNKIMALGRLK	169
C	NP 783832	116	-FE-----FNDLISILPENQRKILYMKFFEDMKECDIAKKLHMSRQAVYKNKVLALKKLE	169
Tet	CAA07094	118	-FE-----FNDLISILPENQRKILYMKFFEYMKECDIA-KLHMSRQAVYKNKVLALKKLE	170
G	CAA61227	119	-FE-----FNDLISILPNSQRKIIYMRFFNNMKEVDIAEELNISRQAVYKSKNLALKKLE	172
B/F	CAA73969	116	-FE-----FKDLISILPNNQKNIIYMKFFKDMKDIEIAKKLKISRQSIYK	159
A/B/F	CAA65350	116	-FE-----FKDLISILPNTQKNIIYMKFFKDMKDIQIAKKLKISRQSVYK	159
A/B/F	CAA65347	116	-FE-----FKDLISILPNTQQNIIYMKFFKDMKDIDIAKKLKISRQSVYK	159
A/B/F	CAA65345	73	-FE-----FKDLISILPNTQQNIIYMKFFKDMKDIDIAKKLKISRQSIYK	116
D	BAA90656	116	DFE-----FLDLISILNYKEKQIIYMKFFECRKDNEIARRLHLSRQSIYKIRIKSLKKLY	170
C	BAA89708	116	NFE-----FLDLISILNYKEKQIIYMKFFECRKDNEIARRLHLSRQSIYKIRIKSLKKLY	170
C	S464260	116	NFE-----FLDLISILNYKEKQIIYMKFFEGRKDNEIAIRLRLSRQSIYKIRITSLKKLY	170
A/B/F	CAA65346	73	-FE-----FKDLISILPNTQQNIIYMKFFKDMKDIEIAKKLKISRQSIYK	116
D	BAA75074	116	NFE-----FLDLISILNYKEKQIIYMKFFEGRKDNEIAIRLRLSRQSIYKIRIKSLKKLY	170
C	BAB71744	116	NFE-----FLDLISILNYKEKQIIYMKFFEGRKDNEIAIRLRLSRQSIYKIRIKSLKKLY	170
A	BAA24888	1	KDMKDIDIAKKLKISRQSVYKNKNLALEKLK	31
F	BAA24891	1	KDMKDIQIAKKLKISRQSVYKNKNLALEKLK	31
D*	CAC19890	117	-FEEDICFFEYILKELSGIQRKVIFYKYLKGYSDREISVKLKISRQAVNKAKNRAFKKIK	175
Tet	NP 781286	117	-VE-----LNHLLSTLDEDLKTVIFLYYFEDLSVKDISNAINVKEGTVKSRLHRARTKLY	170
D*	JC5340	117	-FEEDICFFEYILKELSGIQRKVIFYKYLKGYSDREISVKLKISRQAVNKAKNRAFKKIK	175
-**	AAK17956	88	LSEKKRNIILLHYFMDMSDVEIAELLNLNRSTVYRHRISGLAMIK	132

Fig. 31C

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
A	CAA55717	1	MNKLFLQIKMLKNDNR--EFQEIFKHFEKTINIFT-RKXXXXXXXXXXLYHLWYTLKKVD	57
A/B	S68219	1	MNKLFLQIKMLKNDNR--EFQEIFKHFEKTINIFT-RKYNIYDNYNDILYHLWYTLKKVD	57
A/B	AAB42190	1	MNKLFLQIKMLKNDNE--EFQEIFKHFEKTINIFT-RKYNIYDNYNDILYHLWYTLKKVD	57
A/B	S58864	1	MNKLFLQIEMLKNDNE--EFQEIFKHFEKTINIFT-RKYNIYDNYNDILYHLWYTLKKVD	57
B	AAB64349	1	MNKLFLQIEMLKSDNE--EFQEIFKHFEKTINIFT-RKYNIYDNYNDILYHLWYTLKKVD	57
A/B	S58846	1	MNKLFLQIKRLKNDNR--EFQEIFKNFEKTIDIFT-RKYNIYDNYNDILYHLWYTLKKVD	57
C	NP 783832	1	MENLFVKIKTLKNNNK--EFEVIIIHFKNTVNILI-RKYNLESHYNDILYHLWNILKKID	57
Tet	CAA07094	3	MENLFVKIKTLKNNNK--EFEVIIIHFKNTVNILI-RKYNLESHYNDILYHLWNILKKID	59
G	CAA61227	4	MKDIFLHVKTLKNNNT--EFEEIYRNFENFIDMLT-RKYDVEKDYNDIVSHLWIILKKTD	60
B/F	CAA73969	1	MENLFFIIKILKDDNK--KFEDIYTNYKNLIDIFI-KKYNLSENYNDILNHFWIILKKAD	57
A/B/F	CAA65350	1	MEDLFFIIKILKDDNK--KFEDIYTNYKNLIDIFI-KKYNLSENYNDILNHFWIILKKAD	57
A/B/F	CAA65347	1	MKNLFFLMNTLKDDNK--KFEDIYMNYKDLIDIFI-KKYNLSENYNDILKHFWIILIKAD	57
A/B/F	CAA65345	5	HLWIILIKAD	14
D	BAA90656	1	MNDLFYAIENLKHDNQ--HFDFIEMSLKKYIEKTSKKYNLYYDYYNDILYHLWKELIEIN	58
C	BAA89708	1	MNDLFYAIENLKHDNQ--HFNFIEMSLKKYIEKTSKKYNLYYDYYNDILYHLWKELIEIN	58
C	S464260	1	MNDLFYAIENLKHDNQ--HFNFIEMSLKKYIEKTSKKYNLYYDYYNDILYHLWKELIEIN	58
A/B/F	CAA65346	5	HLWIILIKAD	14
D	BAA75074	1	MNDLFYAIENLKHDNQ--HFNFIEMSLKKYIEKTSKKYNLYYDYYNDILYHLWKELIEIN	58
C	BAB71744	1	MNDLFYAIENLKHDNQ--NFNFIEMSLKKYIEKTSKKYNLYYDYYNDILYHLWKELIEIN	58
D*	CAC19890	1	MQKSFYELIVLARNNSVDDLQEILFMFKPLIKKLS-RVLHYEEGETDLIIFFIELIKNIK	59
Tet	NP 781286	27	FVKLIRHYEKYFYVVS-KSILDKDEDCADAIQETILNCYKN	66
D*	JC5340	1	MQKSFYELIVLARNNSVDDLQEILFMFKPLVKKLS-RVLHYEEGETDLIIFFIELIKNIK	59

Fig. 31A

Toxin Sero-Type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	AAA99055	61	YKIKSMNIYNTNLVLTWNAP--THNISALQ-DSNA--DNQYWLLLKDIGNNSFIIASYKN	115
B	S58865	61	YKIKSMNIYNTNLVLTWNAP--THNISAQQ-DSNA--DNQYWLLLKDIGNNSFIIASYKN	115
B/F	CAA73965	59	YKIKSMDIHNTNLVLTWNAP--THNISTQQ-DSNA--DNQYWLLLKDIGNNSFIIASYKN	113
A	H44644	59	YKIKSMDIHNTNLVLTWNAP--THNISTQQ-DSNA--DNQYWLLLKDIGNNSFIIASYKN	113
B	S58857	59	YKIKSMDSHNTNLVLTWNAP--THNISAQQ-DSNA--DNQYWLLLKDIGSNSFIIASYKN	113
-	AAB42189	59	YKIKSMDIHNTNLVLTWNAP--THNISTQQ-DSNA--DNQYWLLLKDIGNNSFIIASYKN	113
A(B)	CAA74632	59	YKIKSMDIHNTNLVLTWNAP--THNISTQQ-DSNA--DNQYWLLLKDIGNNSFIIASYKN	113
C	BAB71747	59	YKIKVMD--NTSLILTWNAP--LSSVSVKT-DTNG--DNQYWYLLQNYISRNVIIRNYMN	111
D	BAA75077	64	YKIKVMD--NTSLILTWNAP--LSSVSVKT-DTNG--DNQYWYLLQNYISRNVIIRNYMN	116
C	S46429	59	YKIKVMD--NTSLILTWNAP--LSSVSVKT-DTNG--DNQYWYLLQNYISRNVIIRNYMN	111
C	P460844	58	YKIKVMD--NTSLILTWNAP--LSSVSVKT-DTNG--DNQYWYLLQNYISRNVIIRNYMN	110
D	BAA90659	59	YTIKVMD--NTSLILTWDAP--LSSVSVKT-DTNT--NNQYWYLLQDYISRNVILRNYMN	111
C	BAA89711	59	YKIKVMD--NTSLILTWDAP--LSSVSVKT-DTNT--NNQYWYLLQDYISRNVILRNYMN	111

Fig. 32B

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
A	CAA55717	170	PILKKLINM	178
A/B	S68219	170	PILKKLINM	178
A/B	AAB42190	170	PILKKLINM	178
A/B	S58864	170	PILKKLINM	178
B	AAB64349	170	PILKKLINM	178
A/B	S58846	170	PIL	172
C	NP 783832	170	PIVNKLINI	178
Tet	CAA07094	171	PIVNKLINI	179
G	CAA61227	173	SVIKELINI	181
D	BAA90656	171	PIVMQLVNI	179
C	BAA89709	171	PIVMQLVNI	179
C	S464260	171	PIVMQLVNI	179
D	BAA75074	171	PIVMQLVNI	179
C	BAB71744	171	PIVMQLVNI	179
A	BAA24888	32	PILKELINI	40
F	BAA24891	32	PILKELINI	40
D*	CAC19890	176	KDYENYFNL	184
Tet	NP 781286	171	DILRK	175
D*	JC5340	176	KDYENYFNL	184
-**	AAK17956	133	EFMKE	137

Fig. 31D

Toxin Sero-Type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	AAA99055	116	PNLVL----YADTVARNLKLSTLNNSSYIKFIIEDYVISDFKNFTCRISPILAG------	165
B	S58865	116	PNLVL----YADTVARNLKLSTLNNSSYIKFIIEDYVISDFKNFTCRISPILAG------	165
B/F	CAA73965	114	PNLVL----YADTVARNLKLSTLNNSNYIKFIIEDYIISDFNNFTCKISPILDR------	163
A	H44644	114	PNLVL----YADTVARNLKLSTLNNSNYIKFIIEDYIISDLNNFTCKISPILDL------	163
B	S58857	114	PNLVL----YADTVARNLKLSTLNNSSYIKFIIEDYMISDFNNFTCKISPILDS------	163
-	AAB42189	114	PNLVL----YADTVARNLKLSTLNNSNYIKFIIEDYIISDLNNFTCKISPILDR------	163
A(B)	CAA74632	114	PNLVL----YADTVARNLKLSTLNNSNYIKFIIEDYIISDLNNFTCKISPILDR------	163
C	BAB71747	112	PNLVL----QYN-IDDTLMVSTQTSSSNQFFKFSNCIYESFNNSTCKIQTSLTI------	160
4 D	BAA75077	117	PNLVL----QYN-IDDTLMVSTQTSSSNQFFKFSNCIYEALNNRNCKLQTQLNS------	165
C	S46429	112	PNLVL----QYN-IDDTLMVSTQTSSSNQFFKFSNCIYEALNNRNCKLQTQLNS------	160
C	P460844	111	PNLVL----QYN-IDDTLMVSTQTSSSNQFFKFSNCIYEALNNRNCKLQTQLNS------	159
D	BAA90659	112	PNLVL----QYNT-DDTLIVSTQTNSNNQFFKFSNCIYEALNNRNCKLQTQLNS------	160
C	BAA89711	112	PNLVL----QYNT-DDTLIVSTQTSSNNQFFKFSNCIYEALNNRNCKLQTQLNS------	160

Fig. 32C

Toxin Sero-Type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	AAA99055	1	MEHYSTIQNSLNDKIVTISCKANTDLFFYQVPGNGNVSLFQQTRNYLERWRIIYDSNKAA	60
B	S58865	1	MEHYSTIQNSLNDKIVTISCKANTDLFFYQVPGNGNVSLFQQTRNYLERWRIIYDSNKAA	60
B/F	CAA73965	1	MEHYSVIQNSLNDKIVTISCRADTNLFFYQVA--GNVSLFQQTRNYLERWRIIYDSNKAA	58
A	H44644	1	MEHYSVIQNSLNDKIVTISCKADTNLFFYQVA--GNVSLFQQTRNYLERWRLIYDSNKAA	58
B	S58857	1	MEHYSVIQNSLNDEIVTISCKADTNLFFYQTV--GNVSLFQQTRNYLERWRLIYDANKAA	58
-	AAB42189	1	MEHYSVIQNSLNDKIVTISCKADTNLFFYQVA--GNVSLFQQTRNYLERWRLIYDSNKAA	58
A(B)	CAA74632	1	MEHYSVIQNSLNDKIVTISCKADTNLFFYQVA--GNVSLFQQTRNYLERWRLIYDSNKAA	58
C	BAB71747	11	NNEVFFISPSNNTNKVLDKI-SQSEVKLWNKLSGANQKWRLIYDTNKQA	58
D	BAA75077	16	NNEVFFISPSNNTNKVLDKI-SQSEVKLWNKLSGANQKWRLIYDTNKQA	63
C	S46429	11	NNEVFFISPSNNTNKVLDKI-SQSEVKLWNKLSGANQKWRLIYDTNKQA	58
C	P460844	10	NNEVFFISPSNNTNKVLDKI-SQSEVKLWNKLSGANQKWRLIYDTNKQA	57
D	BAA90659	11	NNEVFFISPSNNTNKVLDKI-SQSEVKLWNKLSGANQKWRLIYDTNKQA	58
C	BAA89711	11	NNEVFFISPSNSTNKVLDKI-SQSEVKLWSKNLGSNQKWRLIYDTNKQA	58

Fig. 32A

(69) JP 2005-538954 A 2005.12.22

Toxin Sero-Type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	AAA99055	265	YGGQTADGTTIQVFNSNGGDNQIWYGL	291
B	S58865	266	YGGQTADGTTIQVFNSNGGDNQIW	289
B/F	CAA73965	265	YNSQTANGTAIQVFNSNGGDNQKW	288
A	H44644	265	YGGQTANGTAIQVFNYHGDDNQKW	288
B	S58857	264	YNSQTANGTTIQVFNYHGDDNQKWF	288
-	AAB42189	265	YNSQTANGTAIQVFNYHGDDNQKW	288
A(B)	CAA74632	265	YNSQTANGTAIQVFN	279
C	BAB71747	257	VNSGLADGTNVQVWDSNGTSAQKW	280
D	BAA75077	263	YNSQIANGTHVIVDSYHGNTNQQW	286
C	S46429	258	YNSQIANGTHVIVDSYHGNTNQQW	281
C	P460844	257	YNSQIANGTHVIVDSYHGNTNQQW	280
D	BAA90659	258	YNSQTANGTHVIVDSYHGNTNQQW	281
C	BAA89711	258	YNSQIANGTNVIVDSYHGNTNQQW	281
G	CAA61226	116	Y	116

Fig. 32F

Toxin Sero-Type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	AAA99055	166	----GKVVQQVS-----MTNLA---VNLYI-WNNDLNQKWTIIYNEEKAAYQFFNKILSN	212
B	S58865	166	----GKVVQQVS-----MTNLA---VNLYI-WNNDLNQKWTIIYNEEKAAYQFFNKILSN	212
B/F	CAA73965	164	----NKVVQQVA-----TTNLN---VNLYT-WDYGRNQKWTIRYNEEKAAYQFFNTILSN	210
A	H44644	164	----NKVVQQVD-----VTNLN---VNLYT-WDYGRNQKWTIRYNEEKAAYQFFNTILSN	210
B	S58857	164	----SKVVQQVA-----MTDLS---VNLYT-WDYGRNQKWTIKYNKEKSAYQFFNTILSN	210
-	AAB42189	164	----NKVVQQVD-----MTNLN---VNLYT-WDYGRNQKWTIRYNEEKAAYQFFNTILSN	210
A(B)	CAA74632	164	----NKVVQQVD-----MTNLN---VNLYT-WDYGRNQKWTIRYNEEKAAYQFFNTILSN	210
C	BAB71747	161	----KFIDKNQN-----SNN-----VTIWS-WNNGDNQKWKILYNESKMAYT-LTCIKNN	204
D	BAA75077	166	----DRFLSK-N-----LNSQI---IVLWQ-WFDSSRQKWIIEYNETKSAYTLKCQ-ENN	210
C	S46429	161	----DRFLSK-N-----LNSQI---IVLWQ-WFDSSRQKWIIEYNETKSAYTLKCQ-ENN	205
C	P460844	160	----DRFLSK-N-----LNSQI---IVLWQ-WFDSSRQKWIIEYNETKSAYTLKCQ-ENN	204
D	BAA90659	161	----DRFLSK-N-----LNSQI---IVLWQ-WFDSSRQKWTIEYNETKSAYTLKCQ-ENN	205
C	BAA89711	161	----DRFLSK-N-----LNSQI---IVLWQ-WFDSSRQKWLIEYNETKSAYTLKCQ-ENN	205
G	CAA61226	38	SSENNQKWKLQYVEEKNAYKISNIAQPD	65

Fig. 32D

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C	691750	1	MSLSIKELY-Y-TKDKSIN---NVNLADGNYVVNRGDGWILSRQNQNLGGNISNNGCTAI	55
C	1170162	1	MSLSIKELY-Y-TKDKSIN---NVNLADGNYVVNRGDGWILSRQNQNLGGNISNNGCTAI	55
D	4579728	1	MSLSIKELY-Y-TKDKSIN---NVNLADGNYVVNRGDGWILSRQNQNLGGNISNNGCTAI	55
C	6729209	1	MSLSIKELY-Y-AKDKSIN---NVNLADGNYVVNRGDGWILSRQNQNLGGNISNNGCTAI	55
D	6939791	1	MSLSIKELY-Y-TKDKSIN---NVNLADGNYVVNRGDGWILSRQNQNLGGNISNNGCTAI	55
?	840637	1	MNSSIKKIY-NDIQEKVINYSDTIDLADGNYVVRGDGWILSRQNQILGGSVISNGSTGI	59
A	21702546	1	MNSSIKKIY-NDIQEKVINYSDTIDLADGNYVVRGDGWILSRQNQILGGSVISNGSTGI	59
B	2104807	1	MNSSIKKIYNH-IQEKVINYSDTIDLADGNYVVSRGDGWILSRQNQILGGSVISNGSTGI	59
B/F	3805780	1	MNSSIKKIY-NDIQEKVINYSDTIDLADGNYVVRRGDGWILSRQNQILGGSVISNGSTGI	59
G	2104801	1	MDSSIKKNFNH-TEEETINFT-AFNLDDGNYVVNRGDGWILSRQNQILGGTEVRSGSTGI	58
*	2739322	33	S---NSNLSDGLYVIDKGDGWILGEPSVVSSQILNPNETGTF	71
*	2144686	33	S---NSNLSDGLYVIDKGDGWILGEPSVVSSQILNPNETGTF	71
**	144928	33	S---NSNLSDGLYVIDKGDGWILGEPSVVSSQILNPNETGTF	71
*	2528908	33	S---NSNLSDGLYVIDKGDGWILGEPSVVSSQILNPNETGTF	71
*	551442	33	S---NSNLSDGLYVIDKGDGWILGEPSVVSSQILNPNETGTF	71
B	1304385	1	MNSSIKKIYNH-IQEKVINYSDTIDLADGNYVVSRGDGWILSR	42

Fig. 33A

Toxin Sero-Type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	AAA99055	213	GVLTWIF---SDG--NTVRVSSS--AQ-NDAQYWLINPVSDNYDRYTITNLRYKTKVLDL	264
B	S58865	213	GVLTWIF---SDG--NTVRVSSS--AQNNDAQYWLINPVSDNYDRYTITNLRDKTKVLDL	265
B/F	CAA73965	211	GVLTWIF---SNG--NTVRVSSSNDQN-NDAQYWLINPVSDTDETYTITNLRDTTKALDL	264
A	H44644	211	GVLTWIF---SNG--NTVRVSSSNDQN-NDAQYWLINPVSDTDETYTITNLRDTTKALDL	264
B	S58857	211	GVLTWIS---SNG--NTVRVSSI--AQNNDAQYWLINPVSNAYETYTITNLHDTTKALDL	263
-	AAB42189	211	GVLTWIF---SNG--NTVRVSSSNDQN-NDAQYWLINPVSDTDETYTITNLRDTTKALDL	264
A(B)	CAA74632	211	GVLTWIF---SNG--NTVRVSSSNDQN-NDAQYWLINPVSDTDETYTITNLRDTTKALDL	264
C	BAB71747	205	EYLTWFS---SIG--NNVGTYRT--EG-NNDQYWFINYLNNDASMYTISNFSNQSKFLDV	256
D	BAA75077	211	RYLTWIQ---NSN--NYVETYQS--TD-SLIQYWNINYLDNDASKYILYNLQDTNRVLDV	262
C	S46429	206	RYLTWIQ---NSN--NYVETYQS--TD-SLIQYWNINYLDNDASKYILYNLQDTNRVLDV	257
C	P460844	205	RYLTWIQ---NSN--NYVETYQS--TD-SLIQYWNINYLDNDASKYILYNLQDTNRVLDV	256
D	BAA90659	206	RYLTWIQ---NSN--NYVETYQS--TD-SLIQYWNINYLDNDASKYILYNLQDTNRVLDV	257
C	BAA89711	206	RYLTWIQ---NSN--NYVETYQS--TD-SLIQYWNINYLDNDASKYILYNLQDTNRVLDV	257
G	CAA61226	66	KYLTYNS---SQF--IVLKNIGD--ST-ALENYWIPYKIASN--TYIITNLKEYDKAWDI	115

Fig. 32E

(70) JP 2005-538954 A 2005.12.22

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C	691750	176	KFIYKKIDDTIT---VKESKXXXXXXXXXTSQTILPYPNGLYVINKGDGYMRTNDKDLIG	232
C	1170162	176	KFIYKKIDDTIT---VKESKNSNNNINFNTSQTILPYPNGLYVINKGDGYMRTNDKDLIG	232
D	4579728	176	KFIYKKIDDTIT---VKESKNSNNNINFNTSQTILPYPNGLYVINKGDGYMRTNDKDLIG	232
C	6729209	176	KFIYKKIAETTT---AKESNDSNNTTNLNTSQTILPYPNGLYVINKGDGYMRTNDKDLIG	232
D	6939791	176	KFIYKKIAETTT---AKESNDSNNTTNLNTSQTILPYPNGLYVINKGDGYMRTNDKDLIG	232
?	840637	180	QFLYKKILET-T---KNIPTNNIFNSKVSSTQRVLPYSNGLYVINKGDGYIRTNDKDLIG	235
A	21702546	180	QFLYKKILET-T---KNIPTNNIFNSKVSSTQRVLPYSNGLYVINKGDGYIRTNDKDLIG	235
B	2104807	180	QFLYKKILET-T---KNIPTNNIFNSKVSSTQRVLPYSNGLYVINKGDGYIRTNDKDLIG	235
B/F	3805780	180	QFLYKKILET-T---KNIPTNNIFNSKVSSTQRVLPYSNGLYVINKGDGYIRTNDKDLIG	235
G	2104801	179	QFLYKKISSTNTNKNIKNDNIDNTNSETNKTQPLVPYSNGLYVINKGDGYIRTNDRDLIG	238
*	2739322	39	DGLYVIDKGDGWI-LGEPSVVS	59
*	2144686	39	DGLYVIDKGDGWI-LGEPSVVS	59
**	144928	39	DGLYVIDKGDGWI-LGEPSVVS	59
*	2528908	39	DGLYVIDKGDGWI-LGEPSVVS	59
*	551442	39	DGLYVIDKGDGWI-LGEPSVVS	59
*	119307	42	DGLYVIDKGDGLI-LGEPSVLS	62

Fig. 33D

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C	691750	56	VGDLRIRETATPYYYPTASFNEEYIKNNVQNVFANFTEASEIPIGFEFSKTAPSNKSLYM	115
C	1170162	56	VGDLRIRETATPYYYPTASFNEEYIKNNVQNVFANFTEASEIPIGFEFSKTAPSNKSLYM	115
D	4579728	56	VGDLRIRETATPYYYPTASFNEEYIKNNVQNVFANFTEASEIPIGFEFSKTAPSNKSLYM	115
C	6729209	56	VGDLRIRETATPYYYPTASFNEEYIRNNVQNVFANFTEASEIPIGFEFSKTAPSNKSLYM	115
D	6939791	56	VGDLRIRETATPYYYPTASFNEEYIRNNVQNVFANFTEASEIPIGFEFSKTAPSNKGLYM	115
?	840637	60	VGDLRVNDNAIPYYYPTPSFNEEYIKNNIQTVFTNFTEANQIPIGFEFSKTAPSNKNLYM	119
A	21702546	60	VGDLRVNDNAIPYYYPTPSFNEEYIKNNIQTVFTNFTEANQIPIGFEFSKTAPSNKNLYM	119
B	2104807	60	VGDLRVNDNAIPYYYPTPSFNEEYIKNNIQTVFTNFTEANQIPIGFEFSKTAPSNKNLYM	119
B/F	3805780	60	VGDLRVNDNAIPYYYPTPSFNEEYIKNNIQTVFTNFTEANQIPIGYEFSKTAPSNKNLYM	119
G	2104801	59	VGDLRVRDNTTPYCYPTSSFNEKYIRDIVQNVFGNFNEVNQIPIGFECSRTAPDNKNLYM	118
*	2739322	72	SQSLTKSKEVSINVNFSVGFTSEFIQASVEYGFG-ITIGEQNTIERSVSTTAGPNEYVYY	130
*	2144686	72	SQSLTKSKEVSINVNFSVGFTSEFIQASVEYGFG-ITIGEENTIERSVSTTAGPNEYVYY	130
**	144928	72	SQSLTKSKEVSINVNFSVGFTSEFIQASVEYGFG-ITIGEQNTIERSVSTTAGPNEYVYY	130
*	2528908	72	SQSLTKSKEVSINVNFSVGFTSEFIQASVEYGFG-ITIGEQNTIERSVSTTAGPNEYVYY	130
*	551442	72	SQSLTKSKEVSINVNFSVGFTSEFIQASVEYGFG-ITIGEQNTIERSVSTTAGPNEYVYY	130

Fig. 33B

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C	691750	233	TLLIESSTSGSIIQPRLRNTTRPL----FNTSNPTIFSQEYTEARLNDAFNIQLFNTSTT	288
C	1170162	233	TLLIESSTSGSIIQPRLRNTTRPL----FNTSNPTIFSQEYTEARLNDAFNIQLFNTSTT	288
D	4579728	233	TLLIESSTSGSIIQPRLRNTTRPL----FNTSNPTIFSQEYTEARLNDAFNIQLFNTSTT	288
C	6729209	233	TLLIETNTSGSIIQPRLRNTTRPL----FNTSNPTLFSQEYTEARLNDAFNIQLFNTSTA	288
D	6939791	233	TLLIETNTSGSIIQPRLRNTTRPL----FNTSNPTLFSQEYTEARLNDAFNIQLFNTSTT	288
?	840637	236	TLLIEAGSSGSIIQPRLRNTTRPL----FTTSNDTKFSQQYTEERLKDAFNVQLFNTSTS	291
A	21702546	236	TLLIEAGSSGSIIQPRLRNTTRPL----FTTSNDTKFSQQYTEERLKDAFNVQLFNTSTS	291
B	2104807	236	TLLIEAGSSGSIIQPRLRNTTRPL----FTTSNNTKFSQQYTEERLKDAFNVQLFNTSTS	291
B/F	3805780	236	TLLIEAGSSGSIIQPRLRNTTRPL----FTTSNDTKFSQQYTEERLKDAFNVQLFNTSTS	291
G	2104801	239	TLLIEANSSGSIIQPRLRNTTEPI----FISSNLTKFSQQYTEERLKDAFNIKLFNTSTA	294
*	2739322	60	SQILNPNETGTFSQ-SLTKSKEVS----INVNFSVGFTSEFIQASVEYGFGITIGEQNTT	114
*	2144686	60	SQILNPNETGTFSQ-SLTKSKEVS----INVNFSVGFTSEFIQASVEYGFGITIGEENTI	114
**	144928	60	SQILNPNETGTFSQ-SLTKSKEVS----INVNFSVGFTSEFIQASVEYGFGITIGEQNTI	114
*	2528908	60	SQILNPNETGTFSQ-SLTKSKEVS----INVNFSVGFTSEFIQASVEYGFGITIGEQNTI	114
*	551442	60	SQILNPNETGTFSQ-SLTKSKEVS----INVNFSVGFTSEFIQASVEYGFGITIGEQNTI	114
*	119307	63	SQILNPNETGTFSQSLTKSKEVSINVVGFIQASVEYFTSEFTIER----------SVSTT	112

Fig. 33E

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C	691750	116	YLQYTYIRYEIIKVLQNTVTERAVLYVPSLGYVKSIEFNSEEQIDKNFYFTSQDKCILNE	175
C	1170162	116	YLQYTYIRYEIIKVLQNTVTERAVLYVPSLGYVKSIEFNSEEQIDKNFYFTSQDKCILNE	175
D	4579728	116	YLQYTYIRYEIIKVLQNTVTEAAVLYVPSLGYVKSIEFNSEEQIDKNFYFTSQDKCILNE	175
C	6729209	116	YLQYTYIRYEIIKVLQNTVIERAVLYVPSLGYVKSIEFNSGEQIDKNFYFTSEDKCILNE	175
D	6939791	116	YLQYTYIRYEIIKVLRNTVIERAVLYVPSLGYAKSIEFNSGEQIDKNFYFTSEDKCILNE	175
?	840637	120	YLQYTYIRYEIIKVLQHEIIERAVLYVPSLGYVKSIEFNPGEKINKDFYFLTNDKCILNE	179
A	21702546	120	YLQYTYIRYEIIKVLQHEIIERAVLYVPSLGYVKSIEFNPGEKINKDFYFLTNDKCILNE	179
B	2104807	120	YLQYTYIRYEIIKVLQHEIIERAVLYVPSLGYVKSIEFNLGEKINKDFYFLTNDKCILNE	179
B/F	3805780	120	YLQYTYIRYEIIKVLQHEIIERAVLYVPSLGYVKSIEFNPGEKINKDFYFLTNDKCILNE	179
G	2104801	119	YLQYTYIRYEIIKVLQQQITERAVLYVPSLGYVKSIEFNSNEKIDKNFYFQVDDKCILNE	178
*	2739322	131	KVYATYRKYQAIRISHGNISDDGSIYKLTGIWLSKTSADSLGNIDQGSLIETGERCVL	188
*	2144686	131	KVYATYRKYQAIRISHGNISDDGSIYKLTGIWLSKTSADSLGNIDQGSLIETGERCVL	188
**	144928	131	KVYATYRKYQAIRISHGNISDDGSIYKLTGIWLSKTSADSLGNIDQGSLIETGERCVL	188
*	2528908	131	KVYATYRKYQAIRISHGNISDDGSIYKLTGIWLSKTSADSLGNIDQGSLIETGERCVL	188
*	551442	131	KVYATYRKYQAIRISHGNISDSGSIYKLTGIWLMKTSADSLGNIDQGSLIETGERCVL	188

Fig. 33C

(71) JP 2005-538954 A 2005.12.22

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C	691750	408	KVNTTGVYKITTKNNLPPLIIYEAIGXXXXXXXXXXXXXXXXIKAIKYITGLNRSDAKSYL	467
C	1170162	408	KVNTTGVYKITTKNNLPPLIIYEAIGSSNRMNSNNLSNDNIKAIKYITGLNRSDAKSYL	467
D	4579728	408	KVNTTGVYKITTKNNLPPLIIYEAIGSSNRMNSNNLSNDNIKAIKYITGLNRSDAKSYL	467
C	6729209	408	TVNTTGVYKINAQNNLPPLIIYESIGSDNMNIQSNTLSNNNIKAINYITGTDSANAESYL	467
D	6939791	408	TVNTTGVYKINAQNNLPPLIIYESIGSDNMNIQSNTLSNNNIKAINYITGTDSSNAESYL	467
?	840637	411	TVNTTGIYKINTQNNLPPLKIYEAIGSGNRNLQAGNLCNNNIKAINYITGVDDPNTKSYL	470
A	21702546	411	TVNTTGIYKINAQNNLPSLKIYEAIGSGNRNFQSGNLCDDDIKAINYITGFDSPNAKSYL	470
B	2104807	411	TVNTTGIYKINAQNNLPPLKIYEAIG	436
B/F	3805780	411	TVNTTGIYKINAQNNLPPLKIYEAIG	436
G	2104801	414	TVNNTNFYKISAEDNSVPLKIYEVIGSGNRNMQDGNLSNDNIKAINYITGFDFSD-KDYL	472
*	2739322	225	DWRSSNSYPWTQKLNL	240
*	2144686	225	DWRSSNSYPWTQKLNL	240
**	144928	225	DWRSSNSYPWTQKLNL	240
*	2528908	225	DWRSSNSYPWTQKLNL	240
*	551442	225	DWRSSNSYPWTQKLNL	240
*	119307	216	DYRSSNSYPWTQKLNL	231

Fig. 33H

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C	691750	289	LFKFVEEAPTNKNISMKVYNTYEKYELINYQNGNIDDKAEYYLPSLGKCEVSDAPSPQAP	348
C	1170162	289	LFKFVEEAPTNKNISMKVYNTYEKYELINYQNGNIDDKAEYYLPSLGKCEVSDAPSPQAP	348
D	4579728	289	LFKFVEEAPTNKNISMKVYNTYEKYELINYQNGNIDDKAEYYLPSLGKCEVSDAPSPQAP	348
C	6729209	289	LFKFVEEAPDNKNISMKAYNTYEKYELINYQDGNIADKAEYYLPSLGKCEVSDAPSPQAP	348
D	6939791	289	LFKFVEEAPDNKNISMKAYNTYEKYELINYQNGNIADKAEYYLPSLGKCEVSDAPSPQAP	348
?	840637	292	LFKFVEEAPSDKNICIKAYNTYEKYELIDYQNGSIVNKAEYYLPSLGYCEVTNAPSPESE	351
A	21702546	292	LFKFVEEAPSDKNICIKAYNTYEKYELIDYQNGSIVNKAEYYLPSLGYCEVTNAPSPESE	351
B	2104807	292	LFKFVEEAPSNKNICIKAYNTYEKYELIDYQNGSIINTAEYYLPSLGYCEVTNAPSPESE	351
B/F	3805780	292	LFKFVEEAPSDKNICIKAYNTYEKYELIDYQNGSIVNKAEYYLPSLGYCEVTNAPSPESE	351
G	2104801	295	LFKFVEEAPANKNICIKAYNTYEKYELVEYRNGTIINSAQYYLPSLGYSEVIDVPSSGAP	354
*	2739322	115	ERSVSTTAGPNEYVYYKVYATYRKYQAIRISHGNISDDGSIYKLTGIWLSKTSADSLGN-	173
*	2144686	115	ERSVSTTAGPNEYVYYKVYATYRKYQAIRISHGNISDDGSIYKLTGIWLSKTSADSLGN-	173
**	144928	115	ERSVSTTAGPNEYVYYKVYATYRKYQAIRISHGNISDDGSIYKLTGIWLSKTSADSLGN-	173
*	2528908	115	ERSVSTTAGPNEYVYYKVYATYRKYQAIRISHGNISDDGSIYKLTGIWLSKTSADSLGN-	173
*	551442	115	ERSVSTTAGPNEYVYYKVYATYRKYQAIRISHGNISDDGSIYKLTGIWLMKTSADSLGN-	173
*	119307	113	-------AGPNEYVYYKVYATYRKYQAIRISHGNISDDGSIYKLTGIWLSKTSADSLGN-	164

Fig. 33F

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C	691750	468	IVSLFKDKNYYIRIPQISSSTTSQLIFKRELGNISDLADSTVNILDNLNTSGTHYYTRQS	527
C	1170162	468	IVSLFKDKNYYIRIPQISSSTTSQLIFKRELGNISDLADSTVNILDNLNTSGTHYYTRQS	527
D	4579728	468	IVSLFKDKNYYIRIPQISSSTTSQLIFKRELGNISDLADSTVNILDNLNTSGTHYYTRQS	527
C	6729209	468	IVSLIKNKNYYIRIPQISSSTTNQLIFKRELGNISDLANSTVNILDNLNTSGTHYYTRQS	527
D	6939791	468	IVSLIKNKNYYIRIPQISSSTTNQLIFKRELGNISDLANSTVNILDNLNTSGTHYYTRQS	527
?	840637	471	VVLLNKDKNYYIRVPQTSPNIENQIKFKREEGDLRNLMNSSVNIIDNLNSTGAHYYTRQS	530
A	21702546	471	VVLLNKDKNYYIRVPQTSSNIENQIQFKREEGDLRNLMNSSVNIIDNLNSTGAHYYTRQS	530
G	2104801	473	IVQLFKGKNYYIRIPQ	488
C	691750	528	PDVGNYISYQLTIPGDFNNIASSIFSFRTRNNQGIGTLYRLTESINGYNLITINNYSDLL	587
C	1170162	528	PDVGNYISYQLTIPGDFNNIASSIFSFRTRNNQGIGTLYRLTESINGYNLITINNYSDLL	587
D	4579728	528	PDVGNYISYQLTIPGDFNNIASSIFSFRTRNNQGIGTLYRLTESINGYNLITINNYSDLL	587
C	6729209	528	PDVGNYISYQLTIPGDFNNIASSIFSFRTRNNQGIGTLYRLTESINGYNLITIKNYSDLL	587
D	6939791	528	PDVGNYISYQLTIPGDFNNIASSIFSFRTRNNQGIGTLYRLTESINGYNLITIKNYSDLL	587
?	840637	531	PDVGNYISYEFTVPGNFNNKDTSNIRLYTSNNQGIGTLFRVIETIDGYKLIGIRQNLHLL	590
A	21702546	531	PDVHDYISYEFTIPGNFNNKDTSNIRLYTSYNQGIGTLFRVTETIDGYNLINIQQNLHLL	590

Fig. 33I

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C	691750	349	VVETPVDQDGFIQTGPNENIIVGVINPSENIE-EISTPIPDDYTYNIPTSIQNNACYVLF	407
C	1170162	349	VVETPVDQDGFIQTGPNENIIVGVINPSENIE-EISTPIPDDYTYNIPTSIQNNACYVLF	407
D	4579728	349	VVETPVDQDGFIQTGPNENIIVGVINPSENIE-EISTPIPDDYTYNIPTSIQNNACYVLF	407
C	6729209	349	VVETPVDQDGFIQTGPNENIIVGVINPSENIE-EISTPIPDDYTYNIPTSIQNNACYVLF	407
D	6939791	349	VVETPVEQDGFIQTGPNENIIVGVINPSENIE-EISTPIPDDYTYNIPTSIQNNACYVLF	407
?	840637	352	VVKMQVAEDGFIQNGPEEEIVVGVIDPSENIQ-EINTAISDNYTYNIPGIVNNPFYILF	410
A	21702546	352	VVKMQVAEDGFIQNGPEEEIVVGVIDPSENIQ-EINTAISDNYTYNIPGIVNNPFYILF	410
B	2104807	352	VVKTQVAEDGFVQNGPEEEIVVGVIDPSENIQ-EINTAISDNYTYSIPDIVDNNPFYILF	410
B/F	3805780	352	VVKMQVAEDGFIQNGPEEEIVVGVIDPSENIQ-EINTAISDNYIYSIPGIVNNNPFYILF	410
G	2104801	355	VVETPIVETQFIQKGPEEEIVIGVISPDENIQ-QINTAISESYTYDIPDIVGKKPFYILF	413
*	2739322	174	-----IDQGSLIETG--ERCVLTV--PSTDIEKEILDLAAATERLNLTDALNSNPAGNLY	224
*	2144686	174	-----IDQGSLIETG--ERCVLTV--PSTDIEKEILDLAAATERLNLTDALNSNPAGNLY	224
**	144928	174	-----IDQGSLIETG--ERCVLTV--PSTDIEKEILDLAAATERLNLTDALNSNPAGNLY	224
*	2528908	174	-----IDQGSLIETG--ERCVLTV--PSTDIEKEILDLAAATERLNLTDALNSNPAGNLY	224
*	551442	174	-----IDQGSLIETG--ERCVLTV--PSTDIEKEILDLAAATERLNLTDALNSNPAGNLY	224
*	119307	165	-----IDQGSLIETG--ERCVLTV--PSTDIEKEILDLAAATERLNLTDALNSNPAGNLY	215

Fig. 33G

(72) JP 2005-538954 A 2005.12.22

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	1	MKINNNFNINSLVDNRDVAIVR---G---R---K---TDAL---FKVFQVAPNIWIAPER	45
F	CAA72807	1	MKINNNFNIDSPVDNKNVAVVR---G---R---K---TDSF---FKAFQVAPNIWIAPER	45
E	P46082	1	MKINGNLNIDSPVDNKNVAIVR---S---R-------NQMF---FKAFQVAPNIWIVPER	44
E	A47708	1	MKINGNLNIDSPVDNKNVAIVR---S---R-------NQMF---FKAFQVAPNIWIVPER	44
E	Q06366	1	MKINGNLNIDSPVDNKNVAIVR---S---R-------NQMF---FKAFQVAPNIWIAPER	44
A	AAM75953	1	MNINDNLSINSPVDNKNVVVVR---A---R---K---TDTV---FKAFKVAPNIWVAPER	45
B	I40631	6	NNFNYNDPIDNDNIIMMEPPFA---R---G---TGRY---YKAFKITDRIWIIPER	49
B	P10844	6	NNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFA---R---G---TGRY---YKAFKITDRIWIIPER	49
B	1EPWA	5	NNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFA---R---G---TGRY---YKAFKITDRIWIIPER	48
D	BA75078	1	MDINDDLNINSPVDNKNVVIVR---A---R---K---TNTF---FKAFKVAPNIWVAPER	45
B*	AAL11498	6	NNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFA---R---G---MGRY---YKAFKITDRIWIIPER	49
B*	AAK97132	6	NNFNYNDPIDNDNIIMMEPPFA---R---G---TGRY---YKAFKITDRIWIIPER	49
B/F*	CAA73968	6	NNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFA---R---G---MGRY---YKAFKITDRIWIIPER	49
B*	P30995	5	NSFNYNDPVNNRTILYIK---P---G---G---CQQF---YKSFNIMKNIWIIPER	45
B*	BAC05434	5	NSFNYNDPVNNRTILYIK---P---G---G---CQQF---YKSFNIMKNIWIIPER	45
B*	BAB12249	8	NSFNYNDPVNNRTILYIK---P---G---G---CQQF---YKSFNIMKNIWIIPER	48
E*	BAB3512	5	NSFNYNDPVNDRTILYIK---P---G---G---CQEF---YKSFNIMKNIWIIPER	45
E*	S21178	5	NSFNYNDPVNDRTILYIK---P---G---G---CQEF---YKSFNIMKNIWIIPER	45
E*	Q00496	5	NSFNYNDPVNDRTILYIK---P---G---G---CQEF---YKSFNIMKNIWIIPER	45
A*	Q45894	4	VNKQFNYKDPVNGVDIAYIK---I---P---N---AGQMQP-VKAFKIHNKIWVIPER	48
A/B/F	CAA65352	1	MKINNNFNIDSPVDNKDVAIVR---G---R---K---TDIF---LKVFQVAPNIWVAPER	45
F	CAA65348	1	MKINNNFNIDSLIDNRDVAIVR---G---R---K---TDTF---FKVFQVAPNIWIAPER	45
B**	AAB22656	6	NNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFA---R---G---TGRY---YKAFKITDRIWIIPER	49
F	CAA71744	1	MKINDDLNINSPVDNKNVVIVR---A---R---K---TNIP---FKAFQVAPNIWVAPER	45
C*	A4977	6	NNFNYSDPVDNKNILYLD---T---HLFTL---ANEP---EKAFRITGNIWVIPDR	49

Figure 34Aii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C*	P18640	6	NNFNYSDPVDNKNILYLD---T---HLNTL---ANEP---EKAFRITGNIWVIPDR	49
B**	1F83A	5	NNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFA---R---G---TGRY---YKAFKITDRIWIIPER	48
B**	1F82A	5	NNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFA---R---G---TGRY---YKAFKITDRIWIIPER	48
C*	BAA89713	6	NNFNYSDPVDNKNILYLD---T---HLNTL---ANEP---EKAFRIIGNIWVIPDR	49
C*	BAA08418	6	NNFNYSDPVDNKNILYLD---T---HLNTL---ANEP---EKAFRIIGNIWVIPDR	49
C*	A49928	6	NNFNYSDPVDNKNILYLD---T---HLNTL---ANEP---EKAFRITGNIWVIPDR	49
B*	BAC22064	6	NNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFA---R---G---TGRY---YKAFKITDRIWIIPER	49
E**	1906297A	5	NSFNYNDPVNNRTILYIK---P---G---G---CQQF---YKSFNIMKNIWIIPER	45
Tet**	AAC37720	6	NNFRYSDPVNNDTIIMMEPPYC---K---G---LDIY---YKAFKITDRIWIVPER	49
Tet*	NP_783831	6	NNFRYSDPVNNDTIIMMEPPYC---K---G---LDIY---YKAFKITDRIWIVPER	49
G*	S39791	7	NFNYNDPINNDDIIMME---P---F---NDPGPGTY---YKAFRIIDRIWIVPER	49
E**	1906297B	5	NSFNYNDPVNDRTILYIK---P---G---G---CQEF---YKSFNIMKNIWIIPER	45
E*	CAA37321	5	NSFNYNDPVNNRTILYIK---P---G---G---CQQF---YKSFNIMKNIWIIPER	45
Tet	AAK72964	7	NNFRYSVPVNNDTIIMMEPPYC---K---G---LDIY---YKAFKITDRIWIVPER	50
G*	Q60393	11	NDPINNDDIIMME---P---P---NDPGPGTY---YKAFRIIDRIWIVPER	49
A**	AA021363	4	VNKQFNYKDPVNGVDIAYIK---I---P---N---AGQMQ--VKAFKIHNKIWVIPER	47
F*	AAA23210	6	NSFNYNDPVNDDTILYMQIPYE---E---K---SKKY---YKAFEIMRNVWIIPER	49
A*	CAA61124	4	VNKQFNYKDPVNGVDIAYIK---I---P---N---VGQMQP-VKAFKIHNKIWVIPER	48
A*	AA166183	4	VNKQFNYKDPVNGVDIAYIK---I---P---N---AGQMQP-VKAFKIHNKIWVIPER	48
E*	1717342A	5	NSFNYNDPVNDRTILYIK---P---G---G---CQEF---YKSFNIMKNIWIIPER	45
F*	S33411	3	VNIN-NFNYNDPINNTTILYMK---MPYYE---D---SNKY---YKAFEIMDNVWIIPER	49
A**	3BTAA	3	VNKQFNYKDPVNGVDIAYIK---I---P---N---VGQMQP-VKAFKIHNKIWVIPER	47
A*	CAA36289	4	VNKQFNYKDPVNGVDIAYIK---I---P---N---VGQMQP-VKAFKIHNKIWVIPER	48
A*	P10845	4	VNKQFNYKDPVNGVDIAYIK---I---P---N---VGQMQP-VKAFKIHNKIWVIPER	48
A*	BTCBLAB	4	VNKQFNYKDPVNGVDIAYIK---I---P---N---AGQMQP-VKAFKIHNKIWVIPER	48
E	AA009563	1	MKINGNLNIDSPVDNKNVAIVR---S---R---K---SDVF---FKAFQVAPNIWIVP	43

Figure 34Aiii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C	691750	588	NNVEPISLLNGATYIFRVKVTELNNYNIIFDAYRNS	623
C	1170162	588	NNVEPISLLNGATYIFRVKVTELNNYNIIFDAYRNS	623
D	4579728	588	NNVEPISLLNGATYIFRVKVTELNNYNIIFDAYRNS	623
C	6729209	588	NNVEPISLLNGATYIFRVKVTELNNYNIIFDAYRNS	623
D	6939791	588	NNVEPISLLNGATYIFRVKVTELNNYNIIFDAYRNS	623
?	840637	591	NNTNSIRLLNGAIYILKVEVTELNNYNI	618
A	21702546	591	NNTNSIRLLNGAIYILKVEVTELNNYNI	618

Fig. 33J

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	1	MNINDNLSINSPVDNKNVVVVR---A---R---K---TDTI---FKAFKVAPNIWVAPER	45
B/F	CAA72807	1	MNINDNLSINSPVDNKNVVVVR---A---R---K---TDTV---FKAFKVAPNIWVAPER	45
A/B/F	CAA55074	1	MNINDNLSINSPVDNKNVVVVR---A---R---K---TDTV---FKAFKVAPNIWVAPER	45
B	AAB64350	1	MNINDNLSINSPVDNKNVVVVR---A---R---K---TDTV---FKAFKVAPNIWVAPER	45
A/B	CAA61125	1	MNINDNLSINSPVDNKNVVVVR---A---R---K---TDTV---FKAFKVAPNIWVAPER	45
A	CAA74634	1	MNINDNLSINSPVDNKNVVVVR---A---R---K---TDTV---FKAFKVAPNIWVAPER	45
A	S68216	1	MNINDNLSINSPVDNKNVVVVR---A---R---K---TDTV---FKAFKVAPNIWVAPER	45
A	CAA63550	1	MNINDNLSINSPVDNKNVVVVR---A---R---K---TDTV---FKAFKVAPNIWVAPER	45
A	AAB42191	1	MNINDNLSINSPVDNKNVVVVR---A---R---K---TDTV---FKAFKVAPNIWVAPER	45
G	CAA1228	1	MKINSNLTINSPIDNKNVVIVR---A---R---E---TSKF---FKAFKVAPNIWVAPER	45
D	BAA90660	1	MDINDDLNINSPVDNKNVVIVR---A---R---K---TNTF---FKAFKVAPNIWVAPER	45
C	BAA89712	1	MDINDDLNINSPVDNKNVVIVR---A---R---K---TNTF---FKAFKVAPNIWIAPER	45
C	BAB71748	1	MDINDDLNINSPVDNKNVVIVR---A---R---K---TNTF---FKAFKVAPNIWVAPER	45
D	BAA75083	1	MDINDDLNINSPVDNKNVVIVR---A---R---K---TNTF---FKAFKVAPNIWVAPER	45
C	S46430	1	MDINDDLNINSPVDNKNVVIVR---A---R---K---TNTF---FKAFKVAPNIWVAPER	45
D	AAB36016	1	MDINDDLNINSPVDNKNVVIVR---A---R---K---TNTF---FKAFKVAPNIWVAPER	45
C	P46081	1	MDINDDLNINSPVDNKNVVIVR---A---R---K---TNTF---FKAFKVAPNIWVAPER	45
A	JC4901	1	MDINDDLNINSPVDNKNVVIVR---A---R---K---TNTF---FKAFKVAPNIWVAPER	45
-	BAA12299	1	MDINDDLNINSPVDNKNVVIVR---A---R---K---TNTF---FKAFKVAPNIWVAPER	45
A	CAA74630	1	MKINNNFNIDSPVDNKDVAIVR---G---R---K---TDIF---LKVFQVAPNIWVAPER	45
A	CAA61123	1	MKINNNFNINSLVDNKDVAIVR---G---R---K---TDIF---LKVFQVAPNIWVAPER	45
F	CAA67511	1	MKINNNFNIDSPVDNKDVAIVR---G---R---K---TDIF---LKVFQVAPNIWVAPER	45
F	CAA61233	1	MKINNNFNIDSLIDNRDVAIVR---G---R---K---TDTF---FKVFQVAPNIWIAPER	45
F	AAC60474	1	MKINDDLNINSPVDNKNVVIVR---A---R---K---TNIF---FKAFQVAPNIWVAPER	45
F	I40644	1	MKINDDLNINSPVDNKNVVIVR---A---R---K---TNIF---FKAFQVAPNIWVAPER	45

Figure 34Ai

(73) JP 2005-538954 A 2005.12.22

Toxin Serotype	Accession No.		Sequence Alignment	
F	CAA72807	46	------Y--------Y--GES-LN-IN-----EDQK-----S-----DG---G---I---	63
E	P46082	45	------Y--------Y--GES-LK-IN-----EDQK-----F-----DG---G---I---	62
E	A47708	45	------Y--------Y--GES-LK-IN-----EDQK-----F-----DG---G---I---	62
E	Q06366	45	------Y--------Y--GES-LK-IN-----EDQK-----S-----DG---G---I---	62
A	AAM75953	46	------Y--------Y--GES-LS-ID-----EEYK-----V-----DG---G---I---	63
B	I40631	50	------VT-------F--GYK-----P-----EDFN-----K-----SS---G---IFNR	68
B	P10844	50	------VT-------F--GYK-----P-----EDFN-----K-----SS---G---IFNR	68
B	1EPWA	49	------VT-------F--GYK-----P-----EDFN-----K-----SS---G---IFNR	67
D	BA75078	46	------Y--------Y--GEP-LD-IA-----EEYK-----L-----DG---G---I---	63
B*	AAL11498	50	------VT-------F--GYK-----P-----EDFN-----K-----SS---G---IFNR	68
B*	AAK97132	50	------VT-------F--GYK-----P-----EDFN-----K-----SS---G---IFNR	68
B/F*	CAA73968	50	------VT-------F--GYK-----P-----EDFN-----K-----SS---G---IFNR	68
E*	P30995	46	------N--------V--IGT-IP-QDFLPPTSLKN-----G-----DS---S---Y---	68
E*	BAC05434	46	------N--------V--IGT-IP-QDFLPPTSLKN-----G-----DS---S---Y---	68
E*	BAB12249	49	------N--------V--IGT-IP-QDFLPPTSLKN-----G-----DS---S---Y---	71
E*	BAB3512	46	------N--------V--IGT-TP-QD-----FHPP-----TSLKNGDS---S---Y---	68
E*	S21178	46	------N--------V--IGT-TP-QD-----FHPP-----TSLKNGDS---S---Y---	68
E*	Q00496	46	------N--------V--IGT-TP-QD-----FHPP-----TSLKNGDS---S---Y---	68
A*	Q45894	49	DTFTNPE--------E--GDL-NP-PP-----EAKQ-----V-----PV---S---Y---	72
A/B/F	CAA65352	46	------Y--------Y--GES-LN-IN-----EDQK-----S-----DG---G---I---	63
F	CAA65348	46	------Y--------Y--GES-LN-IN-----EDQK-----S-----DG---G---I---	63
B**	AAB22656	50	------VT-------F--GYK-----P-----EDFN-----K-----SS---G---IFNR	68
F	CAA71744	46	------Y--------Y--GEP-LN-IS-----D	55
C*	A4977	50	------F--------S--RNSNPN-LN-----KPPR-----VTSP--KS---G---Y---	71
C*	P18640	50	------F--------S--RNSNPN-LN-----KPPR-----VTSP--KS---G---Y---	71

Figure 34Bii

Toxin Serotype	Accession No.		Sequence Alignment	
B**	1F83A	49	------VT-------F--GYK-----P-----EDFN-----K-----SS---G---IFNR	67
B**	1F82A	49	------VT-------F--GYK-----P-----EDFN-----K-----SS---G---IFNR	67
C*	BAA89713	50	------F--------S--RDSNPN-LN-----KPPR-----VTSP--KS---G---Y---	71
C*	BAA08418	50	------F--------S--RDSNPN-LN-----KPPR-----VTSP--KS---G---Y---	71
C*	A49928	50	------F--------S--RNSNPN-LN-----KPPR-----VTSP--KS---G---Y---	71
B*	BAC22064	50	------VT-------F--GYK-----P-----EDFN-----K-----SS---G---IFNR	68
E**	1906297A	46	------N--------V--IGT-IP-QDFLPPTSLKN-----G-----DS---S---Y---	68
Tet**	AAC37720	50	------Y------------EF-GT-KP-----EDFNPPSSLI-----EG---ASE-Y---	72
Tet*	NP_783831	50	------Y------------EF-GT-KP-----EDFN-----P-----PS---S---LIEG	68
G*	S39791	50	------FT-------Y--GPQ-----P-----DQFN-----A-----ST---G---VPSK	68
E**	1906297B	46	------N--------V--IGT-TP-QD-----FHPP-----TSLKNGDS---S---Y---	68
E*	CAA37321	46	------N--------V--IGT-IP-QDFLPPTSLKN-----G-----DS---S---Y---	68
Tet	AAK72964	51	------Y------------BF-GT-KP-----EDFN-----P-----PS---S---LIEG	69
G*	Q50393	50	------FT-------Y--GPQ-----P-----DQFN-----A-----ST---G---VPSK	68
A**	AA021363	48	DTFTNPE--------E--GDL-NP-PP-----EAKQ-----V-----PV---S---Y---	71
F*	AAA23210	50	------N--------TIGTDP-SD-PD-----PPAS-----L-----EN---GSSAY---	72
A*	CAA61124	49	DTFTNPE--------E--GDL-NP-PP-----EAKQ-----V-----PV---S---Y---	72
A*	AA166183	49	DTFTNPE--------E--GDL-NP-PP-----EAKQ-----V-----PV---S---Y---	72
E*	1717342A	46	------N--------V--IGT-TP-QD-----FHPP-----TSLKNGDS---S---Y---	68
F*	S33411	50	------NIIGKKPSDF--YPP-IS-LD-----SG-----SS---A---Y---	72
A**	3BTAA	48	DTFTNPE--------E--GDL-NP-PP-----EAKQ-----V-----PV---S---Y---	71
A*	CAA36289	49	DTFTNPE--------E--GDL-NP-PP-----EAKQ-----V-----PV---S---Y---	72
A*	P10845	49	DTFTNPE--------E--GDL-NP-PP-----EAKQ-----V-----PV---S---Y---	72
A*	BTCBLAB	49	DTFTNPE--------E--GDL-NP-PP-----EAKQ-----V-----PV---S---Y---	72
B/F*	CAA73972	50	----------DTI-GT-KP-----DEFQ-----V-----PD---S---LKNG	68

Figure 34Biii

Toxin Serotype	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F*	CAA73972	6	NSFNYNDPVNDETILYMQ---KPYBE---R---SRKY---YKAFEIMPNVWIMPER	49
B*	CAA77991	1	APKITDRIWIIPER	14
D*	AAB24244	7	DFNYSDPVNDNDILYLR---I---P---Q---NKLITTPVKAFMITQNIWVIPER	49
D*	AAB24244	7	DFNYSDPVNDNDILYLR---I---P---Q---NKLITTPVKAFMITQNIWVIPER	49
D*	S70582	7	DFNYSDPVNDNDILYLR---I---P---Q---NKLITTPVKAFMITQNIWVIPER	49
D*	BAA75084	7	DFNYSDPVNDNDILYLR---I---P---Q---NKLITTPVKAFMITQNIWVIPER	49
D*	P19321	7	DFNYSDPVNDNDILYLR---I---P---Q---NKLITTPVKAFMITQNIWVIPER	49
F*	930996	6	NSFNYNDPVNDDTILYMQIPYE---E---K---SKKY---YKAFEIMRNVWIIPER	49

Figure 34Aiv

Toxin Serotype	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	46	------Y--------Y--GES-LS-ID-----EEYK-----V-----DG---G---I---	63
B/F	CAA72807	46	------Y--------Y--GES-LS-ID-----EEYK-----V-----DG---G---I---	63
A/B/F	CAA55074	46	------Y--------Y--GES-LS-ID-----EEYK-----V-----DG---G---I---	63
B	AAB64350	46	------Y--------Y--GES-LS-ID-----EEYK-----V-----DG---G---I---	63
A/B	CAA61125	46	------Y--------Y--GES-LS-ID-----EEYK-----V-----DG---G---I---	63
A	CAA74634	46	------Y--------Y--GES-LS-ID-----EEYK-----V-----DG---G---I---	63
A	S68216	46	------Y--------Y--GES-LS-ID-----EEYK-----V-----DG---G---I---	63
A	CAA63550	46	------Y--------Y--GES-LS-ID-----EEYK-----V-----DG---G---I---	63
A	AAB42191	46	------Y--------Y--GES-LS-ID-----EEYK-----V-----DG---G---I---	63
G	CAA1228	46	------Y--------Y--GES-LS-IE-----ESKK-----V-----NG---G---V---	63
D	BAA90660	46	------Y--------Y--GEP-LD-IA-----EEYK-----L-----DG---G---I---	63
C	BAA89712	46	------Y--------Y--GEP-LD-IA-----EEYK-----L-----DG---G---I---	63
C	BAB71748	46	------Y--------Y--GEP-LD-IA-----EEYK-----L-----DG---G---I---	63
D	BAA75083	46	------Y--------Y--GEP-LD-IA-----EEYK-----L-----DG---G---I---	63
C	S46430	46	------Y--------Y--GEP-LD-IA-----EEYK-----L-----DG---G---I---	63
D	AAB36016	46	------Y--------Y--GEP-LD-IA-----EEYK-----L-----DG---G---I---	63
C	P46081	46	------Y--------Y--GEP-LD-IA-----EEYK-----L-----DG---G---I---	63
A	JC4901	46	------Y--------Y--GEP-LH-IA-----EEYK-----L-----DG---G---I---	63
?	BAA12299	46	------Y--------Y--GEP-LH-IA-----EEYK-----L-----DG---G---I---	63
A	CAA74630	46	------Y--------Y--GES-LN-IN-----EDQK-----S-----NG---G---I---	63
A	CAA61123	46	------Y--------Y--GES-LN-IN-----EDQK-----S-----NG---G---I---	63
F	CAA67511	46	------Y--------Y--GES-LN-IN-----EDQK-----S-----DG---G---I---	63
F	CAA61233	46	------Y--------Y--GES-LN-IN-----EDQK-----S-----DG---G---I---	63
F	AAC60474	46	------Y--------Y--GEP-LN-IS-----DQEK-----S-----DG---G---I---	63
F	I40644	46	------Y--------Y--GEP-LN-IS-----DQEK-----S-----DG---G---I---	63
B/F	CAA73971	46	------Y--------Y--GES-LN-IN-----EDQK-----S-----DG---G---I---	63

Figure 34Bi

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	64	-----YDSSFLSTDNEKDEFLQATVKILQRINNNVIGAKLLSLISTAISF---PYE----	111
F	CAA72807	64	-----YDSNFLSTDDEKDEFLQATIKILQRINNNIVGEKLLSLIATAMPF---PYE----	111
E	P46082	63	-----YDSNFLSTNNEKDDFLQATIKLLQRINNNVVGAKLLSLISTAIPF---PYENNTE	114
E	A47708	63	-----YDSNFLSTNNEKDDFLQATIKLLQRINNNVVGAKLLSLISTAIPF---PYENNTE	114
E	Q06366	63	-----YDSNFLSTNNEKDEFLQATIKLLQRINNNVVGAKLLSLISTAIPF---PYENNTE	114
A	AAM75953	64	-----YDSNFLSQDSEKDKFLQAIITLLKRINSTNAGEKLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
B	I40631	69	DVCEYYDPDYLNTNDKKNIFFQTLIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIPY---LGDRRVP	125
B	P10844	69	DVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIPY---LGDRRVP	125
B	1EPWA	68	DVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIPY---LGDRRVP	124
D	BA75078	64	-----YDSNFLSQDSERENFLQAIIILLKRIN	90
B*	AAL11498	69	DVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIPY---LGDRRVP	125
B*	AAK97132	69	DVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIPY---LGDRRVP	125
B/F*	CAA73968	69	DVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIPY---LGDRRVP	125
E*	P30995	69	-----YDPNYLQSDQEKDKFLKIVTKIFNRINDNLSGRILLEELSKANPY----------	113
E*	BAC05434	69	-----YDPNYLQSDQEKDKFLKIVTKIFNRINDNLSGRILLEELSKANPY----------	113
E*	BAB12249	72	-----YDPNYLQSDQEKDKFLKIVTKIFNRINDNLSGRILLEELSKANPY----------	116
E*	BAB3512	69	-----YDPNYLQSDEEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPY----------	113
E*	S21178	69	-----YDPNYLQSDEEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPY----------	113
E*	Q00496	69	-----YDPNYLQSDEEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPY----------	113
A*	Q45894	73	-----YDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPF---WG-----	119
A/B/F	CAA65352	64	-----YDS	66
F	CAA65348	64	-----YDS	66
B**	AAB22656	69	DVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIPY---LGDRRVP	125
C*	A4977	72	-----YDPNYLSTDSDKDTFLKEIIKLFKRINSREIGEELIYRLSTDIPF---PGNNNTP	123
C*	P18640	72	-----YDPNYLSTDSDKDPFLKEIIKLFKRINSREIGEELIYRLSTDIPF---PGNNNTP	123

Figure 34Cii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B**	1F83A	68	DVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIPY---LGDRRVP	124
B**	1F82A	68	DVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIPY---LGDRRVP	124
C*	BAA89713	72	-----YDPNYLSTDSEKDTFLKEIIKLFKRINSREIGEELIYRLATDIPF---PGNNNTP	123
C*	BAA08418	72	-----YDPNYLSTDSEKDTFLKEIIKLFKRINSREIGEELIYRLATDIPF---PGNNNTP	123
C*	A49928	72	-----YDPNYLSTDSDKDTFLKEIIKLFKRINSRBIGEELIYRLSTDIPF---PGNNNTP	123
B*	BAC22064	69	DVCEYYDPDYLNTNDKKNIPLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIPY---LGDRRVP	125
E**	1906297A	69	-----YDPNYLQSDQEKDKFLKIVTKIFNRINDNLSGRILLEELSKANPY----------	113
Tet**	AAC37720	73	-----YDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKIINAIPYLGNSYSLLDK	127
Tet*	NP_783831	69	ASEY-YDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKIINAIPYLGNSYSLLDK	127
G*	S39791	69	DVTEYYDPTYLKTDAEKDKFLKTMIKLFNRINSKPSGQRLLDMIVDAIPY----------	118
E**	1906297B	69	-----YDPNYLQSDEEKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPY----------	113
E*	CAA37321	69	-----YDPNYLQSDQEKDKFLKIVTKIFNRINDNLSGRILLEELSKANPY----------	113
Tet	AAK72964	70	ASEV-YDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKIINAIPYLGNSYSLLDK	128
G*	Q60393	69	DVTEYYDPTYLKTDAEKDKFLKTMIKLFNRINSKPSGQRLLDMIVDAIPY----------	118
A**	AA021363	72	-----YDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPF---WG-----	118
F*	AAA23210	73	-----YDPNYLTTDAEKDRYLKTTIKLFKRINSNPAGEVLLQEISVAKPV---LGNEHTP	124
A*	CAA61124	73	-----YDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPF---WG-----	119
A*	AA166183	73	-----YDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPF---WG-----	119
E*	1717342A	69	-----YDPNYLQSDESKDRFLKIVTKIFNRINNNLSGGILLEELSKANPY----------	113
F*	S33411	73	-----YDPNYLTTDAEKDRFLKTVIKLFNRINSNPAGQVLLESEIKNGKPV-------LGN	120
A**	3BTAA	72	-----YDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPF---WG-----	118
A*	CAA36289	73	-----YDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPF---WG-----	119
A*	P10845	73	-----YDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPF---WG-----	119
A*	BTCBLAB	73	-----YDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPF---WG-----	119
B/F*	CAA73972	69	SSAY-YDPNYLTTDAEKDRYLKTMIKLFNRINSNPTGKVLLEEVSNARPY---LGDDDTL	124

Figure 34Ciii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B*	CAA77991	15	------YT-------F--GVK-----P-----BDFN-----K-----SS---G---IPNR	33
D*	AAB24244	50	------F--------S--SDTNPS-LS-----KPPR-----P-----TSKYQS---Y---	71
D*	AAB24244	50	------F--------S--SDTNPS-LS-----KPPR-----P-----TSKYQS---Y---	71
D*	S70582	50	------F--------S--SDTNPS-LS-----KPPR-----P-----TSKYQS---Y---	71
D*	BAA75084	50	------F--------S--SDTNPS-LS-----KPPR-----P-----TSKYQS---Y---	71
D*	P19321	50	------F--------S--SDTNPS-LS-----KPPR-----P-----TSKYQS---Y---	71
F*	930996	50	N-----T--------I--GTN-PSDPD-----PPAS-----L-----KN---GSSAY---	72

Figure 34Biv

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	64	-----YDSNFLSQDSEKDKFLQAIITLLKRINSTNAGEKLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
B/F	CAA72807	64	-----YDSNFLSQDSEKDKFLQAIITLLKRINSTNAGEKLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
A/B/F	CAA55074	64	-----YDSNFLSQDSEKDKFLQAIITLLKRINSTNAGEKLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
B	AAB64350	64	-----YDSNFLSQDSEKDKFLQAIITLLKRINSTNAGEKLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
A/B	CAA61125	64	-----YDSNFLSQDSEKDKFLQAIITLLKRINSTNAGEKLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
A	CAA74634	64	-----YDSNFLSQDSEKDKFLQAIITLLKRINSTNAGEKLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
A	S68216	64	-----YDSNFLSQDSEKDKFLQAIITLLKRINSTNAGEKLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
A	CAA63550	64	-----YDSNFLSQDSEKDKFLQAIITLLKRINSTNAGEKLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
A	AAB42191	64	-----YDSNFLSQDSEKDKFLQAIITLLKRINSTNAGEKLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
G	CAA1228	64	-----YDSNFLSQNNEKDKFLQAIITLLKRINSNIAGEKLLSLVSTAIPF---PYGYIGG	115
D	BAA90660	64	-----YDSNFLSQDSERENFLQAIITLLKRINNTISGKQLLSLISTAIPF---PYGYVGG	115
C	BAA89712	64	-----YDSNFLSQDSERENFLQAIITLLKRINNTISGKQLLSLISTAIPF---PYGYVGG	115
C	BAB71748	64	-----YDSNFLSQDSERENFLQAIIILLKRINNTISGKQLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
D	BAA75083	64	-----YDSNFLSQDSERENFLQAIIILLKRINNTISGKQLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
C	S46430	64	-----YDSNFLSQDSERENFLQAIIILLKRINNTISGKQLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
D	AAB36016	64	-----YDSNFLSQDSERENFLQAIIILLKRINNTISGKQLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
C	P46081	64	-----YDSNFLSQDSERENFLQAIIILLKRINNTISGKQLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
A	JC4901	64	-----YDSNFLSQDSERENFLQAIIILLKRINNTISGKQLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
?	BAA12299	64	-----YDSNFLSQDSERENFLQAIIILLKRINNTISGKQLLSLISTAIPF---PYGYIGG	115
A	CAA74630	64	-----YDSNFLLTNDEKDEFLQATVKILQRINNNVIGAKLLSLISTAIPF---PYE----	111
A	CAA61123	64	-----YDSNFLLTNDEKDEFLQATVKILQRINNNVIGAKLLSLISTAIPF---PYE----	111
F	CAA67511	64	-----YDSNFLLTNDEKDEFLQATVKILQRINNNVIGAKLLSLISTAIPF---PYE----	111
F	CAA61233	64	-----YDSNFLSTNDEKDEFLQATVKILQRINNNVIGAKLLSLISTAIPF---PYE----	111
F	AAC60474	64	-----YDSNFLKENSEKEEFLQAIILLLKRINNNIIGQKLLSLMCTSIPF---LHE----	111
F	I40644	64	-----YDENFLKENSEKEEFLQAIILLLKRINNNIIGQKLLSLMCTSIPF---LHE----	111

Figure 34Ci

Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	112	----------YKPGDYRQTNYLTSKYN--EHYYTANLV---	137
F	CAA72807	112	----------YGAEDFRQTNYLSSKDN--KYYYPANLV---	137
E	P46082	115	D----------YRQTNYLSSKNN--EHYYTANLV---	136
E	A47708	115	D----------YRQTNYLSSKNN--EHYYTANLV---	136
E	Q06366	115	D----------YRQTNYLSSKNN--EHYYTANLV---	136
A	AAM75953	116	GYYAPNMITFGSAPKSNKKLNSLISSTIPFPYAGYRETNYLSSEDN--KSFYASNIV---	170
B	I40631	126	LEEFNTNIASVTVNKLI----------SNPGEVERK--KGIFA-NLI---	159
B	P10844	126	LEEFNTNIASVTVNKLI----------SNPGEVERK--KGIFA-NLI---	159
B	1EPWA	125	LEEFNTNIASVTVNKLI----------SNPGEVERK--KGIFA-NLI---	158
B*	AAL11498	126	LEEFNTNIASVTVNKLI----------SNPGEVERK--KGIFA-NLI---	159
B*	AAK97132	126	LEEFNTNIASVTVNKLI----------SNPGEVERK--KGIFA-NLI---	159
B/F*	CAA73968	126	LEEFNTNIASVTVNKLI----------SNPGEVERK--KGIFA-NLI---	159
E*	P30995	114	---------LGNDNTPDGDFIINDASAVPIQF----------SNGS--QSILLPNVI---	149
E*	BAC05434	114	---------LGNDNTPDGDFIINDASAVPIQF----------SNGS--QSILLPNVI---	149
E*	BAB12249	117	---------LGNDNTPDGDFIINDASAVPIQF----------SNGS--QSILLPNVI---	152
E*	BAB3512	114	-------LGNDNTPDNQFHIGDASAVEIKF----------SNGS--QDILLPNVI---	149
E*	S21178	114	-------LGNDNTPDNQFHIGDASAVEIKF----------SNGS--QDILLPNVI---	149
E*	Q00496	114	-------LGNDNTPDNQFHIGDASAVEIKF----------SNGS--QDILLPNVI---	149
A*	Q45894	120	----------GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEEL----------NLV---	152
B**	AAB22656	126	LEEFNTNIASVTVNKLI----------SNPGEVERK--KGIFA-NLI---	159
C*	A4977	124	INTFDPDVDFNSVDVKT----------RQGNNWVKTGS--IN---PSVI---	157
C*	P18640	124	INTFDPDVDFNSVDVKT----------RQGNNWVKTGS--IN---PSVI---	157
B**	1F83A	125	LEEFNTNIASVTVNKLI----------SNPGEVERK--KGIFA-NLI---	158
B**	1F82A	125	LEEFNTNIASVTVNKLI----------SNPGEVERK--KGIFA-NLI---	158
C*	BAA89713	124	INTFDFDVDFNSVDVKT----------RQGNNWVKTGS--IN---PSVI---	157

Figure 34Dii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B*	CAA77991	34	DVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIPY---LGDRRVP	90
D*	AAB24244	72	-----YDPSYLSTDEQKDTFLKGIIKLFKRINERDIGKKLINYLVVGSPF----------	116
D*	AAB24244	72	-----YDPSYLSTDEQKDTFLKGIIKLFKRINERDIGKKLINYLVVGSPF----------	116
D*	S70582	72	-----YDPSYLSTDEQKDTFLKGIIKLFKRINERDIGKKLINYLVVGSPF----------	116
D*	BAA75064	72	-----YDPSYLSTDEQKDTFLKGIIKLFKRINERDIGKKLINYLVVGSPF----------	116
D*	P19321	72	-----YDPSYLSTDEQKDTFLKGIIKLFKRINERDIGKKLINYLVVGSPF----------	116
F*	930996	73	-----YDPNYLITDAEKDRYLKTTIKLFKRINSNDAGKVLLQEISYAKFY---LGNDHTP	124

Figure 34Civ

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C*	BAA08418	124	INTFDFDVDFNSVDVKT----------RQGNNWVKTGS--IN---PSVI---	157
C*	A49928	124	INTFDFDVDFNSVDVKT----------RQGNNWVKTGS--IN---PSVI---	157
B*	BAC22064	126	LEEFNTNIASVTVNKLI----------SNPGEVERK--KGIFA-NLI---	159
E**	1906297A	114	---------LGNDNTPDGDFIINDASAVPIQF----------SNGS--QSILLPNVI---	149
Tet**	AAC37720	128	FDTNSNSVSFNLLEQDP----------SGATT--KSAMLTNLI---	158
Tet*	NP_783831	128	FDTNSNSVSFNLLEQDP----------SGATT--KSAMLTNLI---	158
G*	S39791	119	------LGNASTPPDKFAANVANVSINKKIIQPG--------AEDQ--IKGLMTNLI---	159
E**	1906297B	114	-------LGNDNTPDNQFHIGDASAVEIKF----------SNGS--QDILLPNVI---	149
E*	CAA37321	114	---------LGNDNTPDGDFIINDASAVPIQF----------SNGS--QSILLPNVI---	149
Tet	AAK72964	129	FDTNSNSVSFNLSEQDP----------SGATT--KSAMLTSLI---	159
G*	Q60393	119	------LGNASTPPDKFAANVANVSINKKIIQPG--------AEDQ--IKGLMTNLI---	159
A**	AA021363	119	----------GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEEL----------NLV---	151
F*	AAA23210	125	INEF----------HPVTRTTSVNIKSSTNV--KSSIILNLL---	154
A*	CAA61124	120	----------GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEEL----------NLV---	152
A*	AA166183	120	----------GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEEL----------NLV---	152
E*	1717342A	114	-------LGNDNTPDNQFHIGDASAVEIKF----------SNGS--QDILLPNVI---	149
F*	S33411	121	DHIAVNEFC----------ANNRSTSVEIKESNGTTDSMLLNLV---	154
A**	3BTAA	119	----------GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEEL----------NLV---	151
A*	CAA36289	120	----------GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEEL----------NLV---	152
A*	P10845	120	----------GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEEL----------NLV---	152
A*	BTCBLAB	120	----------GSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEEL----------NLV---	152
B/F*	CAA73972	125	INEF----------LPVNVTTSVNIKFSTDV--RSSIISNLL---	154
B*	CAA77991	91	LEEFNTNIASVTVNKLI----------SNPGEVERK--KGIFA-NLI---	124
D*	AAB24244	117	-------MGDSSTPEDT----------FDFTRHTTNIAVEKFEN--GSWKVTNIITPS	155
D*	AAB24244	117	-------MGDSSTPEDT----------FDFTRHTTNIAVEKFEN--GSWKVTNIITPS	155
D*	S70582	117	-------MGDSSTPEDT----------FDFTRHTTNIAVEKFEN--GSWKVTNIITPS	155

Figure 34Diii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	116	GYYAPNMITFGSAPKSNKKLNSLISSTIPFPYAGYRETNYLSSEDN--KNFYASNIV---	170
B/F	CAA72807	116	GYYAPNMITFGSAPKSNKKLNSLISSTIPFPYAGYRETNYLSSEDN--KSFYASNIV---	170
A/B/F	CAA55074	116	GYYAPNMITFGSAPKSNKKLNSLISSTIPFPYAGYRETNYLSSEDN--KSFYASNIV---	170
B	AAB64350	116	GYYAPNMITFGSAPKSNKKLNSLISSTIPFPYAGYRETNYLSSEDN--KSFYASNIV---	170
A/B	CAA61125	116	GYYAPNMITFGSAPKSNKKLNSLISSTIPFPYAGYRETNYLSSEDN--KSFYASNIV---	170
A	CAA74634	116	GYYAPNMITFGSAPKSNKKLNSLISSTIPFPYAGYRETNYLSSEDN--KSFYASNIV---	170
A	S68216	116	GYYAPNMITFGSAPKSNKKLNSLISSTIPFPYAGYRETNYLSSEDN--KSFYASNIV---	170
A	CAA63550	116	GYYAPNMITFGSAPKSNKKLNSLISSTIPFPYAGYRETNYLSSEDN--KSFYASNIV---	170
A	AAB42191	116	GYYAPNMITFGSAPKSNKKLNSLISSTIPFPYAGYRETNYLSSEDN--KSFYASNIV---	170
G	CAA1228	116	GYYCPNIVTFGSTIKYNKKINSLISTTIPFPYGGYRETNYLSSKDT--ENFYAANIV---	170
D	BAA90660	116	GYSSPNIFTFGKTPKSNKKLNSLVTSTIPFPFGGYRETNYIESQNN--KNFYASNIV---	170
C	BAA89712	116	GYSSPNIFTFGKTPKSNKKLNSLVTSTIPFPFGGYRETNYIESPNN--KDFYASNIV---	170
C	BAB71746	116	GYSSPNIFTFGKTPKSNKKLNSLVTSTIPFPFGGYRETNYIESQNN--KNFYASNIV---	170
D	BAA75083	116	GYSSPNIFTFGKTPKSNKKLNSLVTSTIPFPFGGYRETNYIESQNN--KNFYASNIV---	170
C	S46430	116	GYSSPNIFTFGKTPKSNKKLNSLVTSTIPFPFGGYRETNYIESQNN--KNFYASNVI---	170
D	AAB36016	116	GYSSPNIFTFGKTPKSNKKLNSLVTSTIPFPFGGYRETNYIESQNN--KNFYASNIV---	170
C	P46081	116	GYSSPNIFTFGKTPKSNKKLNSLVTSTIPFPFGGYRETNYIESQNN--KNFYASNII---	170
A	JC4901	116	GYSSPNIFTFGKTPRTNKKLNSLVTSTIPFPFGGYRETNYIESQNN--KNFYASNII---	170
?	BAA12299	116	GYSSPNIFTFGKTPRTNKKLNSLVTSTIPFPFGGYRETNYIESQNN--KNFYASNII---	170
A	CAA74630	112	----------YRAEDYRQTNYLSSKDN--QHYYTANLV---	137
A	CAA61123	112	----------YRAEDYRQTNYLSSKDN--QHYYTANLV---	137
F	CAA67511	112	----------YKPGDYRQTNYLVSKDN--QHYYTANLV---	137
F	CAA61233	112	----------YKPGDYRQTNYLVSKDN--QHYYTANLV---	137
F	AAC60474	112	----------YKQGDYRQSNYLGSKNS--EYLYSANIV---	137
F	I40644	112	----------YKQGDYRQSNYLGSKNS--EYLYSANIV---	137

Figure 34Di

Toxin

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	138	--IFGPGSNIIK---NNV---V-YYK-------K--------EY-----AEN------GM	162
F	CAA72807	138	--IFGPGSNLIE---NSV---V-CYK-------K--------EY-----SEN------GM	162
E	P46082	137	--IFGPGSNIIK---NNV---I-YYK-------K--------EY-----AES------GM	161
E	A47708	137	--IFGPGSNIIK---NNV---I-YYK-------K--------EY-----AES------GM	161
E	Q06366	137	--IFGPGSNIIK---NNV---I-YYK-------K--------EY-----AEN------GM	161
A	AAM75953	171	--IFGPGANIVE---NNT---V-FYK-------K--------ED-----AEN------GM	195
B	I40631	160	--IFGPGPVLNE---NET---I-DIG-------I--------QNHFA--SRE------GF	187
B	P10844	160	--IFGPGPVLNE---NET---I-DIG-------I--------QNHFA--SRE------GF	187
B	1EPWA	159	--IFGPGPVLNE---NET---I-DIG-------I--------QNHFA--SRE------GF	186
B*	AAL11498	160	--IFGPGPVLNE---NET---I-DIG-------I--------QNHFA--SRE------GF	187
B*	AAK97132	160	--IFGPGPVLNE---NET---I-DIG-------I--------QNHFA--SRE------GF	187
B/F*	CAA73968	160	--IFGPGPVLNE---NET---I-DIG-------I--------QNHFA--SRE------GF	187
E*	P30995	150	--IMGAEPDLFE---TNS---S-NIS-------L--------RNNYMP-SNH------GF	178
E*	BAC05434	150	--IMGAEPDLFE---TNS---S-NIS-------L--------RNNYMP-SNH------GF	178
E*	BAB12249	153	--IMGAEPDLFE---TNS---S-NIS-------L--------RNNYMP-SNH------GF	181
E*	BAB3512	150	--IMGAEPDLFE---TNS---S-NIS-------L--------RNNYMP-SNH------GF	178
E*	S21178	150	--IMGAEPDLFE---TNS---S-NIS-------L--------RNNYMP-SNH------GF	178
E*	Q00496	150	--IMGAEPDLFE---TNS---S-NIS-------L--------RNNYMP-SNH------RF	178
A*	Q45894	153	--IIGPSADIIQ---FEC---K-SFG-------H--------DVLNL--TRN------GY	180
B**	AAB22656	160	--IFGPGPVLNE---NET---I-DIG-------I--------QNHFA--SRE------GF	187
C*	A4977	158	--ITGPRENIID---PET---S-TFK-------L--------TNNTFA-AQE------GF	186
C*	P18640	158	--ITGPRENIID---PET---S-TFK-------L--------TNNTFA-AQE------GF	186
B**	1F83A	159	--IFGPGPVLNE---NET---I-DIG-------I--------QNHFA--SRE------GF	186
B**	1F82A	159	--IFGPGPVLNE---NET---I-DIG-------I--------QNHFA--SRE------GF	186
C*	BAA89713	158	--ITGPRENIID---PET---S-TFK-------L--------TNNTFA-AQE------GF	186
C*	BAA08418	158	--ITGPRENIID---PET---S-TFK-------L--------TNNTFA-AQE------GF	186

Figure 34Eii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C*	A49928	158	--ITGPRENIID---PET---S-TFK-------L--------TNNTFA-AQE------GF	186
B*	BAC22064	160	--IFGPGPVLNE---NET---I-DIG-------I--------QNHFA--SRE------GF	187
E**	1906297A	150	--IMGAEPDLFE---TNS---S-NIS-------L--------RNNYMP-SNH------GF	178
Tet**	AAC37720	159	--IFGPGPVLNK---NEV---RGIVL-------R--------VD-----NKNYFPCRDGF	190
Tet*	NP_783831	159	--IFGPGPVLNK---NEV---RGIVL-------R--------VD-----NKNYFPCRDGF	190
G*	S39791	160	--IFGPGPVLSD---NFTDSMI-MNG-------H--------SP-----ISE------GF	187
E**	1906297B	150	--IMGAEPDLFE---TNS---S-NIS-------L--------RNNYMP-SNH------GF	178
E*	CAA37321	150	--IMGAEPDLFE---TNS---S-NIS-------L--------RNNYMP-SNH------GF	178
Tet	AAK72964	160	--IFGPGPVLNK---NEV---RGIVL-------R--------VD-----NKNYFPCRDGF	191
G*	Q60393	160	--IFGPGPVLSD---NFTDSMI-MNG-------H--------SP-----ISE------GF	187
A**	AA021363	152	--IIGPSADIIQ---FEC---K-SFG-------H--------EVLNL--TRN------GY	179
F*	AAA23210	155	--VLGAGPDIFE---NSS---Y-PVR-------KLMDSGGVYDP-----SND------GF	187
A*	CAA61124	153	--IIGPSADIIQ---FEC---K-SFG-------H--------EVLNL--TRN------GY	180
A*	AA166183	153	--IIGPSADIIQ---FEC---K-SFG-------H--------EVLNL--TRN------GY	180
E*	1717342A	150	--IMGAEPDLFE---TNS---S-NIS-------L--------RNNYMP-SNH------GF	178
F*	S33411	155	--ILGPGPNILE---CST---F-PVRIPFNNIAY--------DP-----SEK------GF	186
A**	3BTAA	152	--IIGPSADIIQ---FEC---K-SFG-------H--------EVLNL--TRN------GY	179
A*	CAA36289	153	--IIGPSADIIQ---FEC---K-SFG-------H--------EVLNL--TRN------GY	180
A*	P10845	153	--IIGPSADIIQ---FEC---K-SFG-------H--------EVLNL--TRN------GY	180
A*	BTCBLAB	153	--IIGPSADIIQ---FEC---K-SFG-------H--------EVLNL--TRN------GY	180
B/F*	CAA73972	155	--VLGAGPDIFKAYCTPL---V-RFN-------K--------SDKLIEPSNH------GF	187
B*	CAA77991	125	--IFGPGPVLNE---NET---I-DIG-------I--------QNHFA--SRE------GF	152
D*	AAB24244	156	VLIFGPLPNILD---YTA---S-LTL-------Q--------GQ-----QSNPSFE--GF	186
D*	AAB24244	156	VLIFGPLPNILD---YTA---S-LTL-------Q--------GQ-----QSNPSFE--GF	186
D*	S70582	156	VLIPGPLPNILD---YTA---S-LTL-------Q--------GQ-----QSNPSFE--GF	186

Figure 34Eiii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
D*	BAA75084	117	-------MGDSSTPEDT-----------FDFTRHTTNIAVEKFEN--GSWKVTNIITPS	155
D*	P19321	117	-------MGDSSTPEDT-----------FDFTRHTTNIAVEKFEN--GSWKVTNIITPS	155
F*	930996	125	IDEFS------------------------PVTRTTSVNIKLSTNV--ESSMLLNLL---	154

Figure 34Div

Toxin Sero-type	Accession No		Sequence Alignment	
B	CAA73971	171	--IFGPGSNIVE---NNT---V-FYK-------K--------ED-----AEN------GM	195
B/F	CAA72807	171	--IFGPGANIVE---NNT---V-FYK-------K--------ED-----AEN------GM	195
A/B/F	CAA55074	171	--IFGPGANIVE---NNT---V-FYK-------K--------ED-----AEN------GM	195
B	AAB64350	171	--IFGPGANIVE---NNT---V-FYK-------K--------ED-----AEN------GM	195
A/B	CAA61125	171	--IFGPGANIVE---NNT---V-FYK-------K--------ED-----AEN------GM	195
A	CAA74634	171	--IFGPGANIVE---NNT---V-FYK-------K--------ED-----AEN------GM	195
A	S68216	171	--IFGPGANIVE---NNT---V-FYK-------K--------ED-----AEN------GM	195
A	CAA63550	171	--IFGPGANIVE---NNT---V-FYK-------K--------ED-----AEN------GM	195
A	AAB42191	171	--IFGPGANIVE---NNT---V-FYK-------K--------ED-----AEN------GM	195
G	CAA1228	171	--IFGPGANIVE---NNT---V-FYK-------K--------ED-----AEN------GM	195
D	BAA90660	171	--IFGPGSNIVE---NNV---I-CYK-------K--------ND-----AEN------GM	195
C	BAA89712	171	--IFGPGSNIVE---NNV---I-CYK-------K--------ND-----AEN------GM	195
C	BAB71748	171	--IFGPGSNIVE---NNV---I-YYK-------K--------ND-----AEN------GM	195
D	BAA75083	171	--IFGPGSNIVE---NNV---I-YYK-------K--------ND-----AEN------GM	195
C	S46430	171	--IFGPGSNIVE---NNV---I-YYK-------K--------ND-----AEN------GM	195
D	AAB36016	171	--IFGPGSNIVE---NNV---I-YYK-------K--------ND-----AEN------GM	195
C	P46081	171	--IFGPGSNIVE---NNV---I-YYK-------K--------ND-----AEN------GM	195
A	JC4901	171	--IFGPGSNIVE---NNV---I-YYK-------K--------ND-----AEN------GM	195
?	BAA12299	171	--IFGPGSNIVE---NNV---I-YYK-------K--------ND-----AEN------GM	195
A	CAA74630	138	--IFGPGTNIVE---NNV---V-YYK-------K--------ED-----SKN------GM	162
A	CAA61123	138	--IFGPGTNIVE---NNV---V-YYK-------K--------ED-----SKN------GM	162
F	CAA67511	138	--IFGPGTNIVE---NNA---V-YYK-------K--------ED-----SEN------GM	162
F	CAA61233	138	--IFGPGTNIVE---NNA---I-YYK-------K--------ED-----SEN------GM	162
F	AAC60474	138	--IFGPGSNIVK---NNT---I-YYK-------K--------NF-----AEN------GM	162
F	I40644	138	--IFGPGSNIVK---NNT---I-YYK-------K--------NF-----AEN------GM	162

Figure 34Ei

(77) JP 2005-538954 A 2005.12.22

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	163	GTMSEIWFQP----------FLTYKY----------DQ----------	180
F	CAA72807	163	GTMCEVWFQP----------FLTYKY----------DQ----------	180
E	P46082	162	GTMLEIWFQP----------FLTHKY----------DE----------	179
E	A47708	162	GTMLEIWFQP----------FLTHKY----------DE----------	179
E	Q06366	162	GTMLEIWFQP----------FLTHKY----------DE----------	179
A	AAM75953	196	GT	197
B	I40631	188	GGIMQMKFCP----------EYVSVF----------NNVQENKGASIFNRRG	219
B	P10844	188	GGIMQMKFCP----------EYVSVF----------NNVQENKGASIFNRRG	219
B	1EPWA	187	GGIMQMKFCP----------EYVSVF----------NNVQENKGASIFNRRG	218
B*	AAL11498	188	GGIMQMKFCP----------EYVSVF----------NNVQENKGASIFNRRG	219
B*	AAK97132	188	GGIMQMKFCP----------EYVSVF----------NNVQENKGASIFNRRG	219
B/F*	CAA73968	186	GGIMQMKFCP----------EYVSVF----------NNVQENKGASIFNRRG	219
E*	P30995	179	GSIAIVTFSP----------EYSFRFKDNSM---------NE----------	201
E*	BAC05434	179	GSIAIVTFSP----------EYSFRFKDNSM---------NE----------	201
E*	BAB12249	182	GSIAIVTFSP----------EYSFRFKDNSM---------NE----------	204
E*	BAB3512	179	GSIAIVTFSP----------EYSFRFNDNSM---------NE----------	201
E*	S21178	179	GSIAIVTFSP----------EYSFRFNDNSM---------NE----------	201
E*	Q00496	179	GSIAIVTFSP----------EYSFRFNDNCM---------NE----------	201
A*	Q45894	181	GSTQYIRFSP----------DFTFGF----------EESLEVDTNPLLGAGK	212
B**	AAB22656	188	GGIMQMKFCP----------EYVSVF----------NNVQENKGASIFNRRG	219
C*	A4977	187	GALSIISISP----------RFMLTYSNATNDVGEGRFSKSE----------	218
C*	P18640	187	GALSIISISP----------RFMLTYSNATNDVGEGRFSKSE----------	218
B**	1F83A	187	GGIMQMKFCP----------EYVSVF----------NNVQENKGASIFNRRG	218
B**	1F82A	187	GGIMQMKFCP----------EYVSVF----------NNVQENKGASIFNRRG	218
C*	BAA89713	187	GALSIISISP----------RFMLTYSNATNNVGEGRFSKSE----------	218
C*	BAA08418	187	GALSIISISP----------RFMLTYSNATNNVGEGRFSKSE----------	218

Figure 34Fii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
C*	A49928	187	GALSIISISP----------RFMLTYSNATNDVGEGRFSKSE----------	218
B*	BAC22064	188	GGIMQMKFCP----------EYVSVF----------NNVQENKGASIFNRRG	219
E**	1906297A	179	GSIAIVTFSP----------EYSFRFKDNSM---------NE----------	201
Tet**	AAC37720	191	GSIMQMAFCPEYVPTFDNVIENITSLTIGK----------SK----------	222
Tet*	NP_783831	191	GSIMQMAFCPEYVPTFDNVIENITSLTIGK----------SK----------	222
G*	S39791	188	GARMMIRFCP----------SCLNVF----------NNVQENKDTSIFSRRA	219
E**	1906297B	179	GSIAIVTFSP----------EYSFRFNDNSM---------NE----------	201
E*	CAA37321	179	GSIAIVTFSP----------EYSFRFKDNSM---------NE----------	201
Tet	AAK72964	192	GSIMQMTFCPEYIPTFDNVIENITSLTIGK----------SK----------	223
G*	Q60393	188	GARMMIRFCP----------SCLNVF----------NNVQENKDTSIFSRRA	219
A**	AA021363	180	GSTQYIRFSP----------DFTFGF----------EESLEVDTNPLLGAGK	211
F*	AAA23210	188	GSINIVTFSP----------EYEYTFNDISGGYNSST---ES----------	216
A*	CAA61124	181	GSTQYIRFSP----------DFTFGF----------EESLEVDTNPLLGAGK	212
A*	AA166183	181	GSTQYIRFSP----------DFTFGF----------EESLEVDTNPLLGAGK	212
E*	1717342A	179	GSIAIVTFSP----------EYSFRFNDNSM---------NE----------	201
F*	S33411	187	GSIQLMSFST----------EYEYAFNDNT----------DL----------	208
A**	3BTAA	180	GSTQYIRFSP----------DFTFGF----------EESLEVDTNPLLGAGK	211
A*	CAA36289	181	GSTQYIRFSP----------DFTFGF----------EESLEVDTNPLLGAGK	212
A*	P10845	181	GSTQYIRFSP----------DFTFGF----------EESLEVDTNPLLGAGK	212
A*	BTCBLAB	181	GSTQYIRFSP----------DFTFGF----------EESLEVDTNPLLGAGK	212
B/F*	CAA73972	188	GSINILTFSP----------EYEHIFNDISGGNHNST---ES----------	216
B*	CAA77991	153	GGIMQMKFCP----------EYVSVF----------NNVQENKGASIFNRGG	184
D*	AAB24244	187	GTLSILKVAP----------EFLLTF----------SDVTSNQSSAVLGKSI	218
D*	AAB24244	187	GTLSILKVAP----------EFLLTF----------SDVTSNQSSAVLGKSI	218
D*	S70582	187	GTLSILKVAP----------EFLLTF----------SDVTSNQSSAVLGKSI	218
D*	BAA75084	187	GTLSILKVAP----------EFLLTF----------SDVTSNQSSAVLGKSI	218

Figure 34Fiii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
D*	BAA75084	156	VLIFGPLPNILD---YTA---S-LTL-------Q--------GQ-----QSNPSFE--GF	186
D*	P19321	156	VLIFGPLPNILD---YTA---S-LTL-------Q--------GQ-----QSNPSFE--GF	186
F*	930996	155	--VLGAGPDIFE---SCC---Y-PVR-------KLIDPDVVYDP-----SNY------GF	187

Figure 34Eiv

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	196	GTMTEIWFQP----------FLTYKY----------DQ----------	213
B/F	CAA72807	196	GTMTEIWFQP----------FLTYKY----------DE----------	213
A/B/F	CAA55074	196	GTMTEIWFQP----------FLTYKY----------DE----------	213
B	AAB64350	196	GTMTEIWFQP----------FLTYKY----------DE----------	213
A/B	CAA61125	196	GTMTEIWFQP----------FLTYKY----------DE----------	213
A	CAA74634	196	GTMTEIWFQP----------FLTYKY----------DE----------	213
A	S68216	196	GTMTEIWFQP----------FLTYKY----------DE----------	213
A	CAA63550	196	GTMTEIWFQP----------FLTYKY----------DE----------	213
A	AAB42191	196	GTMTEIWFQP----------FLTYKY----------DE----------	213
G	CAA1228	196	GTMABICFQP----------FLTYKY----------DQ----------	213
D	BAA90660	196	GTMAEILFQP----------LLTYKY----------NK----------	213
C	BAA89712	196	GTMAEILFQP----------LLTYKY----------NK----------	213
C	BAB71748	196	GTMAEIVFQP----------LLTYKY----------NK----------	213
D	BAA75083	196	GTMAEIVFQP----------LLTYKY----------NK----------	213
C	S46430	196	GTMAEIVFQP----------LLTYKY----------NK----------	213
D	AAB36016	196	GTMAEIVFQP----------LLTYKY----------NK----------	213
C	P46081	196	GTMAEIVFQP----------LLTYKY----------NK----------	213
A	JC4901	196	GTMAEIVFQP----------LLTYKY----------NK----------	213
?	BAA12299	196	GTMAEIVFQP----------LLTYKY----------NK----------	213
A	CAA74630	163	GTMSEIWFQP----------FLTYKY----------DQ----------	180
A	CAA61123	163	GTMSEIWFQP----------FLTYKY----------DQ----------	180
F	CAA67511	163	GTMSEIWFQP----------FLTYKY----------DQ----------	180
F	CAA61233	163	GTMSEIWFQP----------FLTYKY----------GQ----------	180
F	AAC60474	163	GTMAEILFQP----------LLTYKY----------NQ----------	180
F	I40644	163	GTMAEILFQP----------FLTYKY----------NQ----------	180

Figure 34Fi

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	181	FYVDPALELIKCLIKSLYYLYG--IK-PSDDLSIPYRLRSEL-WNSEYSQ----LDIVDF	232
F	CAA72807	181	FYNDPALELIKCLIKSLYYLYG--IK-PSDDLSIPYRLRSEF-NYLEYSE----LDIIDF	232
E	P46082	180	FYVDPALELIKCLIKSLYYLYG--IK-PNDNLNIPYRLRNEF-NSLEYSE----LNMIDF	231
E	A47708	180	FYVDPALELIKCLIKSLYYLYG--IK-PNDNLNIPYRLRNEF-NSLEYSE----LNMIDF	231
E	Q06366	180	FYVDPALELIKCLIKSLYYLYG--IK-PNDNLNIPYRLRNEF-NSLEYSE----LDMIDF	231
B	I40631	220	YFSDPALILMHELIHVLHGLYG--IK-VDDLPIVPNEKKFFM-QSTDTIQ----AE--EL	269
B	P10844	220	YFSDPALILMHELIHVLHGLYG--IK-VDDLPIVPNEKKFFM-QSTDAIQ----AE--EL	269
B	1EPWA	219	YFSDPALILMHELIHVLHGLYG--IK-VDDLPIVPNEKKFFM-QSTDAIQ----AE--EL	268
B*	AAL11498	220	YFSDPALILMHELIHVLHGLYG--IK-VNDLPIVPNEKKFFM-QSTDAIQ----AE--EL	269
B*	AAK97132	220	YFSDPALILMHELIHVLHGLYG--IK-VNDLPIVPNEKKFFM-QSTDAIQ----AE--EL	269
B/F*	CAA73968	220	YFSDPALILMHELIHVLHGLYG--IK-VNDLPIVPNEKKFFM-QSTDAIQ----AE--EL	269
E*	P30995	202	FIQDPALTLMHELIHSLHGLYG--AK-GITTKYTITQKQNPLITNIRGT------NIEEF	252
E*	BAC05434	202	FIQDPALTLMHELIHSLHGLYG--AK-GITTKYTITQKQNPLITNIRGT------NIEEF	252
E*	BAB12249	205	FIQDPALTLMHELIHSLHGLYG--AK-GITTKYTITQKQNPLITNIRGT------NIEEF	255
E*	BAB33512	202	FIQDPALTLMHELIHSLHGLYG--AK-GITTKYTITQKQNPLITNIRGT------NIEEF	252
E*	S21178	202	FIQDPALTLMHELIHSLHGLYG--AK-GITTKYTITQKQNPLITNIRGT------NIEEF	252
E*	Q00496	202	FIQDPALTLMHELIHSLHGLYG--AK-GITTKYTITQKQNPLITNIRGT------NIEEF	252
A*	Q45894	213	FATDPAVTLAHELIHAEHRLYGIAIN-PNRVFKVNTNAYYEM-SGLEVS-------FEEL	263
B**	AAB22656	220	YFSDPALILMHELIHVLHGLYG--IK-VDDLPIVPNEKKFFM-QSTDAIQ----AE--EL	269
C*	A4977	219	FCMDPILILMHELNHAMHNLYG--IA-IPNDQTI----SSVT-SNIFYSQ----YNV	263
C*	P18640	219	FCMDPILILMHELNHAMHNLYG--IA-IPNDQTI----SSVT-SNIFYSQ----YNV	263
B**	1F83A	219	YFSDPALILMHELIHVLHGLYG--IK-VDDLPIVPNEKKFFM-QSTDAIQ----AE--EL	268
B**	1F82A	219	YFSDPALILMHELIHVLHGLYG--IK-VDDLPIVPNEKKFFM-QSTDAIQ----AE--EL	268
C*	BAA89713	219	FCMDPILILMHELNHAMHNLYG--IA-IPND----QRISSVT-SNIFYSQ----YKV	263
C*	BAA08418	219	FCMDPILILMHELNHTMHNLYG--IA-IPND----QRISSVT-SNIFYSQ----YKV	263
C*	A49928	219	FCMDPILILMHELNHAMHNLYG--IA-IPNDQTI----SSVT-SNIFYSQ----YNV	263

Figure 34Gii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B*	BAC22064	220	YFSDPALILMHELIHVLHGLYG--IK-VDDLPIVPNEKKFFM-QSTDAIQ----AE--EL	269
E**	1906297A	202	FIQDPALTLMHELIHSLHGLYG--AK-GITTMYTITQKQNPLITNIRGT------NIEEF	252
Tet**	AAC37720	223	YFQDPALLLMHELIHVLHGLYG--MQ-VSSHEIIPS--KQEI-YMQHTYP----ISAEEL	272
Tet*	NP_783831	223	YFQDPALLLMHELIHVLHGLYG--MQ-VSSHEIIPS--KQEI-YMQHTYP----ISAEEL	272
G*	S39791	220	YFADPALTLMHELIHVLHGLYG--IK-ISNLPITPNTKEFFM-QHSDPVQ----AE--EL	269
E**	1906297B	202	FIQDPALTLMHELIHSLHGLYG--AK-GITTMYTITQKQNPLITNIRGT------NIEEF	252
E*	CAA37321	202	FIQDPALTLMHELIHSLHGLYG--AK	225
Tet	AAK72964	224	YFQDPALLLMHELIHVLHGLYG--MQ-VSSHSIIPS--KQEI-YMQHTYP----ISAEEL	273
G*	Q60393	220	YFADPALTLMHELIHVLHGLYG--IK-ISNLPITPNTKEFFM-QHSDPVQ----AE--EL	269
A**	AA021363	212	FATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAIN-PNRVFKVNTNAYYEM-SGLEVS-------FEEL	262
F*	AAA23210	217	FIADPAISLAHELIHALHGLYG--AR	240
A*	CAA61124	213	FATDPAVTLAHELIHAGHRLYG--I	235
A*	AA166183	213	FATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAIN-PNRVFKVNTNAYYEM-SGLEVS-------FEEL	263
E*	1717342A	202	FIQDPALTLMHELIHSLHGLYG--AK	225
F*	S33411	209	FIADPAISLAHELIHVLHGLYG--AK	232
A**	3BTAA	212	FATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAIN-PNRVFKVNTNAYYEM-SGLEVS-------FEEL	262
A*	CAA36289	213	FATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAIN-PNRVFKVNTNAYYEM-SGLEVS-------FEEL	263
A*	P10845	213	FATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAIN-PNRVFKVNTNAYYEM-SGLEVS-------FEEL	263
A*	BTCBLAB	213	FATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAIN-PNRVFKVNTNAYYEM-SGLEVS-------FEEL	263
B/F*	CAA73972	217	FIADPAISLAHELIHALHGLYG--AK	240
B*	CAA77991	185	YFSDPSLILMHELIHVLHGLYG--IK-VDD	211
D*	AAB24244	219	FCMDPVIALMHELTHSLHQLYG--INIPSDK-----RIRPQV-SEGPFSQDGPNVQFEEL	270
D*	AAB24244	219	FCMDPVIALMHELTHSLHQLYG--INIPSDKRIRP	251

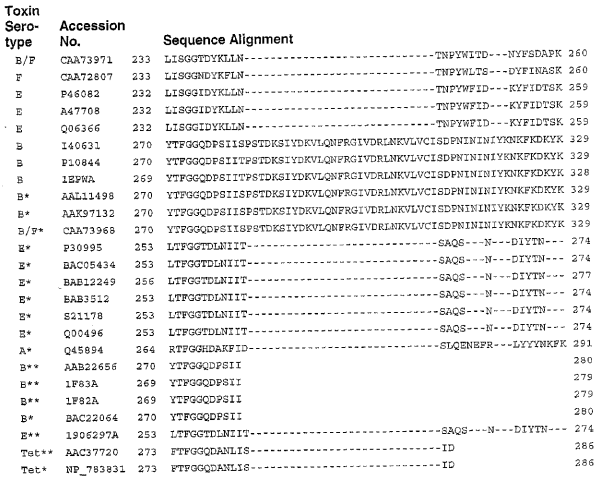
Figure 34Giii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
D*	P19321	187	GTLSILKVAP----------EFLLTF----------SDVTSNQSSAVLGKSI	218
F*	930996	188	GSINIVTFSP----------EYEYTFNDISGGHNSST---ES----------	216

Figure 34Fiv

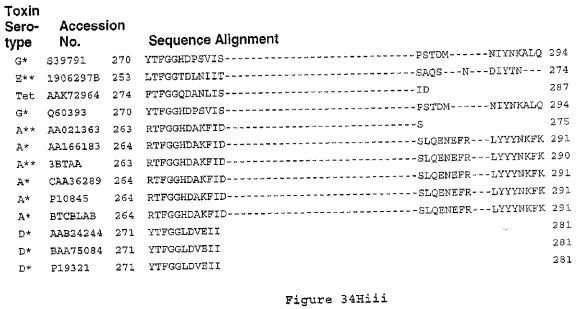
Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	214	FYIDPAIELMKCLIKSLYFLYG--IK-PSDDLVVPYRLRNEL-EMIEYSQ----LNIVDL	265
B/F	CAA72807	214	FYIDPAIELIKCLIKSLYFLYG--IK-PSDDLVIPYRLRSEL-ENIEYSQ----LNIVDL	265
A/B/F	CAA55074	214	FYIDPAIELIKCLIKSLYFLYG--IK-PSDDLVIPYRLRSEL-ENIEYSQ----LNIVDL	265
B	AAB64350	214	FYIDPAIELIKCLIKSLYFLYG--IK-PSDDLVIPYRLRSEL-ENIEYSQ----LNIVDL	265
A/B	CAA61125	214	FYIDPAIELIKCLIKSLYFLYG--IK-PSDDLVIPYRLRSEL-ENIEYSQ----LNIVDL	265
A	CAA74634	214	FYIDPAIELIKCLIKSLYFLYG--IK-PSDDLVIPYRLRSEL-ENIEYSQ----LNIVDL	265
A	S68216	214	FYIDPAIELIKCLIKSLYFLYG--IK-PSDDLVIPYRLRSEL-ENIEYSQ----LNIVDL	265
A	CAA63550	214	FYIDPAIELIKCLIKSLYFLYG--IK-PSDDLVIPYRLRSEL-ENIEYSQ----LNIVDL	265
A	AAB42191	214	FYIDPAIELIKCLIKSLYFLYG--IK-PSDDLVIPYRLRSEL-ENIEYSQ----LNIVDL	265
G	CAA1228	214	FYVDPALELMECLIKSLYFLYG--IK-PNMNLTVPYRLRNEL-SNIEFSQ----LSIVDL	265
D	BAA90660	214	FYIDPAMELTKCLIKSLYFLYG--IK-PSDDLVVPYRLRTEL-DNKQFSQ----LNIIDL	265
C	BAA89712	214	FYIDPAMELTKCLIKSLYFLYG--IK-PSDGLVVPYRLRTEL-DNKQFSQ----LNIIDL	265
C	BAB71748	214	FYIDPAMELTKCLIKSLYFLYG--IK-PSDNLVVPYRLRTEL-DNKQFSQ----LNIIDL	265
D	BAA75083	214	FYIDPAMELTKCLIKSLYFLYG--IK-PSDNLVVPYRLRTEL-DNKQFSQ----LNIIDL	265
C	S46430	214	FYIDPAMELTKCLIKSLYFLYG--IK-PSDNLVVPYRLRTEL-DNKQFSQ----LNIIDL	265
D	AAB36016	214	FYIDPAMELTKCLIKSLYFLYG--IK-PSDNLVVPYRLRTEL-DNKQFSQ----LNIIDL	265
C	P46081	214	FYIDPAMELTKCLIKSLYFLYG--IK-PSDNLVVPYRLRTEL-DNKQFSQ----LNIIDL	265
A	JC4901	214	FYIDPAMELTKCLIKSLYFLYG--IK-PSGNLVVPYRLRTEL-DNKQFSQ----LNIIDL	265
?	BAA12299	214	FYIDPAMELTKCLIKSLYFLYG--IK-PSGNLVVPYRLRTEL-DNKQFSQ----LNIIDL	265
A	CAA74630	181	FYVDPALELIKCLIKSLYYLYG--IK-PNDDLSIPYRLRSEF-NSLEYSE----LDMVDF	232
A	CAA61123	181	FYVDPALELIKCLIKSLYYLYG--IK-PNDDLSIPYRLRSEP-NSLEYSE----LDMVDF	232
F	CAA67511	181	FYVDPALELIKCLIKSLYYLYG--IK-PSDDLSIPYRLRSEL-NSLKYSE----LDMVDF	232
F	CAA61233	181	FYVDPALELIKCLIKSLYYLYG--IK-PSDDLSIPYRLRSEL-NSFEYSE----LDMIDF	232
F	AAC60474	181	FYADPALELIKCLIKAIYFLYG--IK-PNDNLNIPYRLRNEF-SNVEYSE----LNIIDF	232
F	I40644	181	FYADPALELIKCLIKAIYFLYG--IK-PNDNLNIPYRLRNEF-SNVEYSE----LNIIDF	232

Figure 34Gi



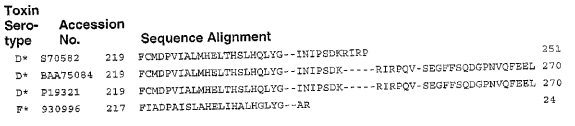
Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	233	LISGGTDYKLLN----------TNPYWITD---NYFSDAPK	260
F	CAA72807	233	LISGGNDYKFLN----------TNPYWLTS---DYFINASK	260
E	P46082	232	LISGGIDYKLLN----------TNPYWFID---KYFIDTSK	259
E	A47708	232	LISGGIDYKLLN----------TNPYWFID---KYFIDTSK	259
E	Q06366	232	LISGGIDYKLLN----------TNPYWFID---KYFIDTSK	259
B	I40631	270	YTFGGQDPSIISPSTDKSIYDKVLQNFRGIVDRLNKVLVCISDPNININIYKNKFKDKYK	329
B	P10844	270	YTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFRGIVDRLNKVLVCISDPNININIYKNKFKDKYK	329
B	1EPWA	269	YTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFRGIVDRLNKVLVCISDPNININIYKNKFKDKYK	328
B*	AAL11498	270	YTFGGQDPSIISPSTDKSIYDKVLQNFRGIVDRLNKVLVCISDPNININIYKNKFKDKYK	329
B*	AAK97132	270	YTFGGQDPSIISPSTDKSIYDKVLQNFRGIVDRLNKVLVCISDPNININIYKNKFKDKYK	329
B/F*	CAA73968	270	YTFGGQDPSIISPSTDKSIYDKVLQNFRGIVDRLNKVLVCISDPNININIYKNKFKDKYK	329
E*	P30995	253	LTFGGTDLNIIT----------SAQS---N---DIYTN---	274
E*	BAC05434	253	LTFGGTDLNIIT----------SAQS---N---DIYTN---	274
E*	BAB12249	256	LTFGGTDLNIIT----------SAQS---N---DIYTN---	277
E*	BAB3512	253	LTFGGTDLNIIT----------SAQS---N---DIYTN---	274
E*	S21178	253	LTFGGTDLNIIT----------SAQS---N---DIYTN---	274
E*	Q00496	253	LTFGGTDLNIIT----------SAQS---N---DIYTN---	274
A*	Q45894	264	RTFGGHDAKFID----------SLQENEFR---LYYYNKFK	291
B**	AAB22656	270	YTFGGQDPSII	280
B**	1F83A	269	YTFGGQDPSII	279
B**	1F82A	269	YTFGGQDPSII	279
B*	BAC22064	270	YTFGGQDPSII	280
E**	1906297A	253	LTFGGTDLNIIT----------SAQS---N---DIYTN---	274
Tet**	AAC37720	273	FTFGGQDANLIS----------ID	286
Tet*	NP_783831	273	FTFGGQDANLIS----------ID	286

Figure 34Hii



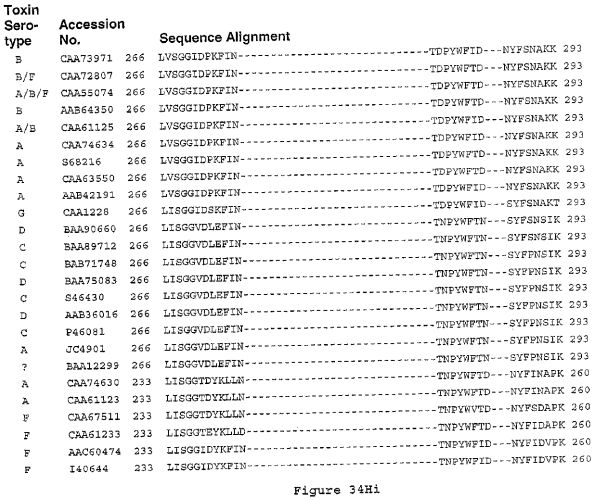
Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
G*	S39791	270	YTFGGHDPSVIS----------PSTDM------NIYNKALQ	294
E**	1906297B	253	LTFGGTDLNIIT----------SAQS---N---DIYTN---	274
Tet	AAK72964	274	FTFGGQDANLIS----------ID	287
G*	Q60393	270	YTFGGHDPSVIS----------PSTDM------NIYNKALQ	294
A**	AA021363	263	RTFGGHDAKFID----------S	275
A*	AA166183	264	RTFGGHDAKFID----------SLQENEFR---LYYYNKFK	291
A**	3BTAA	263	RTFGGHDAKFID----------SLQENEFR---LYYYNKFK	290
A*	CAA36289	264	RTFGGHDAKFID----------SLQENEFR---LYYYNKFK	291
A*	P10845	264	RTFGGHDAKFID----------SLQENEFR---LYYYNKFK	291
A*	BTCBLAB	264	RTFGGHDAKFID----------SLQENEFR---LYYYNKFK	291
D*	AAB24244	271	YTFGGLDVEII	281
D*	BAA75084	271	YTFGGLDVEII	281
D*	P19321	271	YTFGGLDVEII	281

Figure 34Hiii



Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
D*	S70582	219	FCMDPVIALMHELTHSLHQLYG--INIPSDKRIRP	251
D*	BAA75084	219	FCMDPVIALMHELTHSLHQLYG--INIPSDK-----RIRPQV-SEGFFSQDGPNVQFEEL	270
D*	P19321	219	FCMDPVIALMHELTHSLHQLYG--INIPSDK-----RIRPQV-SEGFFSQDGPNVQFEEL	270
F*	930996	217	FIADPAISLAHELIHALHGLYG--AR	24

Figure 34Giv



Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	266	LVSGGIDPKFIN----------TDPYWFID---NYFSNAKK	293
B/F	CAA72807	266	LVSGGIDPKFIN----------TDPYWFTD---NYFSNAKK	293
A/B/F	CAA55074	266	LVSGGIDPKFIN----------TDPYWFTD---NYFSNAKK	293
B	AAB64350	266	LVSGGIDPKFIN----------TDPYWFTD---NYFSNAKK	293
A/B	CAA61125	266	LVSGGIDPKFIN----------TDPYWFID---NYFSNAKK	293
A	CAA74634	266	LVSGGIDPKFIN----------TDPYWFID---NYFSNAKK	293
A	S68216	266	LVSGGIDPKFIN----------TDPYWFTD---NYFSNAKK	293
A	CAA63550	266	LVSGGIDPKFIN----------TDPYWFTD---NYFSNAKK	293
A	AAB42191	266	LVSGGIDPKFIN----------TDPYWFID---NYFSNAKK	293
G	CAA1228	266	LISGGIDSKFIN----------TDPYWFID---SYFSNAKT	293
D	BAA90660	266	LISGGVDLEFIN----------TNPYWFTN---SYFSNSIK	293
C	BAA89712	266	LISGGVDLEFIN----------TNPYWFTN---SYFSNSIK	293
C	BAB71748	266	LISGGVDLEFIN----------TNPYWFTN---SYFPNSIK	293
D	BAA75083	266	LISGGVDLEFIN----------TNPYWFTN---SYFPNSIK	293
C	S46430	266	LISGGVDLEFIN----------TNPYWFTN---SYFPNSIK	293
D	AAB36016	266	LISGGVDLEFIN----------TNPYWFTN---SYFPNSIK	293
C	P46081	266	LISGGVDLEFIN----------TNPYWFTN---SYFPNSIK	293
A	JC4901	266	LISGGVDLEFIN----------TNPYWFTN---SYFPNSIK	293
?	BAA12299	266	LISGGVDLEFIN----------TNPYWFTN---SYFPNSIK	293
A	CAA74630	233	LISGGTDYKLLN----------TNPYWFTD---NYFINAPK	260
A	CAA61123	233	LISGGTDYKLLN----------TNPYWFTD---NYFINAPK	260
F	CAA67511	233	LISGGTDYKLLN----------TNPYWVTD---NYFSDAPK	260
F	CAA61233	233	LISGGTEYKLLD----------TNPYWFTD---NYFIDAPK	260
F	AAC60474	233	LISGGIDYKFIN----------TNPYWFID---NYFIDVPK	260
F	I40644	233	LISGGIDYKFIN----------TNPYWFID---NYFIDVPK	260

Figure 34Hi

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
A*	P10845	292	DIASTLNKAK--SIV-GTTASLQYMKN-----VFKEKYLLSEDTS--GKFSVDKLKFDKL	341
A*	BTCBLAB	292	DIASTLNKAK--SIV-GTTASLQYMKN-----VFKEKYLLSEDTS--GKFSVDKLKFDKL	341

Figure 34Iiii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	294	VFEDHRNIYK--TEVEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFRI--NTN--DIWELNLNYFSKE	342
B/F	CAA72807	294	VFEDHRNIYE--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFRI--NIN--DIWELNLNYFSKE	342
A/B/F	CAA55074	294	VFEDHRNIYE--TQIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFRI--NIN--DIWELNLNYFSKE	342
B	AAB64350	294	VFEDHRNIYE--TQIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFRI--NIN--DIWELNLNYFSKE	342
A/B	CAA61125	294	VFEDHRNIYE--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFRI--NIN--DIWELNLNYFSKE	342
A	CAA74634	294	VFEDHRNIYE--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFRI--NIN--DIWELNLNYFSKE	342
A	S68216	294	VFEDHRNIYE--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFRI--NIN--DIWELNLNYFSKE	342
A	CAA63550	294	VFEDHRNIYE--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFRI--NIN--DIWGLNLNYFSKE	342
A	AAB42191	294	VFEDHRNIYE--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFRI--NIN--DIWELNLNYFSKE	342
G	CAA1228	294	TFEEHKSIYE--TEIKGNNAIGNDIKL-----RLKQKFQT--TVH--DIWQLNLDYFSKE	342
D	BAA90660	294	MFEKYKNIYE--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFQN--SVQ--DIWNLNLNYFSKE	342
C	BAA89712	294	MFEKYKNIYE--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLRQKFQN--SVQ--DIWNLNLNYFSKE	342
C	BAB71748	294	MFEKYKNIYK--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFQI--NVQ--DIWNLNLNYFCQS	342
D	BAA75083	294	MFEKYKNIYK--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFQI--NVQ--DIWNLNLNYFCQS	342
C	S46430	294	MFEKYKNIYK--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFQI--NVQ--DIWNLNLNYFCQS	342
D	AAB36016	294	MFEKYKNIYK--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFQI--NVQ--DIWNLNLNYFCQS	342
C	P46081	294	MFEKYKNIYK--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFQI--NVQ--DIWNLNLNYFCQS	342
A	JC4901	294	MFEKYKNIYK--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFQI--NVQ--DIWNLNLNYFCQS	342
?	BAA12299	294	MFEKYKNIYK--TEIEGNNAIGNDIKL-----RLKQKFQI--NVQ--DIWNLNLNYFCQS	342
A	CAA74630	261	NFEKYKNDYE--TKIKNNNDIANSIKL-----YLEQKFKT--NVQ--DIWELNLSYFSTE	309
A	CAA61123	261	NFEKYKNDYE--TKIKNNNDIANSIKL-----YLEQKFKT--NVQ--DIWELNLSYFSTE	309
F	CAA67511	261	NFEKYKNDYE--TKIKNNNDIANSIKL-----YLEQKFKI--NAQ--DIWELNLSYLSTE	309
F	CAA61233	261	NFEKYKNDYE--TKIKNNNDIANSIKL-----YLEQKFKT--NAQ--DIWELNLSYFSTE	309
F	AAC60474	261	VFEKHKNDYE--INIKNNSEIGTSIKL-----YLEQKFKT--NVQ--DIWELNLSYFSKE	309
F	I40644	261	VFEKHKNDYE--INIKNNSEIGTSIKL-----YLEQKFKT--NVQ--DIWELNLSYFSKE	309

Figure 34Ii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	343	FSIM-------MPDRFNNALKHFYRKQ--YYKI---------DYP---------ENYSI-	374
B/F	CAA72807	343	FSIM-------MPDRFNNALKHFYRKQ--YYKI---------DYP---------ENYSI-	374
A/B/F	CAA55074	343	FSIM-------MPDRFNNALKHFYRKQ--YYKI---------DYP---------ENYSI-	374
B	AAB64350	343	FSIM-------MPDRFNNALKHFYRKQ--YYKI---------DYP---------ENYSI-	374
A/B	CAA61125	343	FSIM-------MPDRFNNALKHFYRKQ--YYKI---------DYP---------ENYSI-	374
A	CAA74634	343	FSIM-------MPDRFNNALKHFYRKQ--YYKI---------DYP---------ENYSI-	374
A	S68216	343	FSIM-------MPDRFNNALKHFYRKQ--YYKI---------DYP---------ENYSI-	374
A	CAA63550	343	FSIM-------MPDRFNNALKHFYRKQ--YYKI---------DYP---------ENYSI-	374
A	AAB42191	343	FSIM-------MPDRFNNALKHFYRKQ--YYKI---------DYP---------ENYSI-	374
G	CAA1228	343	FQIM-------MPYRFNNALKYYYRKE--YYKI---------DYP---------EKYSI-	374
D	BAA90660	343	FNSI-------IPDRFSNALKHFYRKQ--YYTM---------DYG---------DNYNI-	374
C	BAA89712	343	FNSI-------IPDRFSNALKHFYRKQ--YYTM---------DYT---------DNYNI-	374
C	BAB71748	343	FNSI-------IPDRFSNALKHFYRKQ--YYTM---------DYT---------DNYNI-	374
D	BAA75083	343	FNSI-------IPDRFSNALKHFYRKQ--YYTM---------DYT---------DNYNI-	374
C	S46430	343	FNSI-------IPDRFSNALKHFYRKQ--YYTM---------DYT---------DNYNI-	374
D	AAB36016	343	FNSI-------IPDRFSNALKHFYRKQ--YYTM---------DYT---------DNYNI-	374
C	P46081	343	FNSI-------IPDRFSNALKHFYRKQ--YYTM---------DYT---------DNYNI-	374
A	JC4901	343	FNSI-------IPDRFSNALKHFYRKQ--YYTM---------DYT---------DNYNI-	374
?	BAA12299	343	FNSI-------IPDRFSNALKHFYRKQ--YYTM---------DYT---------DNYNI-	374
A	CAA74630	310	FEIM-------MPEIFNNALNHYYRKE--YYVI---------DYF---------KNYNI-	341
A	CAA61123	310	FEIM-------MPEIFNNALNHYYRKE--YYVI---------DYF---------KNYNI-	341
F	CAA67511	310	FEIM-------MPEIFNNALNHYYRKE--YYVI---------DYF---------KNYNI-	341
F	CAA61233	310	FEIM-------MPEIFNNALNHYYRKE--YYVI---------DYF---------KNYNI-	341
F	AAC60474	310	FQIM-------MPEKHNNALKHYYRKE--YYKI---------NYS---------KQYDI-	341
F	I40644	310	FQIM-------MPEKHNNALKHYYRKE--YYKI---------NYS---------KQYDI-	341

Figure 34Ji

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	261	NFEKYKNDYE--TKIKNNNDIANSIKL-----YLEQKFKI--NAQ--NIWELNLSYFSKE	309
F	CAA72807	261	NFEKYKNYYE--TKVKNNNDISNSIKL-----YLEQKFKT--NVQ--DIWELNLSYFSKE	309
E	P46082	260	NFEKYKNDYE--IKIKNNNYIANSIKL-----YLEQKFKI--NVK--DIWELNLSYFSKE	308
E	A47708	260	NFEKYKNDYE--IKIKNNNYIANSIKL-----YLEQKFKI--NVK--DIWELNLSYFSKE	308
E	Q06366	260	NFEKYKNDYE--IKIKNNNYIANSIKL-----YLEQKFKI--NVK--DIWELNLSYFSKE	308
B	I40631	330	FVEDSEGKYS--IDVESFNKLYKSLML-----GPTE-INI--AEN--YKIKTRASYFSDS	377
B	P10844	330	FVEDSEGKYS--IDVESFDKLYKSLMF-----GPTET-NI--AEN--YKIKTRASYFSDS	376
B	1EPWA	329	FVEDSEGKYS--IDVESFDKLYKSLMF-----GPTET-NI--AEN--YKIKTRASYFSDS	377
B*	AAL11498	330	FVEDSEGKYS--IDVESFDKLYKSLMF-----GPTET-NI--AEN--YKIKTRASYFSDS	377
B*	AAK97132	330	FVEDSEGKYS--IDVESFDKLYKSLMF-----GPTET-NI--AEN--YKIKTRAAYFSDS	377
B/F*	CAA73968	330	FVEDSEGKYS--IDVESFDKLYKSLMF-----GPTET-NI--AEN--YKIKTRAAYFSDS	377
E*	P30995	275	LLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKD-----VFEAKYGLDKDAS--GIYSVNINKFNDI	327
E*	BAC05434	275	LLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKD-----VFEAKYGLDKDAS--GIYSVNINKFNDI	327
E*	BAB12249	278	LLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKD-----VFEAKYGLDKDAS--GIYSVNINKFNDI	330
E*	BAB3512	275	LLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKD-----VFEAKYGL--DKDASGIYSVNINKFNDI	327
E*	S21178	275	LLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKD-----VFEAKYGLDKDAS--GIYSVNINKFNDI	327
E*	Q00496	275	LLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKD-----VFEAKYGLDKDAS--GIYSVNINKFNDI	327
A*	Q45894	292	DVASTLNKAK--S-IIGTTASLQYMKN-----VFKEKYLLSEDTS--GKFSVDKLKFDKL	341
E**	1906297A	275	LLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKD-----VFEAKYGL--DKDASGIYSVNINKFNDI	327
G*	S39791	295	NFQDIANRLN--I-VSSAQGSGIDISLYKQIYKNKYDFVE--DPN--GKYSVDKDKFDKL	347
E**	1906297B	275	LLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKD-----VFEAKYGL--DKDASGIYSVNINKFNDI	327
G*	Q60393	295	NFQDIANRLN--I-VSSAQGSGIDISLYKQIYKNKYDFVE--DPN--GKYSVDKDKFDKL	347
A*	AA166183	292	DIASTLNKAK--SIV-GTTASLQYMKN-----VFKEKYLLSEDTS--GKFSVDKLKFDKL	341
A**	3BTAA	291	DIASTLNKAK--SIV-GTTASLQYMKN-----VFKEKYLLSEDTS--GKFSVDKLKFDKL	340
A*	CAA36289	292	DIASTLNKAK--SIV-GTTASLQYMKN-----VFKEKYLLSEDTS--GKFSVDKLKFDKL	341

Figure 34Iii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
F	CAA72807	342	SGF----------VNGQ---INTRLPLSKYNKDI----------ISK----------	365
E	P46082	341	NGF----------KNGQ---IKTKLPLSKYNKEI----------INK----------	364
E	A47708	341	NGF----------KNGQ---IKTKLPLSKYNKEI----------INK----------	364
E	Q06366	341	NGF----------KNGQ---IKTKLPLSKYNKEI----------INK----------	364
B	I40631	403	KNMGKEYRG----QNKA---INKQAYEEISKEHLAVYKIQMCKSVKV----------	442
B	P10844	403	KDMEKEYRG----QNKA---INKQAYEEISKEHL----------AVY----------	432
B	1EPWA	402	KDMEKEYRG----QNKA---INKQAYEEISKEHL----------AVY----------	431
B*	AAL11498	403	KNMEKEYRG----QNKA---INKQAYEEISKEHL----------AVY----------	432
B*	AAK97132	403	KNMEKEYRG----QNKA---INKQAYEEISKEHL----------AVY----------	432
B/F*	CAA73968	403	KNMEKEYRG----QNKA---INKQAYEEISKEHL----------AVY----------	432
E*	P30995	378	NNLKVNFRG----QNAN---LNPRIITPITGRGL----------VKKIIRFCKNIVSVKG	420
E*	BAC05434	378	NNLKVNFRG----QNAN---LNPRIITPITGRGL----------VKKIIRFCKNIVSVKG	420
E*	BAB12249	381	NNLKVNFRG----QNAN---LNPRIITPITGRGL----------VKKIIRFCKNIVSVKG	423
E*	BAB3512	378	NNLKVNFRG----QNAN---LNPRIITPITGRGL----------VKKIIRPCKNIVSVKG	420
E*	S21178	378	NNLKVNFRG----QNAN---LNPRIITPITGRGL----------VKKIIRFCKNIVSVKG	420
E*	Q00496	378	NNLKVNFRG----QNAN---LNPRIITPITGRGL----------VKKIIRFCKNIVSVKG	420
A*	Q45894	388	DGFNLKGANLSTNFNGQNTEINSRNFTRLKN------------FTG----------	421

Figure 34Jiv

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	310	FQIM-------MPERYNNALNHYYKKE--YYGI---------DYF---------RNYNI-	341
F	CAA72807	310	FQIM-------MPERYNNALNHYYKKE--YYMI---------DYF---------KNYNI-	341
E	P46082	309	FQIM-------MPERYNNALNHYYRKE--FYVI---------DYF---------KNYNI-	340
E	A47708	309	FQIM-------MPERYNNALNHYYRKE--FYVI---------DYF---------KNYNI-	340
E	Q06366	309	FQIM-------MPERYNNALNHYYRKE--FYVI---------DYF---------KNYNI-	340
B	I40631	378	LP----------PVKIKNLLDN----E--IYTI---------EEG---------FNISD-	402
B	P10844	378	LP----------PVKIKNLLDN----E--IYTI---------EEG---------PNISD-	402
B	1EPWA	377	LP----------PVKIKNLLDN----E--IYTI---------EEG---------PNISD-	401
B*	AAL11498	378	LP----------PVKIKNLLDN----E--IYTI---------EEG---------PNISD-	402
B*	AAK97132	378	LP----------PVKIKNLLDN----E--IYTI---------EEG---------PNISD-	402
B/F*	CAA73968	378	LP----------PVKIKNLLDN----E--IYTI---------EEG---------PNISD-	402
E*	P30995	328	FKKLYSFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQYKYFKLSNLLNDSIYNIS---------EGYNI-	377
E*	BAC05434	328	FKKLYSFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQYKYFKLSNLLNDSIYNIS---------EGYNI-	377
E*	BAB12249	331	FKKLYSFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQYKYFKLSNLLNDSIYNIS---------EGYNI-	380
E*	BAB3512	328	FKKLYSFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQVKYFKLSNLLNDSIYNIS---------EGYNI-	377
E*	S21178	328	FKKLYSFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQYKYFKLSNLLNDSIYNIS---------EGYNI-	377
E*	Q00496	328	FKKLYSFTEFDLRTKFQVKCRQTYIGQYKYFKLSNLLNDSIYNIS---------EGYNI-	377
A*	Q45894	342	YKMLTEIY---TEDNFVNFFKVINRKT--YLNF---------DKAVFRINIVPDENYTIK	387
B**	1906297A	328	F	328
G*	S39791	348	YKAL-------M	352
E**	1906297B	328	F	328
G*	Q60393	348	YKAL-------M	352
A*	AA166183	342	YKMLTEIY---TEDNFVKFFKVLNRKT--YLNF---------D	370
A**	3BTAA	341	YKMLTEIY---TEDNFVKFFKVLNRKT--YLNF---------D	369
A*	CAA36289	342	YKMLTEIY---TEDNFVKFFKVLNRKT--YLNF---------D	370
A*	P10845	342	YKMLTEIY---TEDNFVKFFKVLNRKT--YLNF---------D	370
A*	BTCBLAB	342	YKMLTEIY---TEDNFVKFFKVLNRKT--YLNF---------D	370

Figure 34Jii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	399	--PEEIINLLN-GNNVSLMRSN---IYGDGLKSTVDDF---YSNYKIPYNRAYEYHFNNS	449
B/F	CAA72807	399	--PEEIINLLN-GNNVSLMRSN---IYGDGLKSTVDDF---YSNYKIPYNRAYEYHFNNS	449
A/B/F	CAA55074	399	--PEEIINLLN-GNNVSLMRSN---IYGDGLKSTVDDF---YSNYKIPYNRAYEYHFNNS	449
B	AAB64350	399	--PEEIINLLN-GNNVSLMRSN---IYGDGLKSTVDDF---YSNYKIPYNRAYEYHFNNS	449
A/B	CAA61125	399	--PEEIINLLN-GNNVSLMRSN---IYGDGLKSTVDDF---YSNYKIPYNRAYEYHFNNS	449
A	CAA74634	399	--PEEIINLLN-GNNVSLMRSN---IYGDGLKSTVDDF---YSNYKIPYNRAYEYHFNNS	449
A	S68216	399	--PEEIINLLN-GNNVSLMRSN---IYGDGLKSTVDDF---YSNYKIPYNRAYEYHFNNS	449
A	CAA63550	399	--PEEIINLLN-GNNVSLMRSN---IYGDGLKSTVDDF---YSNYKIPYNRAYEYHFNNS	449
A	AAB42191	399	--PEEIINLLN-GNNVSLMRSN---IYGDGLKSTVDDF---YSNYKIPYNRAYEYHFNNS	449
G	CAA1228	399	--PELIVNLIS-ENNISLMRSN---IYGDGLKYTTDNF---YSTYKIPYNRAYEYHFNNS	449
D	BAA90660	399	--PEKVVNLVN-ANNISLMKSN---IYGDGLKGTTEDF---YSTYKIPYNEEYEYRFNDS	449
C	BAA89712	399	--PEKVVNLVN-ENNISLMKSN---IYGDGLKGTTEDF---YSTYKIPYNEEYEYRFNDS	449
C	BAB71748	399	--PEKVVNLVN-ENNISLMKSN---IYGDGLKGTTEDF---YSTYKIPYNEEYEYRFNDS	449
D	BAA75083	399	--PEKVVNLVN-ENNISLMKSN---IYGDGLKGSTEDF---YSTYKIPYNEEYEYRFNDS	449
C	S46430	399	--PEKVVNLVN-ENNISLMKSN---IYGDGLKGTTEDF---YSTYKIPYNEEYEYRFNDS	449
D	AAB36016	399	--PEKVVNLVN-ENNISLMKSN---IYGDGLKGTTEDF---YSTYKIPYNEEYEYRFNDS	449
C	P46081	399	--PEKVVNLVN-ENNISLMKSN---IYGDGLKGTTEDF---YSTYKIPYNEEYEYRFNDS	449
A	JC4901	399	--PEKVVNLVN-ENNISLMKSN---IYGDGLKGTTEDF---YSTYKIPYDEEYEYRFNDS	449
?	BAA12299	399	--PEKVVNLVN-ENNISLMKSN---IYGDGLKGTTEDF---YSTYKIPYDEEYEYRFNDS	449
A	CAA74630	366	--PELIVNLIN-ENNSVLMKSN---IYGDGLKDTIGNF---YAVYKIPYNIGDEYHINSS	416
A	CAA61123	366	--PELIVNLIN-ENNSVLMKSN---IYGDGLKDTIGNF---YAVYKIPYNIGDEYHINYS	416
F	CAA67511	366	--PELIVNLIN-ENNSVLMKSN---VYGDGLKGTMNNF---YAVYKIPYNIGDEYHINYS	416
F	CAA61233	366	--PELVVNLIN-ENNTVLMKSN---VYGDGLKGTMDNF---YAAYKIPYNIGDEYHINYS	416
F	AAC60474	366	--PQLIINLINKSNNSLLMKSN---IYGDGLNGTTDNF---YRNYKIPDNIAYQYH---P	414
F	I40644	366	--PQLIINLINKSNNSLLMKSN---IYGDGLNGTTDNF---YRNYKIPDNIAYQYH---P	414

Figure 34Ki

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	375	NGF----------VNGQ---INAQDFLSDRNQDI----------INK----------	398
B/F	CAA72807	375	NGF----------VNGQ---INAQLSLSDRNQDI----------INK----------	398
A/B/F	CAA55074	375	NGF----------VNGQ---INVQLSLSDRNQDI----------INK----------	398
B	AAB64350	375	NGF----------VNGQ---INVQLSLSDRNQDI----------INK----------	398
A/B	CAA61125	375	NGF----------VNGQ---INAQLSLSDRNQDI----------INK----------	398
A	CAA74634	375	NGF----------VNGQ---INAQLSLSDRNQDI----------INK----------	398
A	S68216	375	NGF----------VNGQ---INAQLSLSDRNQDI----------INK----------	398
A	CAA63550	375	NGF----------VNGQ---INAQLSLSDRNQDI----------INK----------	398
A	AAB42191	375	NGF----------VNGQ---INAQLSLSDRNQDI----------INK----------	398
G	CAA1228	375	AGF----------VDGQ---LNTQLSLSDKNQYI----------INK----------	398
D	BAA90660	375	NGF----------VNGQ---INTKLPLSDKNTNI----------ISK----------	398
C	BAA89712	375	NGF----------VNGQ---INTKLPLSDKNTNI----------ISK----------	398
C	BAB71748	375	NGF----------VNGQ---INTKLPLSNKNTNI----------ISK----------	398
D	BAA75083	375	NGF----------VNGQ---INTKLPLSNKNTNI----------ISK----------	398
C	S46430	375	NGF----------VNGQ---INTKLPLSNKNTNI----------ISK----------	398
D	AAB36016	375	NGF----------VNGQ---INTKLPLSNKNTNI----------ISK----------	398
C	P46081	375	NGF----------VNGQ---INTKLPLSNKNTNI----------ISK----------	398
A	JC4901	375	NGF----------VNGQ---INTKLPLSNKNTNI----------ISK----------	398
?	BAA12299	375	NGF----------VNGQ---INTKLPLSNKNTNI----------ISK----------	398
A	CAA74630	342	NGF----------INGQ---IKTILPLSKYNKNI----------INK----------	365
A	CAA61123	342	NGF----------INGQ---IKTILPLSKYYKNI----------INK----------	365
F	CAA67511	342	NGF----------INGQ---IKTILPLSKYNKNI----------INK----------	365
F	CAA61233	342	NGF----------INGQ---IKTILPLSKYNKNI----------INK----------	365
F	AAC60474	342	NGF----------VNGQ---IATKLLLSEKNQYI----------INK----------	365
F	I40644	342	NGF----------VNGQ---IATKLLLSEKNQYI----------INK----------	365
B/F	CAA73971	342	NGF----------EKGQ---IKTNLPLSKYNKCI----------INK----------	365

Figure 34Jiii

(82) JP 2005-538954 A 2005.12.22

Toxin Serotype	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	417	YLDNVNIEE----------I-------DKIPPINDADIY--PYRKNA	444
F	CAA72807	417	YLNNVNIEE----------I-------SNIPPIDDKDIY--PYRKNA	444
E	P46082	416	YLDNVNIEE----------I-------EKIPPINDEDIY--PYRKNA	443
E	A47708	416	YLDNVNIEE----------I-------EKIPPINDEDIY--PYRKNA	443
E	Q06366	416	YLDNVNIEE----------I-------EKIPPINDEDIY--PYRKNA	443
B	I40631	486	FPINELILDTDL----------I-------SKIELP--SENT--ESLTDF	514
B	P10844	486	FPINELILDTDL----------I-------SKIELP--SENT--ESLTDF	514
B	1EPWA	485	FPINELILDTDL----------I-------SKIELP--SENT--ESLTDF	513
B*	AAL11498	486	FSINELILDTDL----------I-------SKIELP--SENT--ESLTDF	514
B*	AAK97132	486	FSINELILDTDL----------ISKIELPSENTESL--TDFN--VYVFEY	521
B/F*	CAA73968	486	FSINELILDTDL----------I-------SKIELP--SENT--ESLTDF	514
E*	P30995	472	ILNFNSESAPGL----------S-------DEKLNL--TIQN--------	494
E*	BAC05434	472	ILNFNSESAPGL----------S-------DEKLNL--TIQN--------	494
E*	BAB12249	475	ILNFNSESAPGL----------S-------DEKLNL--TIQN--------	497
E*	BAB3512	472	ILNFNSESAPGL----------S-------DEKLNL--TIQN--------	494
E*	S21178	472	ILNFNSESAPGL----------S-------DEKLNL--TIQN--------	494
E*	Q00496	472	ILNFNSESAPGL----------S-------DEKLNL--TIQN--------	494
A*	Q45894	476	DKVEEITADTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFDF-------DNEPEN--ISIE--NLSSDI	524

FIGURE 34Lii

Toxin Serotype	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	366	--PELIVNLIN-QNNTVWMKSN---IYGDGLKCTIDKF---YSSYKIPYNANYEHPINYS	416
F	CAA72807	366	--PELIVNLIN-ENNTILMKSN---IYGDGLKDTRTWF---YSNYKIPYSTNYEYQINHS	416
E	P46082	365	--PELIVNLIN-QNNTVLMKSN---IYGDGLKGTVDNF---YSNYIIPYNLNYEHSINYF	415
E	A47708	365	--PELIVNLIN-QNNTVLMKSN---IYGDGLKGNVDNF---YSNYIIPYMLNYEHSINYS	415
E	Q06366	365	--PELIVNLIN-QNNTVLMKSN---FYGDGLKGNVDNF---YSNYIIPYMLNYEHSINYS	415
B	I40631	443	--PGICIDVDN-ENLFFIADKN---SFS-------DDL---SKNERVEYNTQNNY-IGND	485
B	P10844	433	--KIQMCKSVK-APGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDL---SKNERIEYNTQSNY-IEND	485
B	1EPWA	432	--KIQMCKSVK-APGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDL---SKNERIEYNTQSNY-IEND	484
B*	AAL11498	433	--KIQMCKSVK-APGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDL---SKNERIAYNTQNNY-IDND	485
B*	AAK97132	433	--KIQMCKSVK-APGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDL---SKNERIAYNTQNNY-IEND	485
B/F*	CAA73968	433	--KIQMCKSVK-APGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDL---SKNERIAYNTQNNY-IEND	485
E*	P30995	421	IRKSICIEINN-GELFFVASEN---SYNDDNINTPKEI-----DDTVTSNNNYENDLDQV	471
E*	BAC05434	421	IRKSICIEINN-GELFFVASEN---SYNDDNINTPKEI-----DDTVTSNNNYENDLDQV	471
E*	BAB12249	424	IRKSICIEINN-GELFFVASEN---SYNDDNINTPKEI-----DDTVTSNNNYENDLDQV	474
E*	BAB3512	421	IRKSICIEINN-GELFFVASEN---SYNDDNINTPKEI-----DDTVTSNNNYENDLDQV	471
E*	S21178	421	IRKSICIEINN-GELFFVASEN---SYNDDNINTPKEI-----DDTVTSNNNYENDLDQV	471
E*	Q00496	421	IRKSICIEINN-GELFFVASEN---SYNDDNINTPKEI-----DDTVTSNNNYENDLDQV	471
A*	Q45894	422	--LPFFYKLLC-VRGIIPFKTK---SLDEGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDL	475

Figure 34Kii

Toxin Serotype	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	479	----DKFSPV-QKITSTREINTNIPWPIN---YLQAQ--NTNNERFSLSSDFVEVVSSKD	528
B/F	CAA72807	479	----DKFSPV-QKITSTREINTNIPWPIN---YLQAQ--NTNNEKFSLSSDFVEVVSSKD	528
A/B/F	CAA55074	479	----DKFSPV-QKITSTREINTNIPWPIN---YLQAQ--NTNNEKFSLSSDFVEVVSSKD	528
B	AAB64350	479	----DKFSPV-QKITSTREINTNIPWPIN---YLQAQ--NTNNEKFSLSSDFVEVVSSKD	528
A/B	CAA61125	479	----DKFSPV-QKITSTREINTNIPWPIN---YLQAQ--NTNNEKFSLSSDFVEVVSSKD	528
A	CAA74634	479	----DKFSPV-QKITSTREINTNIPWPIN---YLQAQ--NTNNEKFSLSSDFVEVVSSKD	528
A	S68216	479	----DKFSPV-QKITSTREINTNIPWPIN---YLQAQ--NTNNEKFSLSSDFVEVVSSKD	528
A	CAA63550	479	----DKFSPV-QKITSTREINTNIPWPIN---YLQAQ--NTNNEKFSLSSDFVEVVSSKD	528
A	AAB42191	479	----DKFSPV-QKITSTREINTNIPWPIN---YLQAQ--NTNNEKFSLSSDFVEVVSSKD	528
G	CAA1228	479	----DIFSPV-ENIIETKEVNTKIPWPIN---YLQAQ--IPNNEEFTLSSDFSQVVSYKT	528
D	BAA90660	479	----DDLLPT-QITSTTEEVITHTALPVN---YLQAQ--IITNENFTLSSDFSKVVSSKD	528
C	BAA89712	479	----DNLVFT-QITSMTEEVTTHTALPIN---YLQAQ--ITTNENFTLSSDFSKVVSSKD	528
C	BAB71748	479	----DNLVFT-QITSMTEEVTTHTALSIN---YLQAQ--ITNNENFTLSSDFSKVVSSKD	528
D	BAA75083	479	----DNLVFT-QITSMTEEVTTHTALSIN---YLQAQ--ITNNENFTLSSDFSKVVSSKD	528
C	S46430	479	----DNLVFT-QITSMTEEVTTHTALSIN---YLQAQ--ITNNENFTLSSDFSKVVSSKD	528
D	AAB36016	479	----DNLVFT-QITSMTEEVTTHTALSIN---YLQAQ--ITNNENFTLSSDFSKVVSSKD	528
C	P46081	479	----DNLVFT-QITSMTEEVTTHTALSIN---YLQAQ--ITNNENFTLSSDFSKVVSSKD	528
A	JC4901	479	----DNLVFT-QITSMTEEVTTHTALSIN---YLQAQ--ITNNENFTLSSDFSKVVSSKD	528
?	BAA12299	479	----DNLVFT-QITSMTEEVTTHTALSIN---YLQAQ--ITNNENFTLSSDFSKVVSSKD	528
A	CAA74630	447	----DPFTPV-YNITETKEINTTIPFFVN---YLQAQ--VTNSNDINLSSDFLKVISSKD	496
A	CAA61123	447	----DPFTPV-YNITETKEINTTIPFFVN---YLQAQ--VTNSNDINLSSDFLKVISSKD	496
F	CAA67511	445	----DPFIPV-YNITETKEINTTTPLSVN---YLQAQ--VTNSNDISLSSDFSKVISSKD	494
F	CAA61233	445	----DPFIPV-YNITETKEINTTTPLSVN---YLQAQ--VTNSNDISLSSDFSKVISSKD	494
F	AAC60474	446	----DTFIPI-YNITQSREINTTVPYSIN---YLQSQ--IMNSDDITLSSDFWEVVCSND	495
F	I40644	446	----DTFIPI-YNITQSREINTTVPYSIN---YLQSQ--IMNSDDITLSSDFWEVVCSND	495

Figure 34Mi

Toxin Serotype	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	450	NDSSLDNVNTGV----------I-------DNIPEI--IDVN--PYKENC	478
B/F	CAA72807	450	NDSSLDNVNIGV----------I-------DNIPEI--IDVN--PYKENC	478
A/B/F	CAA55074	450	NDSSLDNVNIGV----------I-------DNIPEI--IDVN--PYKENC	478
B	AAB64350	450	NDSSLDNVNIGV----------I-------DNIPEI--IDVN--PYKENC	478
A/B	CAA61125	450	NDSSLDNVNIGV----------I-------DNIPEI--IDVN--PYKENC	478
A	CAA74634	450	NDSSLDNVNIGV----------I-------DNIPEI--IDVN--PYKENC	478
A	S68216	450	NDSSLDNVNIGV----------I-------DNIPEI--IDVN--PYKENC	478
A	CAA63550	450	NDSSLDNVNIGV----------I-------DNIPEI--IDVN--PYKENC	478
A	AAB42191	450	NDSSLDNVNIGV----------I-------DNIPEI--IDVN--PYKENC	478
G	CAA1228	450	STSSLENVNVBE----------I-------SNIPEI--IDIN--PYRENS	478
D	BAA90660	450	DNFPLNNISIEE----------V-------DSIPEI--IDIN--PYKDNS	478
C	BAA89712	450	DNFPLNNISIEE----------V-------DSIPEI--IDIN--PYKDNS	478
C	BAB71748	450	DNFPLNNISIEE----------V-------DSIPEI--IDIN--PYKDNS	478
D	BAA75083	450	DNFPLNNISIEE----------V-------DSIPEI--IDIN--PYKDNS	478
C	S46430	450	DNFPLNNISIEE----------V-------DSIPEI--IDIN--PYKDNS	478
D	AAB36016	450	DNFPLNNISIEE----------V-------DSIPEI--IDIN--PYKDNS	478
C	P46081	450	DNFPLNNISIEE----------V-------DSIPEI--IDIN--PYKDNS	478
A	JC4901	450	DNFPLNNISIEE----------V-------DSIPEI--IDIN--PYKDNS	478
?	BAA12299	450	DNFPLNNISIEE----------V-------DSIPEI--IDIN--PYKDNS	478
A	CAA74630	417	DSCLDNVDIKE----------I-------DNIPPINDADIY--PYRKNC	446
A	CAA61123	417	DSCLDNVDIKE----------I-------NNIPPINDADIY--PYRKNC	446
F	CAA67511	417	YLNNVVNVEEINN----------I-------PPIND---ADIY--PYRKNS	444
F	CAA61233	417	YLNNVVNVEEINN----------I-------PPIND---ADIY--PYRKNS	444
F	AAC60474	415	NNTYLDNVNIEE----------I-------NNIPQI--TDADIYPYTNNC	445
F	I40644	415	NNTYLDNVNIEE----------I-------NNIPQI--TDADIYPYTNNC	445

Figure 34Li

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	529	KSL-----VYSFLSNVMFYLDSIKDNSPIDTDKEYYLWLREIFRNYSFDITATQEINTNC	583
B/F	CAA72807	529	KSL-----VYSFLSNVMFYLDSIKDNSPIDTDKKYYLWLREIFRNYSFDITATQEINTDC	583
A/B/F	CAA55074	529	KSL-----VYSFLSNVMFYLDSIKDNSPIDTDKKYYLWLREIFRNYSFDITATQEINTDC	583
B	AAB64350	529	KSL-----VYSFLSNVMFYLDSIKYNSPIDTDKKYYLWLREIFRNYSFDITATQEINTDC	583
A/B	CAA61125	529	KSL-----VYSFLSNVMFYLDSIKDNSPIDTDKKYYLWLREIFRNYSFDITATQEINTDC	583
A	CAA74634	529	KSL-----VYSFLSNVMFYLDSIKDNSPIDTDKKYYLWLREIFRNYSFDITATQEINTNC	583
A	S66216	529	KSL-----VYSFLSNVMFYLDSIKDNSPIDTDKKYYLWLREIFRNYSFDITATQEINTNC	583
A	CAA63550	529	KSL-----VYSFLSNVMFYLDSIKDNSPIDTDKKYYLWLREIFRNYSFDITATQEINTNC	583
A	AAB42191	529	KSL-----VYSFLSNVMFYLDSIKDNSPIDTDKKYYLWLREIFRNYSFDITATQEINTDC	583
G	CAA1228	529	QSL-----VYSFLSNVISYLDSVKDTNPIDTDKKYYLWLREIFRNYSFDITAIEEINTSC	583
D	BAA90660	529	KSL-----VYSFLDNLMSYLETIKNDGPIDTDKKYYLWLKEVFKNYSFDINLTQEIDSSC	583
C	BAA89712	529	KSL-----VYSFLDNLMSYLETIKNDGPIDTDKKYYLWLKEVFKNYSFDINLTQEIDSSC	583
C	BAB71748	529	KSL-----VYSFLDNLMSYLETIKNDGPIDTDKKYYLWLKEVFKNYSFDINLTQEIDSMC	583
D	BAA75083	529	KSL-----VYSFLDNLMSYLETIKNDGPIDTDKKYYLWLKEVFKNYSFDINLTQEIDSMC	583
C	S46430	529	KSL-----VYSFLDNLMSYLETIKNDGPIDTDKKYYLWLKEVFKNYSFDINLTQEIDSMC	583
D	AAB36016	529	KSL-----VYSFLDNLMSYLETIKNDGPIDTDKKYYLWLKEVFKNYSFDINLTQEIDSMC	583
C	P46081	529	KSL-----VYSFLDNLMSYLETIKNDGPIDTDKKYYLWLKEVFKNYSFDINLTQEIDSMC	583
A	JC4901	529	KSL-----VYSFLDNLMSYLETIKNDRPIHTDKKYYLWLKEVFKNYSFDINLTQEIDSMC	583
?	BAA12299	529	KSL-----VYSFLDNLMSYLETIKNDRPIHTDKKYYLWLKEVFKNYSFDINLTQEIDSMC	583
A	CAA74630	497	RSL-----VYSFLDNTIDYLDSIKYDGPIDTDKKYYLWLKEIFRNYSFDITATQEINTDC	551
A	CAA61123	497	RSL-----VYSFLDNTIDYLDSIKYDGPIDTDKKYYLWLKEIFRNYSFDITATQEINTDC	551
F	CAA67511	495	RSL-----VYSFLDNTIDYLDSIKYDEPINTDKKYYLWLKEIFRNYSFDMTEIQEVNIPC	549
F	CAA61233	495	RSL-----VYSFLDNTIDYLDSIKYDEPIDTDKKYYLWLKEIFRNYSFDMTETQEVNTPC	549
F	AAC60474	496	KSL-----VYSYLDNVINYLDSIKNNTPINTDKKYYLWLKEIFRNYSFDITATEEITTEC	550
F	I40644	496	KSL-----VYSYLDNVINYLDSIKNNTPINTDKKYYLWLKEIFRNYSFDITATEEITTEC	550

Figure 34Ni

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	495	SS------VYSFLNNTMDYLESIKYDKPIDTDKKYYKWLKAIFRNYSFDITETQEINSQF	548
F	CAA72807	493	-SL-----VYSFLNNTIDYLDSIKYDKPINTASRYYEWLKSIFRNYSFDITETQEINTSC	546
E	P46082	494	-SL-----VYSFLNNTMDYLEFIKYDKPIDTDKKYYKWLKAIFRNYSLDITETQEISNQF	547
E	A47708	494	-SL-----VYSFLNNTMDYLEFIKYDKPIDTDKKYYKWLKAIFRNYSLDITETQEISNQF	547
E	Q06366	494	-SL-----VYSFLNNTMDYLEFIKYDKPIDTDKKYYKWLKAIFRNYSLDITETQEISNQF	547
B	I40631	561	DAL-----LVSSKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVNDFVIEANKSNTMDKIA	615
B	P10844	561	DAL-----LFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVNDFVIEANKSNTMDKIA	615
B	1EPWA	560	DAL-----LFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVNDFVIEANKSNTMDKIA	614
B*	AAL11498	561	DAL-----LFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVNDFVIEANKSSTMDKIA	615
B*	AAK97132	561	DAL-----LFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVDDFVIEANKSSTMDKIA	615
B/F*	CAA73968	561	DAL-----LFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVDDFVIEANKSSTMDKIA	615
E*	P30995	543	TALLEQPKIYTFFSSE--FINNV--NKPVQA-ALFVGWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIA	597
E*	BAC05434	543	TALLEQPKIYTFFSSE--FINNV--NKPVQA-ALFVGWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIA	597
E*	BAB12249	546	TALLEQPKIYTFFSSE--FINNV--NKPVQA-ALFVGWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIA	600
E*	BAB3512	543	TALLEQPKIYTFFSSE--FINNV--NKPVQA-ALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIA	597
E*	S21178	543	TALLEQPKIYTFFSSE--FINNV--NKPVQA-ALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIA	597
E*	Q00496	543	TALLEQPKIYTFFSSE--FINNV--NKPVQA-ALFVSWIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIA	597
A*	Q45894	574	EAL-----LKPNVAYTFFSSKYVKKINKAVEAFMFLNWAEELVYDFTDETNEVTTMDKIA	628
C*	A4977	577	K-------VYTYFPTL-----ANKVNAGVQGGL-FLMWANDVVEDFTTNILRKDTLDKIS	623
C*	P18640	577	K-------VYTYFPTL-----ANKVNAGVQGGL-FLMWANDVVEDFTTNILRKDTLDKIS	623
B	CAA73971	584	GINKVVAWFGKALNILN--T--S--D--SFVEEPQNLGPSSLINKKENLSMPIIEIDEIP	635
B/F	CAA72807	584	GINKVVTWFGKALNILN--T--S--D--SFVEEPQNLGPISLINKKENLSMPIIEIYGIP	635
A/B/F	CAA55074	584	GINKVVTWFGKALNILN--T--S--D--SFVEEPQNLGPISLINKKENLSMPIIEIYGIP	635
B	AAB64350	584	GINKVVTWFGKALNILN--T--S--D--SFVEEPQNLGPISLINKKENLSMPIIEIYGIP	635
A/B	CAA61125	584	GINKVVTWFGKALNILN--T--S--D--SFVEEPQNLGPISLINKKENLSMPKIEIDEIP	635

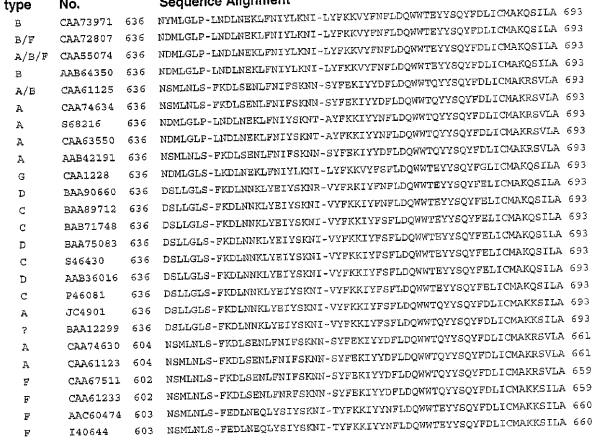
Figure 34Nii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	445	----DTFIPV-YNIIKSKEVNTTTPLPVN---YLQVQ--ITDSNDINLSSDFLEVISSKG	494
F	CAA72807	445	----DSFIPV-YSIASTKEITTT-PLPIN---YLQAQ--MTNNN-IKLSLDFLEVISSKG	492
E	P46082	444	----DTFIPV-YNITKAKEINTTTPLPVN---YLQAQ--MIDSNDINLSSDFLKVISSKG	493
E	A47708	444	----DTFIPV-YNITKAKEINTTTPLPVN---YLQAQ--MIDSNDINLSSDFLKVISSKG	493
E	Q06366	444	----DTFIPV-YNITKAKEINTTTPLPVN---YLQAQ--MIDSNDINLSSDFLKVISSKG	493
B	I40631	515	----NVDVPVYEKQPAIKKVFTDENTIFQ---YLYSQ--T-----FPLNIRDISLTSSFD	560

FIGURE 34Mii

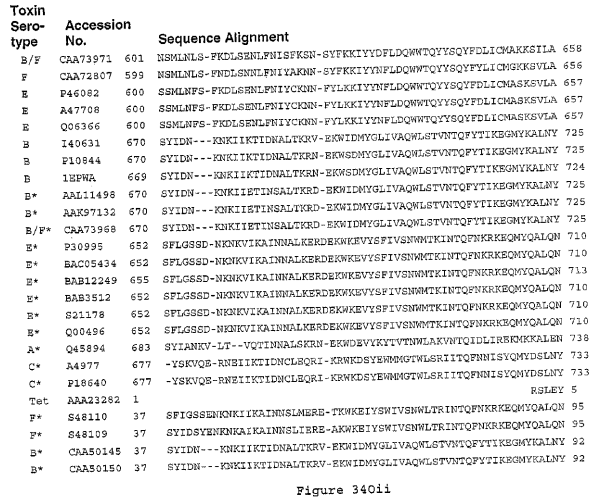
Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	P10844	515	----NVDVPVYEKQPAIKKIFTDENTIFQ---YLYSQ--T-----FPLDIRDISLTSSFD	560
B	1EPWA	514	----NVDVPVYEKQPAIKKIFTDENTIFQ---YLYSQ--T-----FPLDIRDISLTSSFD	559
B*	AAL11498	515	----NVYVPVYKKQPAIKKIFTDENTIFQ---YLYSQ--T-----FPLDIRDISLTSSFD	560
B*	AAK97132	522	----KKQPAI-KKIFTDENT------IFQ---YLYSQ--T-----FPLDIRDISLTSSFD	560
B/F*	CAA73968	515	----NVYVPVYKKQPAIKKIFTDENTIFQ---YLYSQ--T-----FPLDIRDISLTSSFD	560
E*	P30995	495	----DAYIPK-YDSNGTSDIEQHDVNELNVFFYLDAQ-------KVPEGENNVNLTSSID	542
E*	BAC05434	495	----DAYIPK-YDSNGTSDIEQHDVNELNVFFYLDAQ-------KVPEGENNVNLTSSID	542
E*	BAB12249	498	----DAYIPK-YDSNGTSDIEQHDVNELNVFFYLDAQ-------KVPEGENNVNLTSSID	545
E*	BAB3512	495	----DAYIPK-YDSNGTSDIEQHDVNELNVFFYLDAQ-------KVPEGENNVNLTSSID	542
E*	S21178	495	----DAYIPK-YDSNGTSDIEQHDVNELNVFFYLDAQ-------KVPEGENNVNLTSSID	542
E*	Q00496	495	----DAYIPK-YDSNGTSDIEQHDVNELNVFFYLDAQ-------KVPEGENNVNLTSSID	542
A*	Q45894	525	IGQLEPMPNI-ERFPNGKKYSLDKYTMFH---YLRAQ-------EFEHGDSRIILTNSAE	573
C*	A4977	549	---YLESQKLSDMVEDFTFTRSIEEALDNSA	576
C*	P18640	549	---YLESQKLSDMVEDFTFTRSIEEALDNSA	576

Figure 34Miii



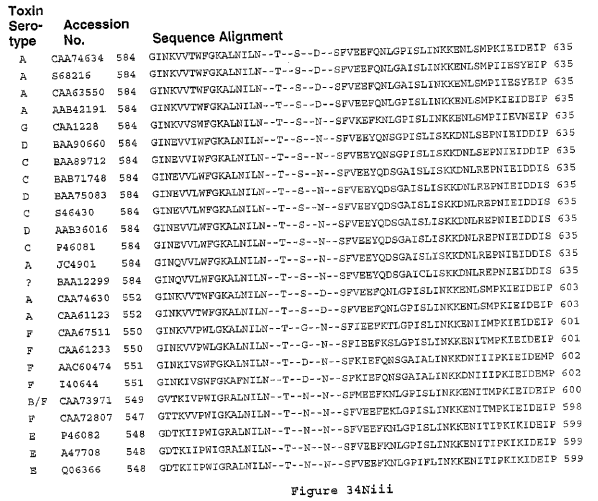
Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	636	NYMLGLP-LNDLNEKLFNIYLKNI-LYFKKVYFNFLDQWWTEYYSQYFDLICMAKQSILA	693
B/F	CAA72807	636	NDMLGLP-LNDLNEKLFNIYLKNI-LYFKKVYFNFLDQWWTEYYSQYFDLICMAKQSILA	693
A/B/F	CAA55074	636	NDMLGLP-LNDLNEKLFNIYLKNI-LYFKKVYFNFLDQWWTEYYSQYFDLICMAKQSILA	693
B	AAB64350	636	NDMLGLP-LNDLNEKLFNIYLKNI-LYFKKVYFNFLDQWWTEYYSQYFDLICMAKQSILA	693
A/B	CAA61125	636	NSMLNLS-FKDLSENLFNIFSKNN-SYFEKIYYDFLDQWWTQYYSQYFDLICMAKRSVLA	693
A	CAA74634	636	NSMLNLS-FKDLSENLFNIFSKNN-SYFEKIYYDFLDQWWTQYYSQYFDLICMAKRSVLA	693
A	S68216	636	NDMLGLP-LNDLNEKLFNIYSKNT-AYFKKIYYNFLDQWWTQYYSQYFDLICMAKRSVLA	693
A	CAA63550	636	NDMLGLP-LNDLNEKLFNIYSKNT-AYFKKIYYNFLDQWWTQYYSQYFDLICMAKRSVLA	693
A	AAB42191	636	NSMLNLS-FKDLSENLFNIFSKNN-SYFEKIYYDFLDQWWTEYYSQYFDLICMAKQSILA	693
G	CAA1228	636	NDMLGLS-LKDLNEKLFNIYLKNI-LYFKKVYFSFLDQWWTEYYSQYFGLICMAKQSILA	693
D	BAA90660	636	DSLLGLS-FKDLNNKLYEIYSKNR-VYFKKIYFNFLDQWWTEYYSQYFELICMAKQSILA	693
C	BAA89712	636	DSLLGLS-FKDLNNKLYEIYSKNI-VYFKKIYWNFLDQWWTEYYSQYFELICMAKQSILA	693
C	BAB71748	636	DSLLGLS-FKDLNNKLYEIYSKNI-VYFKKIYFSFLDQWWTEYYSQYFELICMAKQSILA	693
D	BAA75083	636	DSLLGLS-FKDLNNKLYEIYSKNI-VYFKKIYFSFLDQWWTEYYSQYFELICMAKQSILA	693
C	S46430	636	DSLLGLS-FKDLNNKLYEIYSKNI-VYFKKIYFSFLDQWWTEYYSQYFELICMAKQSILA	693
D	AAB36016	636	DSLLGLS-FKDLNNKLYEIYSKNI-VYFKKIYFSFLDQWWTEYYSQYFELICMAKQSILA	693
C	P46081	636	DSLLGLS-FKDLNNKLYEIYSKNI-VYFKKIYFSFLDQWWTEYYSQYFELICMAKQSILA	693
A	JC4901	636	DSLLGLS-FKDLNNKLYEIYSKNI-VYFKKIYFSFLDQWWTQYYSQYFDLICMAKKSILA	693
?	BAA12299	636	DSLLGLS-FKDLNNKLYEIYSKNI-VYFKKIYFSFLDQWWTQYYSQYFDLICMAKKSILA	693
A	CAA74630	604	NSMLNLS-FKDLSENLFNIFSKNN-SYFEKIYYDFLDQWWTQYYSQYFDLICMAKRSVLA	661
A	CAA61123	604	NSMLNLS-FKDLSENLFNIFSKNN-SYFEKIYYDFLDQWWTQYYSQYFDLICMAKRSVLA	661
F	CAA67511	602	NSMLNLS-FKDLSENLFNIFSKNN-SYFEKIYYDFLDQWWTQYYSQYFDLICMAKRSVLA	659
F	CAA61233	602	NSMLNLS-FKDLSENLFNRFSKNN-SYFEKIYYDFLDQWWTQYYSQYFDLICMAKKSILA	659
F	AAC60474	603	NSMLNLS-FEDLNEQLYSIYSKNI-TYFKKIYYNFLDQWWTEYYSQYFDLICMAKKSILA	660
F	I40644	603	NSMLNLS-FEDLNEQLYSIYSKNI-TYFKKIYYNFLDQWWTEYYSQYFDLICMAKKSILA	660

Figure 340i



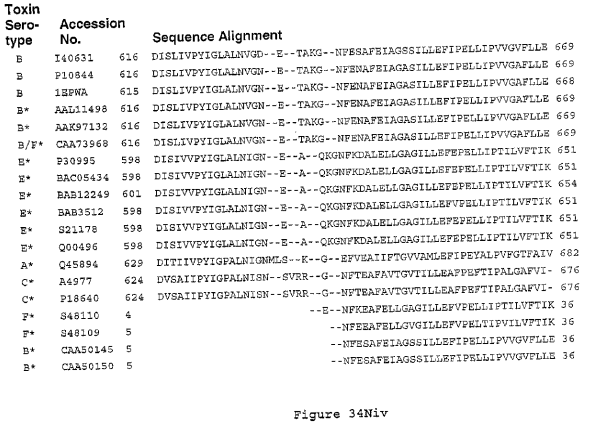
Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	601	NSMLNLS-FKDLSENLFNISFKSN-SYFKKIYYDFLDQWWTQYYSQYFDLICMAKKSILA	658
F	CAA72807	599	NSMLNLS-FNDLSNNLFNIYAKNN-SYFKKIYYNFLDQWWTQYYSQYFYLICMGKKSVLA	656
E	P46082	600	SSMLNFS-FKDLSENLFNIYCKNN-FYLKKIYYNFLDQWWTQYYSQYFDLICMASKSVLA	657
E	A47708	600	SSMLNFS-FKDLSENLFNIYCKNN-FYLKKIYYNFLDQWWTQYYSQYFDLICMASKSVLA	657
E	Q06366	600	SSMLNFS-FKDLSENLFNIYCKNN-FYLKKIYYNFLDQWWTQYYSQYFDLICMASKSVLA	657
B	I40631	670	SYIDN---KNKIIKTIDNALTKRV-EKWIDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNY	725
B	P10844	670	SYIDN---KNKIIKTIDNALTKRN-EKWSDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNY	725
B	1EPWA	669	SYIDN---KNKIIKTIDNALTKRN-EKWSDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNY	724
B*	AAL11498	670	SYIDN---KNKIIETINSALTKRD-EKWIDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNY	725
B*	AAK97132	670	SYIDN---KNKIIETINSALTKRD-EKWIDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNY	725
B/F*	CAA73968	670	SYIDN---KNKIIETINSALTKRD-EKWIDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNY	725
E*	P30995	652	SFLGSSD-NKNKVIKAINNALKERDEKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQN	710
E*	BAC05434	652	SFLGSSD-NKNKVIKAINNALKERDEKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQN	710
E*	BAB12249	655	SFLGSSD-NKNKVIKAINNALKERDEKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQN	713
E*	BAB3512	652	SFLGSSD-NKNKVIKAINNALKERDEKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQN	710
E*	S21178	652	SFLGSSD-NKNKVIKAINNALKERDEKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQN	710
E*	Q00496	652	SFLGSSD-NKNKVIKAINNALKERDEKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQN	710
A*	Q45894	683	SYIANKV-LT--VQTINNALSKRN-EKWDEVYKYTVTNWLAKVNTQIDLIRSKMKKALEN	738
C*	A4977	677	-YSKVQS-RNEIIKTIDNCLEQRI-KRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNISYQMYDSLNY	733
C*	P18640	677	-YSKVQS-RNEIIKTIDNCLEQRI-KRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNISYQMYDSLNY	733
Tet	AAA23282	1		RSLEY 5
F*	S48110	37	SFIGSSENKNKIIKAINNSLMERB-TKWKEIYSWIVSNWLTRINTQPNKRKEQMYQALQN	95
F*	S48109	37	SYIDSYENKNKAIKAINNSLIERE-AKWKEIYSWIVSNWLTRINTQPNKRKEQMYQALQN	95
B*	CAA50145	37	SYIDN---KNKIIKTIDNALTKRV-EKWIDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNY	92
B*	CAA50150	37	SYIDN---KNKIIKTIDNALTKRV-EKWIDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNY	92

Figure 340ii



Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
A	CAA74634	584	GINKVVTWFGKALNILN--T--S--D--SFVEEFQNLGPISLINKKENLSMPKIEIDEIP	635
A	S68216	584	GINKVVTWFGKALNILN--T--S--D--SFVEEFQNLGAISLINKKENLSMPIIESYEIP	635
A	CAA63550	584	GINKVVTWFGKALNILN--T--S--D--SFVEEFQNLGAISLINKKENLSMPIIESYEIP	635
A	AAB42191	584	GINKVVTWFGKALNILN--T--S--D--SFVEEFQNLGPISLINKKENLSMPIIEVNEIP	635
G	CAA1228	584	GINKVVSWFGKALNILN--T--S--N--SFVKEFKNLGPISLINKKENLSMPIIEVNEIP	635
D	BAA90660	584	GINEVVIWFGKALNILN--T--S--N--SFVEEYQNSGPISLISKKDNLSEPNIEIDDIP	635
C	BAA89712	584	GINEVVIWFGKALNILN--T--S--N--SFVEEYQNSGPISLISKKDNLREPNIEIDDIP	635
C	BAB71748	584	GINEVVLWFGKALNILN--T--S--N--SFVEEYQDSGAISLISKKDNLREPNIEIDDIS	635
D	BAA75083	584	GINEVVLWFGKALNILN--T--S--N--SFVEEYQDSGAISLISKKDNLREPNIEIDDIS	635
C	S46430	584	GINEVVLWFGKALNILN--T--S--N--SFVEEYQDSGAISLISKKDNLREPNIEIDDIS	635
D	AAB36016	584	GINEVVLWFGKALNILN--T--S--N--SFVEEYQDSGAISLISKKDNLREPNIEIDDIS	635
C	P46081	584	GINEVVLWFGKALNILN--T--S--N--SFVEEYQDSGAISLISKKDNLREPNIEIDDIS	635
A	JC4901	584	GINQVVLWFGKALNILN--T--S--N--SFVEEYQDSGAICLISKKDNLREPNIEIDDIS	635
?	BAA12299	584	GINQVVLWFGKALNILN--T--S--N--SFVEEYQDSGAICLISKKDNLREPNIEIDDIS	635
A	CAA74630	552	GINKVVTWFGKALNILN--T--S--D--SFVEEFQNLGPISLINKKENLSMPKIEIDEIP	603
A	CAA61123	552	GINKVVTWFGKALNILN--T--S--D--SFVEEFQNLGPISLINKKENLSMPKIEIDEIP	603
F	CAA67511	550	GINKVVPWLGKALNILN--T--G--N--SFIEEPKTLGPISLISKKENIMPKIEIDEIP	601
F	CAA61233	550	GINKVVPWLGKALNILN--T--G--N--SFIEEFKSLGPISLINKKENITMPKIEIDEIP	601
F	AAC60474	551	GINKIVSWFGKALNILN--T--D--N--SFKIEFQNSGAIALINKKDNIIPKIEIDEMP	602
F	I40644	551	GINKIVSWFGKAFNILN--T--D--N--SFKIEFQNSGAIALINKKDNIIPKIEIDEMP	602
B/F	CAA73971	549	GVTKIVPWIGRALNILN--T--N--N--SFMEEFKNLGPISLINKKENITMPKIEIDEIP	600
F	CAA72807	547	GTTKVVPWIGKALNILN--T--N--N--SFVEEFKNLGPISLINKKENITIPKIKIDEIP	599
E	P46082	548	GDTKIIPWIGRALNILN--T--N--N--SFVEEFKNLGPISLINKKENITIPKIKIDEIP	599
E	A47708	548	GDTKIIPWIGRALNILN--T--N--N--SFVEEFKNLGPISLINKKENITIPKIKIDEIP	599
E	Q06366	548	GDTKIIPWIGRALNILN--T--N--N--SFVEEFKNLGPIFLINKKENITIPKIKIDEIP	599

Figure 34Niii



Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	I40631	616	DISLIVPYIGLALNVGD--E--TAKG--NFESAFEIAGSSILLEFIPELLIPVVGVFLLE	669
B	P10844	616	DISLIVPYIGLALNVGN--E--TAKG--NFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLE	669
B	1EPWA	615	DISLIVPYIGLALNVGN--E--TAKG--NFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLE	668
B*	AAL11498	616	DISLIVPYIGLALNVGN--E--TAKG--NFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLE	669
B*	AAK97132	616	DISLIVPYIGLALNVGN--E--TAKG--NFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLE	669
B/F*	CAA73968	616	DISLIVPYIGLALNVGN--E--TAKG--NFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLE	669
E*	P30995	598	DISIVVPYIGLALNIGN--E--A--QKGNFKDALELLGAGILLEFPELLIPTILVFTIK	651
E*	BAC05434	598	DISIVVPYIGLALNIGN--E--A--QKGNFKDALELLGAGILLEFPELLIPTILVFTIK	651
E*	BAB12249	601	DISIVVPYIGLALNIGN--E--A--QKGNFKDALELLGAGILLEFPELLIPTILVFTIK	654
E*	BAB3512	598	DISIVVPYIGLALNIGN--E--A--QKGNFKDALELLGAGILLEFVELLIPTILVFTIK	651
E*	S21178	598	DISIVVPYIGLALNIGN--E--A--QKGNFKDALELLGAGILLEFPELLIPTILVFTIK	651
E*	Q00496	598	DISIVVPYIGLALNIGN--E--A--QKGNFKDALELLGAGILLEFPELLIPTILVFTIK	651
A*	Q45894	629	DITIIVPYIGPALNIGNMLS--K--G--EFVDAIIPTGVVAMLEPIPEYALPVFGTFAIV	682
C*	A4977	624	DVSAIIPYIGPALNISN--SVRR--G--NFTEAFAVTGVTILLEAFPEFTIPALGAFVI-	676
C*	P18640	624	DVSAIIPYIGPALNISN--SVRR--G--NFTEAFAVTGVTILLEAFPEFTIPALGAFVI-	676
F*	S48110	4	--E--NFKEAFELLGAGILLEFVPELLIPTILVFTIK	36
F*	S48109	5	--NFEEAFELLGVGILLEFVPELTIPVILVFTIK	36
B*	CAA50145	5	--NFESAFEIAGSSILLEFIPELLIPVVGVFLLE	36
B*	CAA50150	5	--NFESAFEIAGSSILLEFIPELLIPVVGVFLLE	36

Figure 34Niv

(85) JP 2005-538954 A 2005.12.22

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	748	LNKSAICFFDTNIY----PKFISFMEQCINSVNSNVTTFI--QK----CTNIT--EDEKL	795
B/F	CAA72807	748	LNKSAICVFDTNIC----PKFISFMEQCINSVNSNVTAFM--QK----CTNIT--EDEKL	795
A/B/F	CAA55074	748	LNKSAICVFDTNIY----PKFISFMEQCINSVNSNVTAFI--QK----CTNIT--EDEKL	795
B	AAB64350	748	LNKSAICVFDTNIY----PKFISFMEQCINSVNSNVTAFI--QK----CTNIT--EDEKL	795
A/B	CAA61125	749	LNNVAICVFQTNIY----PKFISFMEQCINNINKNTREFI--QK----CTNIT--ENEKL	796
A	CAA74634	749	LNNVAICVFQTNIY----PKFISFMEQCINNINKNTREFI--QK----CTNIT--ENEKL	796
A	S68216	749	LNNAAICVFESNIY----PKFISFMEQCINNINIKTKEFI--QK----CTNIN--EDEKL	796
A	CAA63550	749	LNNAAICVFESNIY----PKFISFMEQCINNINIKTKEFI--QK----CTNIN--EDEKL	796
A	AAB42191	749	LNNVAICVFQTNIY----PKFISFMEQCINNINKNTREFI--QK----CTNIT--ENEKL	796
G	CAA1228	749	LNKAAICVFESNIY----PKFISFMEQYINNINIKTTAFI--RK----CTNIT--EKEKL	796
D	BAA90660	748	LNKASICVFVEDIY----PKFISYMEKYINNINIKTREFI--QR----CTNIN--DNEKS	795
C	BAA89712	748	LNKASICVFVEDIY----PKFISYMEKYINNINIKTREFI--QR----CTNIN--DNEKS	795
C	BAB71748	748	LNKASICVFVEDIY----PKFISYMEKYINNINIKTREFI--QR----CTNIN--DNEKS	795
D	BAA75083	748	LNKASICVFVEDIY----PKFISYMEKYINNINIKTREFI--QR----CTNIN--DNEKS	795
C	S46430	748	LNKASICVFVEDIY----PKFISYMEKYINNINIKTREFI--QR----CTNIN--DNEKS	795
D	AAB36016	748	LNKASICVFVEDIY----PKFISYMEKYINNINIKTREFI--QR----CTNIN--DNEKS	795
C	P46081	748	LNKASICVFVEDIY----PKFISYMEKYINNINIKTREFI--QR----CTNIN--DNEKS	795
A	JC4901	749	LNSAAICVFEGNIY----PKFISFMEQCINNINKNTREFI--QK----CTNIT--ENEKL	796
?	BAA12299	749	LNSAAICVFEGNIY----PKFISFMEQCINNINKNTREFI--QK----CTNIT--ENEKL	796
A	CAA74630	717	LNNVAICVFQTNIY----PKFISFMEQCINNINKNTREFI--QK----CTNIT--ENEKL	764
A	CAA61123	717	LNNVAICVFQTNIY----PKFISFMEQCINNINKNTREFI--QK----CTNIT--ENEKL	764
F	CAA67511	715	LNSAAICVFEGNIY----PKFISFMEQCINNINKNTREFI--QK----CTNIT--ENEKL	762
F	CAA61233	715	LNSAAICVFEGNIY----SKFISFMEQCINNINKNTREFI--QK----CTNIT--ENEKL	762
F	AAC60474	716	LNKAAMCVFQSNIY----PKFISFMEQCIKHINKSTKEFI--QK----CTNIN--ETEKL	763
F	I40644	716	LNKAAMCVFQSNIY----PKFISFMEQCIKHINKSTKEFI--QK----CTNIN--ETEKL	763

Figure 34Qi

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	694	QEKLIKQIIQNKLQD--L-SK-ADISM--DKLNLMNLATGKTFIDLSNESQIAIDNINDF	747
B/F	CAA72807	694	QEKLIKQIIQNKLQD--L-FK-ADISM--DKLNLMNLATEKTFIDLSNESQIAINNINDF	747
A/B/F	CAA55074	694	QEKLIKQIIQNKLQD--L-FK-ADISM--DKLNLMNLATEKTFIDLSNESQIAINNINDF	747
B	AAB64350	694	QEKLIKQIIQNKLQD--L-FK-ADISM--DKLNLMNLATEKTFIDLSNESQIAMNINDF	747
A/B	CAA61125	694	QESLIKKIIQKKLSY--LIGN-SNISS--DNLALMNLTTTNTLRDISNESQIAMNNVNNF	748
A	CAA74634	694	QESLIKKIIQKKLSY--LIGN-SNISS--DNLALMNLTTTNTLRDISNESQIAMNNVNNF	748
A	S68216	694	QETLIKRIIQKKLSY--LIGN-SNISS--DNLALMNLTTTNTLRDISNESQIAMNNVDSF	748
A	CAA63550	694	QETLIKRIIQKKLSY--LIGN-SNISS--DNLALMNLTTTNTLRDISNESQIAMNNVDSF	748
A	AAB42191	694	QESLIKKIIQKKLSY--LIGN-SNISS--DNLALMNLTTTNTLRDISNESQIAMNNVNNF	748
G	CAA1228	694	QENLIKKIVQKKLSD--L-SKQSNISN--EKLNLMNLTTEKTFIDLSNQSQIAMNNINNF	748
D	BAA90660	694	QESVVKQIIQNKFTD--L-SK-ASIPP--DTLKLIKETTEKTFIDLSNESQISMNRVDNF	747
C	BAA89712	694	QESLVKQIIQNKFTD--L-SK-ASIPP--DTLKLIKETTEKTFIDLSNESQISMNRVDNF	747
C	BAB71748	694	QESLVKQIVQNKFTD--L-SK-ASIPP--DTLKLIRETTEKTFIDLSNESQISMNRVDNF	747
D	BAA75083	694	QESLVKQIVQNKFTD--L-SK-ASIPP--DTLKLIRETTEKTFIDLSNESQISMNRVDSF	747
C	S46430	694	QESLVKQIVQNKFTD--L-SK-ASIPP--DTLKLIRETTEKTFIDLSNESQISMNRVDNF	747
D	AAB36016	694	QESLVKQIVQNKFTD--L-SK-ASIPP--DTLKLIRETTEKTFIDLSNESQISMNRVDNF	747
C	P46081	694	QESLVKQIVQNKFTD--L-SK-ASIPP--DTLKLIRETTEKTFIDLSNESQISMNRVDNF	747
A	JC4901	694	QETLIKKIIQKKLSY--LIGN-SNISS--DNLALMNLTTTNTLRDISNESQIAMNNVDSF	748
?	BAA12299	694	QETLIKKIIQKKLSY--LIGN-SNISS--DNLALMNLTTTNTLRDISNESQIAMNNVDSF	748
A	CAA74630	662	QESLIKKIIQKKLSY--LIGN-SNISS--DNLALMNLTTTNTLRDISNESQIAMNNVNNF	716
A	CAA61123	662	QESLIKKIIQKKLSY--LIGN-SNISS--DNLALMNLTTTNTLRDISNESQIAMNNVNNF	716
F	CAA67511	660	QESLIKKIIQKKLSY--LIGN-SNISA--DNLVLMNLTTTNTLRDISNESQIAMNNVDSF	714
F	CAA61233	660	QETLIKKIIQKKLSY--LIGN-SNISS--DNLALMNLTTTNTLRDISNESQIAMNNVDSF	714
F	AAC60474	661	QENLIKKIIQKKISY--LIGA-SNIPD--DILAVMRLTTTNTLRDISVESQIAMNNLNNF	715
F	I40644	661	QENLIKKIIQKKISY--LIGA-SNIPD--DILAVMRLTTTNTLRDISVESQIAMNNLNNF	715

Figure 34Pi

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	714	LNDAAICVFESNIY----PKFISFMEQCINNINKDTKEFI--QK----CTNIT--ENEKL	761
F	CAA72807	712	FNNAAICVFQSNIY----PKFISFMQQCINGINENTKYFI--QK----CTNVT--EDEKL	759
E	P46082	713	FNNAAMCVFENNIY----PKFTSFMEQCIKNINKSTKEFI--LK----CTNIN--ETEKS	760
E	A47708	713	FNNAAMCVFENNIY----PKFTSFMEQCIKNINKSTKEFI--LK----CTNIN--ETEKS	760
E	Q06366	713	FNNAAMCVFENNIY----PKFTSFMEQCIKNINKSTKEFI--LK----CTNIN--ETEKS	760
B	I40631	775	INECSVSYLMKKMI----PLAVEKLLDFDNTLKKNLLNYI--DENKLYLIGSV--EDEKS	826
B	P10844	775	INGCSVSYLMKKMI----PLAVEKLLDFDNTLKKNLLNYI--DENKLYLIGSA--EYEKS	826
B	1EPWA	774	INGCSVSYLMKKMI----PLAVEKLLDFDNTLKKNLLNYI--DENKLYLIGSA--EYEKS	825
B*	AAL11498	775	INECSVSYLMKKMI----PLAVEKLLDFDNTLRKNLLNYI----------DENKL	815
B*	AAK97132	775	INECSVSYLMKKMI----PLAVEKLLDFDNTLRKNLLNYI----------DENKL	815
B/F*	CAA73968	775	INECSVSYLMKKMI----PLAVEKLLDFDNTLRKNLLNYI----------DENKL	815
E*	P30995	762	LTESSISYLMKLIN----EVKINKLREYDENVKTYLLDYI--IK----HGSIL--GESQQ	809
E*	BAC05434	762	LTESSISYLMKLIN----EVKINKLREYDENVKTYLLDYI--IK----HGSIL--GESQQ	809
E*	BAB12249	765	LTESSISYLMKLIN----EVKINKLREYDENVKTYLLDYI--IK----HGSIL--GESQQ	812
E*	BAB3512	762	LTESSISYLMKLIN----EVKINKLREYDENVKTYLLDYI--IQ----HGSIL--GESQQ	809
E*	S21178	762	LTESSISYLMKLIN----EVKINKLREYDENVKTYLLNYI--IQ----HGSIL--GESQQ	809
E*	Q00496	762	LTESSISYLMKIIN----EVKINKLREYDENVKTYLLNYI--IQ----HGSIL--GESQQ	809
A*	Q45894	788	LDQCSVSYLMNSMI----PYAVKRLKDPDASVRDVLLKYIYDNR----GTLVL--QVDRL	837
C*	A4977	783	IRECSVTYLFKNML----PKVIDELNEFDRNTKAKLINLI--DS----HNILLVGEVDKL	832
C*	P18640	783	IRECSVTYLFKNML----PKVIDELNEFDRNTKAKLINLI--DS----HNILLVGEVDKL	832
Tet	AAA23282	55	MRESSRSFLVNQMINEAKKQLLEFDTQSKNILMQYIKAN---SK----FIGIT--ELKKL	105
F*	S48110	147	ITESSIFYLMKLIN----EAKVSKLREYDEGVKEYLLDYI--SE----HRSIL--GNSVQ	194
F*	S48109	147	MTESSISYLMKLIN----EAKVGKLKKYDNHVKSDLLNYI--LD----HRSIL--GEQTN	194
B*	CAA50145	142	INECSVSYLMKKMI----PLAVKKLLDFDNTLKKNLLNYI--DENKLYLIGSV--EDEKS	193
B*	CAA50150	142	INECSVSYLMKKMI----PLAVKKLLDFDNTLKKNLLNYI--DENKLYLIGSV--EDEKS	193

Figure 34Qii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	659	QEKLIKKIIRKKLSY--LIGN-ANISS--DNLALMNLTTTNTLRDISNESQIAMNNVDSF	713
F	CAA72807	657	QEKLIKEIIQKQLNY--L-IRNSNISS--SDLALMNLTTTNTLRDISNKSQIAMNNIDDF	711
E	P46082	658	QEKLIKKLIQKQLRY--LMEN-SNISS--TNLLLINLTTTNTLRDISNQSQIAINNIDKF	712
E	A47708	658	QEKLIKKLIQKQLRY--LMEN-SNISS--TNLLLINLTTTNTLRDISNQSQIAINNIDKF	712
E	Q06366	658	QEKLIKKLIQKQLRY--LMEN-SNISS--TNLLLINLTTTNTLRDISNQSQIATNNIDKF	712
B	I40631	726	QAQALEEIIKYKYNI--Y-SE-EEKSN--ININFNDINS-----KLNDGINQAMDNINDF	774
B	P10844	726	QAQALEEIIKYRYNI--Y-SE-KEKSN--INIDFNDINS-----KLNEGINQAIDNINNF	774
B	1EPWA	725	QAQALEEIIKYRYNI--Y-SE-KEKSN--INIDFNDINS-----KLNEGINQAIDNINNF	773
B*	AAL11498	726	QAQALEEIIKYKYNI--Y-SE-KERSN--INIDFNDVNS-----KLNEGINQAIDNINNF	774
B*	AAK97132	726	QAQALEEIIKYKYNI--Y-SE-KERSN--INIDFNDVNS-----KLNEGINQAIDNINNF	774
B/F*	CAA73968	726	QAQALEEIIKYKYNI--Y-SE-KERSN--INIDFNDVNS-----KLNEGINQAIDNINNF	774
E*	P30995	711	QVNALKAIIESKYNSYTL-EE-KNELT--NKYDIEQIEN-----ELNQKVSIAMNNIDRF	761
E*	BAC05434	711	QVNALKAIIESKYNSYTL-EE-KNELT--NKYDIEQIEN-----ELNQKVSIAMNNIDRF	761
E*	BAB12249	714	QVNALKAIIESKYNSYTL-EE-KNELT--NKYDIEQIEN-----ELNQKVSIAMNNIDRF	764
E*	BAB3512	711	QVNALKTIIEPKYNS--Y-T----LEE--KKELKNNVDIEQIENELNQKVSIAMNNIDRF	761
E*	S21178	711	QVNAIKTIIESKYNSYTL-EE-KNELT--NKYDIKQIEN-----ELNQKVSIAMNNIDRF	761
E*	Q00496	711	QVNAIKTIISSKYNSYTL-EE-KNELT--NKYDIKQIEN-----ELNQKVSIAMNNIDRF	761
A*	Q45894	739	QAEATKAIINYQYNQ--Y-TE-EEKNN--INFNIDDLSS-----KLNESINSAMINININKF	787
C*	A4977	734	QAGAIKAKIDLEYKK--Y-SG-SDKEN--IKSQVENLKN-----SLDVKISEAMNNINKF	782
C*	P18640	734	QAGAIKAKIDLEYKK--Y-SG-SDKEN--IKSQVENLKN-----SLDVKISEAMNNINKF	782
Tet	AAA23282	6	QVDAIKKIIDYEYKI--Y-SG-PDKEQ--IADEINNLKN-----KLEEKANKAMININIF	54
F*	S48110	96	QVDAIKTVIEYKYNN--Y-TS-DERNRLESEYNINNIRE-----SLNKKVSLAMENIERF	146
F*	S48109	96	QVDAIKTAIEYKYNN--Y-TS-DEKNRLESEYNINNIEE-----ELNKKVSLAMKNIERF	146
B*	CAA50145	93	QAQALEEIIKYKYNI--Y-SE-EEKSN--ININFNDINS-----KLNEGINQAMDNINDF	141
B*	CAA50150	93	QAQALEEIIKYKYNI--Y-SE-EEKSN--ININFNDINS-----KLNDGINQAMDNINDF	141

Figure 34Pii

(86) JP 2005-538954 A 2005.12.22

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B*	CAA50145	194	KV--DKYLKTI-I---P-FDLSMYTNNE---IL-IKIFN----------KYNSEILNNI-	231
B*	CAA50150	194	KV--DKYLKTY-I---P-FDLSTYTNNE---IL-IKIFN----------KYNSEILNNI-	231
B*	CAB43706	21	NI-	22

Figure 34Riii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	796	QL--IK-LNTF-M---N-IDFEFFDIQN---IK-DLITSETDL-I----KEEKESDYNL-	837
B/F	CAA72807	796	QL--IK-LNTF-M---N-IDFEFFDIQS---IK-DLITSETDL-I----KEEKESDYNL-	837
A/B/F	CAA55074	796	QL--IK-LNTF-M---N-IDFEFFDIQS---IK-DLITSETDL-I----KEEKESDYNL-	837
B	AAB64350	796	QL--IK-LNTF-M---N-IDFEFFDIQS---IK-DLITSETDL-I----KEEKESDYNL-	837
A/B	CAA61125	797	QL--IN-QNIF-S---S-LDFDFLNIEN---LK-SLFNSETGL-L----IKEETSPYEL-	838
A	CAA74634	797	QL--IN-QNIF-S---S-LDFDFLNIEN---LK-SLFNSETGL-L----IKEETSPYEL-	838
A	S68216	797	QL--IN-QNVF-N---S-LDFEFLNIQN---MK-SLFSSETAL-L----IKEETWPYEL-	838
A	CAA63550	797	QL--IN-QNVF-N---S-LDFEFLNIQN---MK-SLFSSETAL-L----IKEETWPYEL-	838
A	AAB42191	797	QL--IN-QNIF-S---S-LDFDFLNIEN---LK-SLFNSETGL-L----IKEETSPYEL-	838
G	CAA1228	797	QL--IN-QNTF-N---N-LDFSFFDIQT---IE-NLLTSETNL-I----IKEETSPYDL-	838
D	BAA90660	796	IL--IN-SYTF-K---T-IDFKFLNIQA---IK-NFFNSQVEQ-V----MKEMLSPYQL-	837
C	BAA89712	796	IL--IN-SYTF-K---T-IDFKFLDIQG---IK-NFFNSQVEQ-V----MKEMLSPYQL-	837
C	BAB71748	796	IL--IN-SYTF-K---T-IDFKFLDIQS---IK-NFFNSQVEQ-V----MKEILSPYQL-	837
D	BAA75083	796	IL--IN-SYTF-K---T-IDFKFLDIQS---IK-NFFNSQVEQ-V----MKEILSPYQL-	837
C	S46430	796	IL--IN-SYTF-K---T-IDFKFLDIQS---IK-NFFNSQVEQ-V----MKEILSPYQL-	837
D	AAB36016	796	IL--IN-SYTF-K---T-IDFKFLDIQS---IK-NFFNSQVEQ-V----MKEILSPYQL-	837
C	P46081	796	IL--IN-SYTF-K---T-IDFKFLDIQS---IK-NFFNSQVEQ-V----MKEILSPYQL-	837
A	JC4901	797	QL--IN-QNIF-S---S-LDFDFLNIEN---LK-SLFSSETAL-L----IKEETSPYEL-	838
?	BAA12299	797	QL--IN-QNIF-S---S-LDFDFLNIEN---LK-SLFSSETAL-L----IKEETSPYEL-	838
A	CAA74630	765	QL--IN-QNIF-S---S-LDFDFLNIEN---LK-SLFNSETGL-L----IKEETSPYEL-	806
A	CAA61123	765	QL--IN-QNIF-S---S-LDFDFLNIEN---LK-SLFNSETGL-L----IKEETSPYEL-	806
F	CAA67511	763	QL--IN-RNIF-S---S-LDFDFLNIEN---LK-SLFSSETAL-L----IKEETSPYEL-	804
F	CAA61233	763	QL--IN-QNIF-S---S-LDFDFLNIEN---LK-SLFSSETAL-L----IKEETSPYEL-	804
F	AAC60474	764	QL--IM-QNSF-S---N-LDFDFLDIQN---MK-NLFNSYTEL-L----IKEQTSPYEL-	805
F	I40644	764	QL--IM-QNSF-S---N-LDFDFLDIQN---MK-NLFNSYTEL-L----IKEQTSPYEL-	805

Figure 34Ri

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	838	----FLLTLQEDNNKVIEDISGKNTLVKYSDSISLVYGVNGD--A--------L------	877
B/F	CAA72807	838	----FLFTLQEDNNKVIEDISGKNTLVKYSDSISLVYGVNGD--A--------L------	877
A/B/F	CAA55074	838	----FLFTLQEDNNKVIEDISGKNTLVKYSDSISLVYGVNGD--A--------L------	877
B	AAB64350	838	----FLFTLQEDNNKVIEDISGKNTLVKYSDSISLVYGVNGD--A--------L------	877
A/B	CAA61125	839	----VLYAFQEPGNNAIGDASGKNTSIEYSKDIGLVYGINSD--A--------L------	878
A	CAA74634	839	----VLYAFQEPGNNAIGDASGKNTSIEYSKDIGLVYGINSD--A--------L------	878
A	S68216	839	----VLYAFKEPGNNVIGDASGKNTSIEYSKDIGLVYGINSD--A--------L------	878
A	CAA63550	839	----VLYAFKEPGNNVIGDASGKNTSIEYSKDIGLVYGINSD--A--------L------	878
A	AAB42191	839	----VLYAFQEPGNNAIGDASGKNTSIEYSKDIGLVYGINRD--A--------L------	878
G	CAA1228	839	----LLFSLQEADRKVIKDISGKDTLVQYSDTIDLSYGVNGD--A--------L------	878
D	BAA90660	838	----LLFATRGPNSNIIEDISGKNTLIQYTESVELVYGVNGE--S--------L------	877
C	BAA89712	838	----LLFATRGPNSNIIEDISGKNTLIQYTESVELVYGVNGE--S--------L------	877
C	BAB71748	838	----LLFASKGPNSNIIEDISGKNTLIQYTESIELVYGVNGE--S--------L------	877
D	BAA75083	838	----LLFASKGPNSNIIEDISGKNTLIQYTESIELVYGVNGE--S--------L------	877
C	S46430	838	----LLFASKGPNSNIIEDISGKNTLIQYTESIELVYGVNGE--S--------L------	877
D	AAB36016	838	----LLFASKGPNSNIIEDISGKNTFIQYTESIELVYGVNGE--S--------L------	877
C	P46081	838	----LLFASKGPNSNIIEDISGKNTLIQYTESIELVYGVNGE--S--------L------	877
A	JC4901	839	----VLYAFQEPDNNAIGDASAKNTSIEYSKDIDLVYGINSD--A--------L------	878
?	BAA12299	839	----VLYAFQEPDNNAIGDASAKNTSIEYSKDIDLVYGINSD--A--------L------	878
A	CAA74630	807	----VLYAFQEPGNNAIGDASGKNTSIEYSKDIGLVYGINSD--A--------L------	846
A	CAA61123	807	----VLYAFQEPGNNAIGDASGKNTSIEYSKDIGLVYGINRD--A--------L------	846
F	CAA67511	805	----VLYAFQEPDNNAIGDASAKNTSIEYSKDIDLVYGINGD--A--------L------	844
F	CAA61233	805	----VLYAFQEPDNNAIGDASAKNTSIEYSKDIDLVYGINSD--A--------L------	844
F	AAC60474	806	----SLYAFEEQDNNVIGDASGKNTLVEYPKGIELVYGINNS--A--------L------	845
F	I40644	806	----SLYAFEEQDNNVIGDASGKNTLVEYPKGIELVYGINNS--A--------L------	845

Figure 34Si

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	762	QL--IS-PNIF-S---S-LDFDFLNIEN---LK-SLLSSETAL-L----IKEETSPYEL-	803
F	CAA72807	760	QL--IM-QNSL-N---S-LNFDFLDIEK---IK-CLFNSYTRL-L----IKKQSSPYEL-	801
E	P46082	761	HL--IM-QNSF-S---N-LDFDFLDIQN---MK-NLFNLYTEL-L----IKEQTSPYEL-	802
E	A47708	761	HL--IM-QNSF-S---N-LDFDFLDIQN---MK-NLFNLYTEL-L----IKEQTSPYEL-	802
E	Q06366	761	HL--IM-QNSF-S---N-LDFDFLDIQN---MK-NLFNLYTEL-L----IKEQTSPYEL-	802
B	I40631	827	KV--DKYLKTI-I---P-FDLSTY--SN---IR-ILIK----I-F----NKYNSEILNN-	863
B	P10844	827	KV--NKYLKTI-M---P-FDLSIY----------TNDTIL-IEMFNKYNSEILNNI-	864
B	1EPWA	826	KV--NKYLKTI-M---P-FDLSIY----------TNDTIL-IEMFNKYNSEILNNI-	863
B*	AAL11498	816	YL--IG-SAEY-E---K-SKVDKYLKTS---IPFDLSTYTNNT-I----LIEIFNKYNSD	859
B*	AAK97132	816	YL--IG-SAEY-E---K-SKVDKYLKTS---IPFDLSTYTNNT-I----LIEIFNKYNSD	859
B/F*	CAA73968	816	YL--IG-SAEY-E---K-SKVDKYLKTS---IPFDLSTYTNNT-I----LIEIFNKYNSD	859
E*	P30995	810	ELNSMV-IDTL-N---NSIPFKLSSYTD---DK-ILISYFNKF-F----KRIKSSS----	851
E*	BAC05434	810	ELNSMV-IDTL-N---NSIPFKLSSYTD---DK-ILISYFNKF-F----KRIKSSS----	851
E*	BAB12249	813	ELNSMV-IDTL-N---NSIPFKLSSYTD---DK-ILISYFNKF-F----KRIKSSS----	854
E*	BAB3512	810	ELNSMV-IDTL-N---NSIPFKLSSYTD---DK-ILISYFNKF-F----KRIKSSS----	851
E*	S21178	810	EL--NS-MVTD-TLNNS-IPFKLSSYTD---DK-ILISYFNKF-F----KRIKSSS----	851
E*	Q00496	810	EL--NS-MVTD-TLNNS-IPFKLSSYTD---DK-ILISYFNKF-F----KRIKSS-----	851
A*	Q45894	838	KD--EV-NNTLSA---D-IPFQLSKYVD---NK-KLLSTFTEY-I----K----NIVNT-	876
C*	A4977	833	KA--KV-NNSF-Q---NTIPFNIFSYTNNSLLK-DIINEYFNN-I----NDSK-------	872
C*	P18640	833	KA--KV-NNSF-Q---NTIPFNIFSYTNNSLLK-DIINEYFNN-I----NDSK-------	872
Tet	AAA23282	106	E---SK-INKV-F---S-TPIPFSYSKN---LD-CWVDNEEDIDV----ILKKSTILNL-	147
F*	AAG01403	5	N---DK-ILILYFNKL-Y----KKIKDNS----	24
F*	S48110	195	EL--ND-LVTS-TLNNS-IPFELSSYTN---DK-ILILYFNKL-Y----KKIKDNS----	236
A*	AAB0610	4	LLSTFTEY-I----K----NIINT-	18
F*	S48109	195	EL--SD-LVTS-TLNSS-IPFELSSYTN---DK-ILILYFNRL-Y----KKIKDSS----	236

Figure 34Rii

JP 2005-538954 A 2005.12.22

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	878	--YLKEPNE-S-----VSFSNKVFE---NGLTNSFSICFWLR-----------NLGE-D	913
B/F	CAA72807	878	--YLKEPDE-S-----VSFSNKAFE---NGLTNSFSICFWLR-----------NLGE-D	913
A/B/F	CAA55074	878	--YLKEPDE-S-----VSFSNKAFE---NGLTNSFSICFWLR-----------NLGE-D	913
B	AAB64350	878	--YLKEPDE-S-----VSFSNKAFE---NGLTNSFSICFWLR-----------NLGE-D	913
A/B	CAA61125	879	--YLNGSNQ-S-----ISFSNDFFE---NGLTNSFSIYFWLR-----------NLGK-D	914
A	CAA74634	879	--YLNGSNQ-S-----ISFSNDFFE---NGLTNSFSIYFWLR-----------NLGK-D	914
A	S68216	879	--YLNGSNQ-S-----ISFSNDFFE---NGLTNSFSIYFWLR-----------NLGK-D	914
A	CAA63550	879	--YLNGSNQ-S-----ISFSNDFFE---NGLTNSFSIYFWLR-----------NLGK-D	914
A	AAB42191	879	--YLNGSNQ-S-----ISFSNDFFE---NGLTNSFSIYFWLR-----------NLGK-D	914
G	CAA1228	879	--YLKEPNQ-S-----VNFSNNIFE---NGLTNSFSICFWLR-----------NLGQ-D	914
D	BAA90660	878	--YLKSPNE-T-----VEFSNNFFT---NGLTNNFTICFWLR-----------FTGK-D	913
C	BAA89712	878	--YLKSPNE-T-----VEFSNNFFT---NGLTNNFTICFWLR-----------FTGK-D	913
C	BAB71748	878	--YLKSPNE-T-----IKFSNKFFT---NGLTNNFTICFWLR-----------FTGK-N	913
D	BAA75083	878	--YLKSPNE-T-----IKFSNKFFT---NGLTNNFTICFWLR-----------FTGK-N	913
C	S46430	878	--YLKSPNE-T-----IKFSNKFFT---NGLTNNFTICFWLR-----------FTGK-N	913
D	AAB36016	878	--YLKSPNE-T-----IKFSNKFFT---NGLTNNFTICFWLR-----------FTGK-N	913
C	P46081	878	--YLKSPNE-T-----IKFSNKFFT---NGLTNNFTICFWLR-----------FTGK-N	913
A	JC4901	879	--YLNGSNQ-S-----ISFSNDFFE---NGLTNSFSIYFWLR-----------NLGK-D	914
?	BAA12299	879	--YLNGSNQ-S-----ISFSNDFFE---NGLTNSFSIYFWLR-----------NLGK-D	914
A	CAA74630	847	--YLNGSNQ-S-----ISFSNDFFE---NGLTNSFSIYFWLR-----------NLGK-D	882
A	CAA61123	847	--YLNGSNQ-S-----ISFSNDFFE---NGLTNSFSIYFWLR-----------NLGK-D	882
F	CAA67511	845	--YLNGANQ-S-----ISFSNDFFE---NGLTNSFSIYFWLR-----------NLGK-D	880
F	CAA61233	845	--YLNGSNQ-S-----ISFSNDFFE---NGLTNSFSIYFWLR-----------NLGK-D	880
F	AAC60474	846	--YLNGSNQ-S-----IIFTNDYFE---NGLTNSFSIYFWLR-----------NLGQ-D	881
F	I40644	846	--YLNGSNQ-S-----IIFTNDYFE---NGLTNSFSIYFWLR-----------NLGQ-D	881

FIGURE 34Ti

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	804	----VLYAFQELSNNVIGDASGKNTSIEYSKDIGLVYGINSD--A--------L------	843
F	CAA72807	802	----SLYAFQGEDKNVIGDGSGKNTLVEYTNDIGLIYGINNN--A--------L------	841
E	P46082	803	----SLYAFQEQDNNVIGDTSGKNTLVEYPKDIGLVYGINNN--A--------I------	842
E	A47708	803	----SLYAFQEQDNNVIGDTSGKNTLVEYPKDIGLVYGINNN--A--------I------	842
E	Q06366	803	----SLYAFQEQDNNVIGDTSGKNTLVEYPKDIGLVYGINNN--A--------I------	842
B	I40631	864	----IILNLRYKDNNLI-DLSGYGAKVEVYDGVKLNDKNQFK--L--------T------	902
B	P10844	865	----ILNLRYKDNNLI--DLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFK--L--------T------	902
B	1EPWA	864	----ILNLRYKDNNLI--DLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFK--L--------T------	901
B*	AAL11498	860	ILNNIILNLRYRDNKLI-DLSGYGAKVEVYDGVKLNDKNQFK--L--------T------	902
B*	AAK97132	860	ILNNIILNLRYRDNKLI-DLSGYGAKVEVYDGVKLNDKNQFK--L--------T------	902
B/F*	CAA73968	860	ILNNIILNLRYRDNKLI-DLSGYGAKVEVYDGVKLNDKNQFK--L--------T------	902
E*	P30995	852	-----VLNMRYKNDKYVDTSGYDSNININGDVYKYPTNKNQF--G--------I------	890
E*	BAC05434	852	-----VLNMRYKNDKYVDTSGYDSNININGDVYKYPTNKNQF--G--------I------	890
E*	BAB12249	855	-----VLNMRYKNDKYVDTSGYDSNININGDVYKYPTNKNQF--G--------I------	893
E*	BAB3512	852	-----VLNMRYKNDKYV-DTSGYDSNININGSI-FIYPTNKNQFT--------I------	890
E*	S21178	852	-----VLNMRYKNDKYVDTSGYDSNININGDVYKYPTNKNQF--G--------I------	890
E*	Q00496	852	-----VLNMRYKNDKYVDTSGYDSNININGDVYKYPTNKNQF--G--------I------	890
A*	Q45894	877	----SILSIVYKKDDLID-------LSRYGAKINIGDRVYYD--SIDKNQIKLI------	917
C*	A4977	873	-----ILSLQNRKNTLV-DTSGYNAEVSEEGDVQLNPIFPFD----------F------	909
C*	P18640	873	-----ILSLQNRKNTLV-DTSGYNAEVSEEGDVQLNPIFPFD----------F------	909
Tet	AAA23282	148	----------DINNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGK--A--------I------	181
Tet	1DIWA	16	NNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGK--A--------I------	49
Tet	1FV2A	49	NNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGK--A--------I------	80
Tet	1D0HA	46	NNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGK--A--------I------	77
Tet	1DLLA	18	NNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGK--A--------I------	49

Figure 34Sii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	844	--YLNGSNQ-S-----ISFSNDFFE---NGLTNSFSIHFWLR-----------NLGQ-D	879
F	CAA72807	842	--YLNQSNQ-S-----VSFTNDYFE---NGLTNSFSIYFWLR-----------NLGK-D	877
E	P46082	843	--HLTGANQ-N-----IKFTNDYFE---NGLTNNFSIYFWLR-----------NLKQ-N	878
E	A47708	843	--HLTGANQ-N-----IKFTNDYFE---NGLTNNFSIYFWLR-----------NLKQ-N	878
E	Q06366	843	--HLTGANQ-N-----IKFTNDYFE---NGLTNNFSIYFWLR-----------NLNQ-N	878
B	I40631	903	--SSADSKI-R-----VTQNQNIIF---NSMFLDFSVSFWIRIP----------KYKN-D	940
B	P10844	903	--SSANSKI-R-----VTQNQNIIF---NSVFLDFSVSFWIRIP----------KYKN-D	940
B	1EPWA	902	--SSANSKI-R-----VTQNQNIIF---NSVFLDFSVSFWIRIP----------KYKN-D	939
B*	AAL11498	903	--SSANSKI-R-----VTQNQNIIF---NSMFLDFSVSFWIRIP----------KYKN-D	940
B*	AAK97132	903	--SSANSKI-R-----VIQNQNIIF---NSMFLDFSVSFWIRIP----------KYKN-D	940
B/F*	CAA73968	903	--SSANSKI-R-----VIQNQNIIF---NSMFLDFSVSFWIRIP----------KYKN-D	940
E*	P30995	891	--YNDKLSEVN-----ISQNDYIIY---DNKYKNFSISFWVRIPNYD-------NKIV-N	932
E*	BAC05434	891	--YNDKLSEVN-----ISQNDYIIY---DNKYKNFSISFWVRIPNYD-------NKIV-N	932
E*	BAB12249	894	--YNDKLSEVN-----ISQNDYIIY---DNKYKNFSISFWVRIPNYD-------NKIV-N	935
E*	BAB3512	891	--FNSKPSEVN-----ISQNDYIIY---DNKYKNFSISFWVRIPNYD-------NKIV-N	932
E*	S21178	891	--YNDKLSEVN-----ISQNDYIIY---DNKYKNFSISFWVRIPNYD-------NKIV-N	932
E*	Q00496	891	--YNDKLSEVN-----ISQNDYIIY---DNKYKNFSISFWVRIPNYD-------NKIV-N	932
A*	Q45894	918	--NLESSTI-E-----VILKNAIVY---NSMYENFSTSFWIKIPKYFSKI----NLNN-E	961
C*	A4977	910	--KLGSSGE-DRGKVIVTQNENIVY---NSMYESFSISFWIRIN----------KWVS-N	952
C*	P18640	910	--KLGSSGE-DRGKVIVTQNENIVY---NSMYESFSISFWIRIN----------KWVS-N	952
Tet	AAA23282	182	--HLVNNES-S-----EVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE--QYGT-N	230
Tet	1DIWA	50	--HLVNNES-S-----EVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE--QYGT-N	98
Tet	1FV2A	81	--HLVNNES-S-----EVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE--QYGT-N	129
Tet	1D0HA	78	--HLVNNES-S-----EVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE--QYGT-N	126
Tet	1DLLA	50	--HLVNNES-S-----EVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE--QYGT-N	98

FIGURE 34Tii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
Tet	1AF9	39	NNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGK--A--------I------	60
A*	1DFQA	21	NNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGK--A--------I------	52
Tet	AAF73267	26	NNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGK--A--------I------	59
F*	AAG01403	25	-----ILDMRYENNKFI-DISGYGSNISINGDV-YIYSTNRNQFG--------I------	63
F*	S48110	237	-----ILDMRYENNKFI-DISGYGSNISINGDV-YIYSTNRNQFG--------I------	275
A*	AA80610	19	----SILNLRYESNHLID-------LSRYASKINIGSKVNFD--P--------IDKNQIQ	57
F*	S48109	237	-----ILDMRYENNKFI-DISGYGSNISINGNV-YIYSTNRNQFG--------I------	275
B*	CAA50145	232	----ILNLRYRDNNLI--DLSGYGAKVEVYDGVKLNDKNQFK--L--------T------	269
B*	CAA50150	232	----ILNLRYRDNNLI--DLSGYGAKVEVYDGVKLNDKNQFK--L--------T------	269
B*	CAB43706	23	----ILNLRYRDNNLI--DLSGYGANVEVYDGVELNDKNQFK--L--------T------	60

FIGURE 34Siii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	880	---TTKS------KLIGS--KEDNCGWEIYF---QNTGLVFNMID-SNGD--------EK	916
F	CAA72807	878	---IIKS------KLISS--KLDNCGWEIYL---EDNGLVFNIID-SNGS--------YK	914
E	P46082	879	---TIKS------KLIGS--KEDNCGWEIYF---ENDGLVFNIID-SNGN--------EK	915
E	A47708	879	---TIKS------KLIGS--KEDNCGWEIYF---ENDGLVFNIID-SNGN--------EK	915
E	Q06366	879	---TIKS------KLIGS--KEDNCGWEIYF---ENNGLVFNIID-SNGN--------EK	915
B	I40631	941	---DIQNYIHNEYTIINC--MKNNSGWKISI---RGNRIIWTLID-INGK--------TK	983
B	P10844	941	---GIQNYIHNEYTIINC--MKNNSGWKISI---RGNRIIWTLID-INGK--------TK	983
B	1EPWA	940	---GIQNYIHNEYTIINC--MKNNSGWKISI---RGNRIIWTLID-INGK--------TK	982
B*	AAL11498	941	---GIQNYIHNEYTIINC--MKNNSGWKISI---RGNMIIWTLID-INGK--------IK	983
B*	AAK97132	941	---GIQNYIHNEYTIINC--MKNNSGWKISI---RGNMIIWTLID-INGK--------IK	983
B/F*	CAA73968	941	---GIQNYIHNEYTIINC--MKNNSGWKISI---RGNMIIWTLID-INGK--------IK	983
E*	P30995	933	---VNNE------YTIINCMRDNNSGWKVSL---NHNEIIWTLQD-NSGI--------NQ	971
E*	BAC05434	933	---VNNE------YTIINCMRDNNSGWKVSL---NHNEIIWTLQD-NSGI--------NQ	971
B*	BAB12249	936	---VNNE------YTIINCMRDNNSGWKVSL---NHNEIIWTLQD-NSGI--------NQ	974
E*	BAB3512	933	---INNE------YTIINCMRDNNSGWKVSL---NHNEIIWTLQDNARIN--------QK	972
E*	S21178	933	---VNNE------YTIINCMRDNNSGWKVSL---NHNEIIWTLQD-NAGI--------NQ	971
E*	Q00496	933	---VNNE------YTIINCMRDNNSGWKVSL---NHNEIIWTFED-NRGI--------NQ	971
A*	Q45894	962	---YTII------NCIEN-----NSGWKVSL---NYGEIIWTLQD-NKQNIQRVVFKVSQ	1003
C*	A4977	953	---LPGY------TIIDS--VKNNSGWSIGI---ISNPLVPTLKQ-NEDS--------EQ	989
C*	P18640	953	---LPGY------TIIDS--VKNNSGWSIGI---ISNPLVPTLKQ-NEDS--------EQ	989
Tet	AAA23282	231	EYSIISS------MKKHS--LSIGSGWSVSL---KGNNLIWTLKD-SAGE--------VR	270
Tet	1DIWA	99	EYSIISS------MKKHS--LSIGSGWSVSL---KGNNLIWTLKD-SAGE--------VR	138
Tet	1FV2A	130	EYSIISS------MKKHS--LSIGSGWSVSL---KGNNLIWTLKD-SAGE--------VR	169
Tet	1D0HA	127	EYSIISS------MKKHS--LSIGSGWSVSL---KGNNLIWTLKD-SAGE--------VR	166
Tet	1DLLA	99	EYSIISS------MKKHS--LSIGSGWSVSL---KGNNLIWTLKD-SAGE--------VR	138

Figure 34Uii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
Tet	1AF9	110	EYSIISS------MKKHS--LSIGSGWSVSL---KGNNLIWTLKD-SAGE--------VR	149
A*	1DFQA	102	EYSIISS------MKKHS--LSIGSGWSVSL---KGNNLIWTLKD-SAGE--------VR	141
Tet	AAF73267	112	---IISS------MKKYS--LSIGSGWSVSL---KGNNLIWTLKD-SAGE--------VR	148
F*	AAG01403	109	---YTII------DCIRN----NNSGWKISL---NYNKIIWTLQD-TAGN--------NQ	143
F*	S48110	321	---YTKI------DCIRN----NNSGWKISL---NYNKIIWTLQD-TAGN--------NQ	355
A*	AA80610	104	---YTII------NCMEN-----NSGWKVSL---NYGEIIWTLQD-TQEI--------KQ	137
F*	S48109	321	---YTII------NCMGN----NNSGWKISLRTVRDCEIIWTLQD-TSGN--------KE	358
B*	CAA50145	308	---DIQNYIHNEYTIINC--MKNNSGWKISI---RGNRIIWTLID-INGK--------TK	350
B*	CAA50150	308	---DIQNYIHNEYTIINC--MKNNSGWKISI---RGNRIIWTLID-INGK--------TK	350
B*	CAB43706	99	---GIQNYIHNEYTIINC--IKNNSGWKISI---RGNRIIWTLTD-INGK--------TK	141

Figure 34Uiii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
Tet	1AF9	61	--HLVNNES-S-----EVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE--QYGT-N	109
A*	1DFQA	53	--HLVNNES-S-----EVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE--QYGT-N	101
Tet	AAF73267	60	--HLVNNES-S-----EVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYDTNEYS	111
F*	AAG01403	64	--YSSKPSEVN-----IAQNNDIIY---NGRYQNFSISFWVRIPKYFNKV----NLNN-E	108
F*	S48110	276	--YSSKPSEVN-----IAQNNDIIY---NGRYQNFSISFWVRIPKYFNKV----NLNN-E	320
A*	AA80610	58	LFNLESSKI-E-----VILKNAIVY---NSMYENPSTSFWIRIPKYFNSI----SLNN-E	103
F*	S48109	276	--YNSRLSEVN-----IAQNNDIIY---NSRYQNFSISFWVRIPKHYKPM----NHNR-E	320
B*	CAA50145	270	--SSADSKI-R-----VTQNQNIIF---NSMFLDFSVSFWIRIP----------KYRN-D	307
B*	CAA50150	270	--SSADSKI-R-----VTQNQNIIF---NSMFLDFSVSFWIRIP----------KYRN-D	307
B*	CAB43706	61	--SSTNSEI-R-----VTQNQNIIF---NSMFLDFSVSFWIRIP----------KYRN-D	98

FIGURE 34Tiii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	914	---IITS------KLIEN--KADNCGWEIYF---ENNGLVFSIVD-CNGN--------EE	950
B/F	CAA72807	914	---IITS------KLIEN--KADNCGWEIYF---ENNGLVFSIVD-CNGN--------EE	950
A/B/F	CAA55074	914	---IITS------KLIEN--KADNCGWEIYF---ENNGLVFSIVD-CNGN--------EE	950
B	AAB64350	914	---IITS------KLIEN--KADNCGWEIYF---ENNGLVFSIVD-CNGN--------EE	950
A/B	CAA61125	915	---TIKS------KLIGS--KEDNCGWEIYF---QDTGLVFNMID-SNGN--------EK	951
A	CAA74634	915	---TIKS------KLIGS--KEDNCGWEIYF---QDTGLVFNMID-SNGN--------EK	951
A	S68216	915	---TIKS------KLIGS--KEDNCGWEIYF---QDTGLVFNMID-SNGN--------EK	951
A	CAA63550	915	---TIKS------KLIGS--KEDNCGWEIYF---QDTGLVFNMID-SNGN--------EK	951
A	AAB42191	915	---TIKS------KLIGS--KEDNCGWEIYF---QDTGLVFNMID-SNGN--------EK	951
G	CAA1228	915	---NLSS------NLIGN--IVNNCGWQIYF---ENNGLVFSMVD-CNGN--------EK	951
D	BAA90660	914	---DDKT------RLIGN--KVNNCGWEIYF---EDNGLVFEIID-SNGN--------QE	950
C	BAA89712	914	---DDKT------RLIGN--KVNNCGWEIYF---EDNGLVFEIID-SNGN--------QE	950
C	BAB71748	914	---DDKT------RLIGN--KVNNCGWEIYF---EDNGLVFEIID-SNGN--------QE	950
D	BAA75083	914	---DDKT------RLIGN--KVNNCGWEIYF---EDNGLVFEIID-SNGN--------QE	950
C	S46430	914	---DDKT------RLIGN--KVNNCGWEIYF---EDNGLVFEIID-SNGN--------QE	950
D	AAB36016	914	---DDKT------RLIGN--KVNNCGWEIYF---EDNGLVFEIID-SNGN--------QE	950
C	P46081	914	---DDKT------RLIGN--KVNNCGWEIYF---EDNGLVFEIID-SNGN--------QE	950
A	JC4901	915	---TIKS------KLIGS--KGDNCGWEIYF---QDTGLVFNMID-SNGN--------EK	951
?	BAA12299	915	---TIKS------KLIGS--KGDNCGWEIYF---QDTGLVFNMID-SNGN--------EK	951
A	CAA74630	883	---TIKS------KLIGS--KEDNCGWEIYF---QDTGLVFNMID-SNGN--------EK	919
A	CAA61123	883	---TIKS------KLIGS--KEDNCGWEIYF---QDTGLVFNMID-SNGN--------EK	919
F	CAA67511	881	---TIKS------KLIGS--KEDNCGWEIYF---QDTGLVFNMID-SNGN--------EK	917
F	CAA61233	881	---TIKY------KLIGS--KEDNCGWEIYF---QDTGLVFNMID-SNGN--------EK	917
F	AAC60474	882	---TIKS------KLIGS--KEYNCGWEIYF---QEIGHVFNMID-SNGN--------EK	918
F	I40644	882	---TIKS------KLIGS--KEYNCGWEIYF---QEIGHVFNMID-SNGN--------EK	918

Figure 34Ui

(89) JP 2005-538954 A 2005.12.22

Toxin Serotype	Accession No.		Sequence Alignment	
A*	1DFQA	142	Q--------IT--------FRDLPDKFNAYLANK-------WVFITITNDRLSSANL-YI	177
Tet	AAF73267	149	Q--------IT--------FRDLSDKFNAYLANK-------WVFITITNDRLSSANL-YI	184
F*	AAG01403	144	KLVFNYTQMIS--------ISDY-------INK--------WIFVTITNNRLGNS-RIYI	179
F*	S48110	356	K--------L	357
A*	AA80610	138	RVVFKYSQMIN--------ISDY-------INR--------WIFVTITNNRLNNS-KIYI	173
F*	S48109	359	N--------L	360
B*	CAA50145	351	S--------VF	353
B*	CAA50150	351	S--------VF	353
B*	CAB43706	142	S--------VFFEYSIREDISDY-------INR--------WFFVTITNN--SDNAKIYI	176

Figure 34Viii

Toxin Serotype	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	951	N--------IY--------LSDV-------ISKN-------WYYISISIDRLRNQLLIFI	980
B/F	CAA72807	951	N--------IY--------LSDV-------ISKN-------WYYISISIDRLRNQLLIFI	980
A/B/F	CAA55074	951	N--------IY--------LSDV-------ISKN-------WYYISISIDRLRNQLLIFI	980
B	AAB64350	951	N--------IY--------LSDV-------ISKN-------WYYISISIDRLRNQLLIFI	980
A/B	CAA61125	952	N--------IY--------LSDV-------SNNS-------WHYITISVDRLKEQLLIFI	981
A	CAA74634	952	N--------IY--------LSDV-------SNNS-------WHYITISVDRLKEQLLIFI	981
A	S68216	952	N--------IY--------LSDV-------SNNS-------WHYITISVDRLKEQLLIFI	981
A	CAA63550	952	N--------IY--------LSDV-------SNNS-------WHYITISVDRLKEQLLIFI	981
A	AAB42191	952	N--------IY--------LSDV-------SNNS-------WHYITISVDRLKEQLLIFI	981
G	CAA1228	952	N--------IY--------LSDV-------LSKY-------WYYISVSVDRLRNKLLIFI	981
D	BAA90660	951	S--------VY--------LSNV-------INNN-------WYYISISVDRLKDQLLIFI	980
C	BAA89712	951	S--------VY--------LSNV-------INNN-------WYYISISVDRSKDQLLIFI	980
C	BAB71748	951	S--------VY--------LSNI-------INDN-------WYYISISVDRLKDQLLIFI	980
D	BAA75083	951	S--------VY--------LSNI-------INDN-------WYYISISVDRLKDQLLIFI	980
C	S46430	951	S--------VY--------LSNI-------INDN-------WYYISISVDRLKDQLLIFI	980
D	AAB36016	951	S--------VY--------LSNI-------INDN-------WYYISISVDRLKDQLLIFI	980
C	P46081	951	S--------VY--------LSNI-------INDN-------WYYISISVDRLKDQLLIFI	980
A	JC4901	952	N--------IY--------LSDV-------SNNS-------WHYITISVDRLKEQLLIFI	981
?	BAA12299	952	N--------IY--------LSDV-------SNNS-------WHYITISVDRLKEQLLIFI	981
A	CAA74630	920	N--------IY--------LSDV-------SNNS-------WHYITISVDRLKEQLLIFI	949
A	CAA61123	920	N--------IY--------LSDV-------SNNS-------WHYITISVDRLKEQLLIFI	949
F	CAA67511	918	N--------IY--------LSDV-------SNNS-------WHYITISIDRLKEQLLIFI	947
F	CAA61233	918	N--------IY--------LSDV-------SNNS-------WHYITISVDRLKEQLLIFI	947
F	AAC60474	919	N--------IY--------LSDV-------SNNS-------WHYITISVDRLKEQLLIFI	948
F	I40644	919	N--------IY--------LSDV-------SNNS-------WHYITISVDRLKEQLLIFI	948

Figure 34Vi

Toxin Serotype	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	981	NDKLIANQSIEQILNIYSSSTI--SL-----V----------NENNP---IY--VEG	1015
B/F	CAA72807	981	NDKLIANQSIEQILNIYSSNTI--SL-----V----------NENNP---IY--IEG	1015
A/B/F	CAA55074	981	NDKLIANQSIEQILNIYSSNTI--SL-----V----------NENNP---IY--IEG	1015
B	AAB64350	981	NDKLIANQSIEQILNIYSSNTI--SL-----V----------NENNP---IY--IEG	1015
A/B	CAA61125	982	DDNLVANGSIKEILNIYSSNTI--SL-----V----------NENNP---IY--VEG	1016
A	CAA74634	982	DDNLVANESIKEILNIYSSNTI--SL-----V----------NENNP---IY--VEG	1016
A	S68216	982	DDNLVANESIKEILNIYSSNII--SL-----L----------SENNP---SY--IEG	1016
A	CAA63550	982	DDNLVANESIKEILNIYSSNII--SL-----L----------SENNP---SY--IEG	1016
A	AAB42191	982	DDNLVANESIKEILNIYSSNTI--SL-----V----------NENNP---IY--VEG	1016
G	CAA1228	982	NDKLIVNESIEQILNIYSSNII--SL-----V----------NENNP---IC--IEE	1016
D	BAA90660	981	NDKNVANVSIEQILNIYSTNVI--SL-----V----------NKNNS---IY--VEE	1015
C	BAA89712	981	NDKNVANVSIEQILNIYSTNVI--SL-----V----------NKNNS---IY--VEE	1015
C	BAB71748	981	NDKNVANVSIDQILSIYSTNII--SL-----V----------NKNNS---IY--VEE	1015
D	BAA75083	981	NDKNVANVSIDQILSIYSTNII--SL-----V----------NKNNS---IY--VEE	1015
C	S46430	981	NDKNVANVSIDQILSIYSTNII--SL-----V----------NKNNS---IY--VEE	1015
D	AAB36016	981	NDKNVANVSIDQILSIYSTNII--SL-----V----------NKNNS---IY--VEE	1015
C	P46081	981	NDKNVANVSIDQILSIYSTNII--SL-----V----------NKNNS---IY--VEE	1015
A	JC4901	982	DDNLVANESIKEILNIYSSNII--SL-----L----------SENNP---SY--IEG	1016
?	BAA12299	982	DDNLVANESIKEILNIYSSNII--SL-----L----------SENNP---SY--IEG	1016
A	CAA74630	950	DDNLVANESIKEILNIYSSNTI--SL-----V----------NENNP---IY--VEG	984
A	CAA61123	950	DDNLVANESIKEILNIYSSNTI--SL-----V----------DENNP---IY--VEG	984
F	CAA67511	948	DDNLVVNESIKEILNIYSSNII--SL-----L----------SNNNA---SY--IEG	982
F	CAA61233	948	DDNLVANESIKEILNIYSSNII--SL-----L----------SENKP---SY--IEG	982
F	AAC60474	949	DDNLVVNESIKDILNIYSSNII--SL-----L----------SDNKA---SY--IEG	983
F	I40644	949	DDNLVVNESIKDILNIYSSNII--SL-----L----------SDNKA---SY--IEG	983
B/F	CAA73971	947	DDNLVVNESIKEILNIYSSNII--SL-----L----------SDNNA---SY--IEG	981

Figure 34Wi

Toxin Serotype	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	917	N--------IY--------LSDV-------SNNS-------WHYITISVDRLKEQLLIFI	946
F	CAA72807	915	K--------IY--------ISD--------MNNS-------WNYIAISVDRLKEQLLIFV	943
E	P46082	916	N--------IY--------LSNI-------SNKS-------WHYIVISINRLKDQLLIFI	945
E	A47708	916	N--------IY--------LSNI-------SNKS-------WHYIVISINRLKDQLLIFI	945
E	Q06366	916	N--------IY--------LSNI-------SNKS-------WHYIVISINRLKDQLLIFI	945
B	I40631	984	S--------VF--------FEYN-------IRED ISEYINRWFFVTIT-NNLDNA-KIYI	1018
B	P10844	984	S--------VF--------FEYN-------IRED ISEYINRWFFVTITNN--LNNAKIYI	1018
B	1EPWA	983	S--------VF--------FEYN-------IRED ISEYINRWFFVTITNN--LNNAKIYI	1017
B*	AAL11498	984	S--------VF--------FEYS-------IKED ISEYINRWFFVTITNN--SDNAKIYI	1018
B*	AAK97132	984	S--------VF--------FEYS-------IKED ISEYINRWFFVTITNN--SDNAKIYI	1018
B/F*	CAA73968	984	S--------VF--------FEYS-------IKED ISEYINRWFFVTITNN--SDNAKIYI	1018
E*	P30995	972	K--------LAFNYGNANGISDY-------INK--------WIFVTITNDRLGDSKL-YI	1007
E*	BAC05434	972	K--------LAFNYGNANGISDY-------INK--------WIFVTITNDRLGDSKL-YI	1007
E*	BAB12249	975	K--------LAFNYGNANGISDY-------INK--------WIFVTITNDRLGDSKL-YI	1010
E*	BAB3512	973	L--------VFKYGNANG-ISDY-------INK--------WIFVTITNDRLGDSKL-YI	1007
E*	S21178	972	K--------LAFNYGNANGISDY-------INK--------WIFVTITNDRLGDSKL-YI	1007
E*	Q00496	972	K--------LAFNYGNANGISDY-------INK--------WIFVTITNDRLGDSKL-YI	1007
A*	Q45894	1004	M--------VN--------ISDY-------INR--------WIFVTITNNRL-TKSKIYI	1031
C*	A4977	990	S--------IN--------FSYD-------ISNNAPGYNK-WFFVTVTNNMMGN-MKIYI	1024
C*	P18640	990	S--------IN--------FSYD-------ISNNAPGYNK-WFFVTVTNNMMGN-MKIYI	1024
Tet	AAA23282	271	Q--------IT--------FRDLPDKFNAYLANK-------WVFITITNDRLSSANL-YI	306
Tet	1DIWA	139	Q--------IT--------FRDLPDKFNAYLANK-------WVFITITNDRLSSANL-YI	174
Tet	1FV2A	170	Q--------IT--------FRDLPDKFNAYLANK-------WVFITITNDRLSSANL-YI	205
Tet	1D0HA	167	Q--------IT--------FRDLPDKFNAYLANK-------WVFITITNDRLSSANL-YI	202
Tet	1DLLA	139	Q--------IT--------FRDLPDKFNAYLANK-------WVFITITNDRLSSANL-YI	174
Tet	1AF9	150	Q--------IT--------FRDLPDKFNAYLANK-------WVFITITNDRLSSANL-YI	185

Figure 34vii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	1016	LSILNRSITSEEVVNNYFSYLNNSYIRDISGERLEYNKIYELYNYVFPENSLYEVTEN--	1073
B/F	CAA72807	1016	LSILNRSITSEEVVNNYFSYLNNSYIRDISGERLEYNKTYELYNYVFPENSLYEVTEN--	1073
A/B/F	CAA55074	1016	LSILNRSITSEEVVNNYFSYLNNSYIRDISGERLEYNKTYELYNYVFPENSLYEVTEN--	1073
B	AAB64350	1016	LSILNRSITSEEVVNNYFSYLNNSYIRDISGERLEYNKTYELYNYVFPENSLYEVTEN--	1073
A/B	CAA61125	1017	LSILNRSITSEEVVNNYFTYLNNSYIRDISGERLEYNKTYELYNYVFPESSLYEVTEN--	1074
A	CAA74634	1017	LSILNRSITSEEVVNNYFTYLNNSYIRDISGERLEYNKTYELYNYVFPESSLYEVTEN--	1074
A	S68216	1017	LTILNKPTTSQEVLSNYFEVLNNSYIRDSNEERLEYNKTYQLYNYVFSDKPICEVKQN--	1074
A	CAA63550	1017	LTILNKPTTSQEVLSNYFEVLNNSYIRDSNEERLEYNKTYQLYNYVFSDKPICEVKQN--	1074
A	AAB42191	1017	LSILNKPTTSQEVLSNYFKVLNNSYIRDSSEERLEYNKTYQLYNYVFSENPIYEIKQN--	1074
G	CAA1228	1017	LSILNKALTSEEVLNSYFTNLNNSYIRDSYGARLEYNKNYELYNYVFPENSLYEVIEN--	1074
D	BAA90660	1016	LSVLDKPVASEEVIRNYFSYLDNSYIRDSSKSLLEYNKNYQLYNYVFPETSLYEVNDN--	1073
C	BAA89712	1016	LSVLDKTVTSEEVIRNYFSYLDNSYIRDSSKSLLEYNKNYQLYNYVFPKTSLYEVNDN--	1073
C	BAB71748	1016	LSVLDNPITSEEVIRNYFSYLDNSYIRDSSKSLLEYNKNYQLYNYVFPETSLYEVNDN--	1073
D	BAA75083	1016	LSVLDNPITSEEVIRNYFSYLDNSYIRDSSKSLLEYNKNYQLYNYVFPETSLYEVNDN--	1073
C	S46430	1016	LSVLDNPITSEEVIRNYFSYLDNSYIRDSSKSLLEYNKNYQLYNYVFPETSLYEVNDN--	1073
D	AAB36016	1016	LSVLDNPITSEEVIRNYFSYLDNSYIRDSSKSLLEYNKNYQLYNYVFPETSLYEVNDN--	1073
C	P46081	1016	LSVLDNPITSEEVIRNYFSYLDNSYIRDSSKSLLEYNKNYQLYNYVFPETSLYEVNDN--	1073
A	JC4901	1017	LTILNKPTTSQEVLSNYFKVLNNSYIRDSNEERLEYNKTYQLYNYVFSDKPICEVKQN--	1074
?	BAA12299	1017	LTILNKPTTSQEVLNNYFKVLNNSYIRDSNEERLEYNKTYQLYNYVFSDKPICEVKQN--	1074
A	CAA74630	985	LSILNKPTTSQEVLSNYFKVLNNSYIRDSSEERLEYNKTYQLYNYVFSENPIYEIKQN--	1042
A	CAA61123	985	LSILNKPTTSQEVLSNYFKVLNNSYIRDSSEERLEYNKTYQLYNYVFSENPIYEIKQN--	1042
F	CAA67511	983	LTILNKPTTSQEVLSNYFKNLNNSYIRDSNEERLEYNKTYQLYNYVFSENPIYEIKQN--	1040
F	CAA61233	983	LTILNKPTTSQEVLNNYFKVLNNSYIRDSNEERLEYHKTYQLDNYVFSDKPICEVKQN--	1040
F	AAC60474	984	LTILNKPTTGEEVLRNYFKNLNNSYVRDSNDERLEYNKTYQLYDYVFPDNPICEVKQD--	1041
F	I40644	984	LTILNKPTTGEEVLRNYFKNLNNSYVRDSNDERLEYNKTYQLYDYVFPDNPICEVKQD--	1041
B/F	CAA73971	982	LTILNKPTTGEEVLSNYFKNLNNSYIRDSNWERLEYNKTYQLYNYVFSDKPICEVKQN-	1039

Figure 34Xi

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
F	CAA72807	944	NDVLVANEDIKDILNIYSSNTI--SL-----V----------SENNQ---IC--IEG	978
E	P46082	946	DNILVANEDIKEILNIYSSDII--SL-----L----------SDNNN---VY--IEG	980
E	A47708	946	DNILVANEDIKEILNIYSSDII--SL-----L----------SDNNN---VY--IEG	980
E	Q06366	946	DNILVANEDIKEILNIYSSDII--SL-----L----------SDNNN---VY--IEG	980
B	I40631	1019	NGTLESNMDIKDIGEVIVNGEI--TPKLDGDV----------DRTQF---IW--MKY	1058
B	P10844	1019	NGKLESNTDIKDIREVIANGEI--IPKLDGDI----------DRTQF---IW--MKY	1058
B	1EPWA	1018	NGKLESNTDIKDIREVIANGEI--IPKLDGDI----------DRTQF---IW--MKY	1057
B*	AAL11498	1019	NGKLESHIDIRDIREVIANDEI--IPKLDGNI----------DRTQF---IW--MKY	1058
B*	AAK97132	1019	NGKLESHIDIRDIREVIANDEI--IPKLDGNI----------DRTQF---IW--MKY	1058
B/F*	CAA73968	1019	NGKLESHIDIRDIREVIANDEI--IPKLDGNI----------DRTQF---IW--MKY	1058
E*	P30995	1008	NGNLIDKKSILNLGNIHVSDNILFKI-----V----------NCSYT---RYIGIRY	1046
E*	BAC05434	1008	NGNLIDKKSILNLGNIHVSDNILFKI-----V----------NCSYT---RYIGIRY	1046
B*	BAB12249	1011	NGNLIDKKSILNLGNIHVSDNILFKI-----V----------NCSYT---RYIGIRY	1049
E*	BAB3512	1008	NGNLIDQKSILNLGNIHVSDNILFKI-----V----------NCSYT---RYIGIRY	1046
E*	S21178	1008	NGNLIDQKSILNLGNIHVSDNILFKI-----V----------NCSYT---RYIGIRY	1046
E*	Q00496	1008	NGNLIDQKSILNLGNIHVSDNILFKI-----V----------NCSYT---RYIGIRY	1046
A*	Q45894	1032	NGRLIDQKPISNLGNIHASNKIMFKL-----D----------GCRDPRRYIM--IKY	1071
C*	A4977	1025	NGKLIDTIKVKELTGINFSKTI--TF-----EINKIPDTGLITSDSDNIN---MW--IRD	1072
C*	P18640	1025	NGKLIDTIKVKELTGINFSKTI--TF-----EINKIPDTGLITSDSDNIN---MW--IRD	1072
Tet	AAA23282	307	NGVLMGSAEITGLGAIREDNNI--TL-----KLDRCN--------NNNQY---VS--IDK	346
Tet	1DIWA	175	NGVLMGSAEITGLGAIREDNNI--TL-----KLDRCN--------NNNQY---VS--IDK	214
Tet	1FV2A	206	NGVLMGSAEITGLGAIREDNNI--TL-----KLDRCN--------NNNQY---VS--IDK	245
Tet	1D0HA	203	NGVLMGSAEITGLGAIREDNNI--TL-----KLDRCN--------NNNQY---VS--IDK	242
Tet	1DLLA	175	NGVLMGSAEITGLGAIREDNNI--TL-----KLDRCN--------NNNQY---VS--IDK	214
Tet	1AF9	186	NGVLMGSAEITGLGAIREDNNI--TL-----KLDRCN--------NNNQY---VS--IDK	225
A*	1DFQA	178	NGVLMGSAEITGLGAIREDNNI--TL-----KLDRCN--------NNNQY---VS--IDK	217

Figure 34Wii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
F	CAA72807	979	LSILNTNITKEEVLNNYFADLNNSYIRNGNEERLEYNKKYNLFNYVFSKTPICKVNHN--	1036
E	P46082	981	LSVLNKTINSNEILTDYFSDLNNSYIRNFDEEILQYNRTYELFNYVFPEIAINKIEQN--	1038
E	A47708	981	LSVLNKTINSNEILTDYFSDLNNSYIRNFDEEILQYNRTYELFNYVFPEIAINKIEQN--	1038
E	Q06366	981	LSVLNKTINSNEILTDYFSDLNNSYIRNFDEEILQYNRTYELFNYVFPEIAINKIEQN--	1038
B	I40631	1059	FSIFNTQLNQSNIKEIYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFN	1102
B	P10844	1059	FSIFNTELSQSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFN	1102
B	1EPWA	1058	FSIFNTELSQSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFN	1101
B*	AAL11498	1059	FSIFNTELSQSNIEEIYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFN	1102
B*	AAK97132	1059	FSIFNTELSQSNIEEIYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFN	1102
B/F*	CAA73968	1059	FSIFNTELSQSNIEEIYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFN	1102
E*	P30995	1047	FNIFDKELDETEIQTLYNNEPNANILKDFWGNYLLYDKEYYLLNVLKPNNFINRRTDSTL	1106
E*	BAC05434	1047	FNIFDKELDETEIQTLYNNEPNANILKDFWGNYLLYDKEYYLLNVLKPNNFINRRTDSTL	1106
E*	BAB12249	1050	FNIFDKELDETEIQTLYNNEPNANILKDFWGNYLLYDKEYYLLNVLKPNNFINRRTDSTL	1109
E*	BAB3512	1047	FNIFDKELDETEIQTLYSNEPNTNILKDFWGNYLLYDKGYYLLNVLKPNNFIDRRKDSTL	1106
E*	S21178	1047	FNIFDKELDETEIQTLYSNEPNTNILKDFWGNYLLYDKEYYLLNVLKPNNFIDRRKDSTL	1106
E*	Q00496	1047	FNIFDKELDETEIQTLYSNEPNTNILKDFWGNYLLYDKEYYLLNVLKPNNFIDRRKDSTL	1106
A*	Q45894	1072	FNLFDKELNEKEIKDLYDSQSNSGILKDFWGNYLQYDKPYYMLNLFDP	1119
C*	A4977	1073	FYIFAKELDGKDINILPNSLQYTNVVKDYWGNDLRYNKEYYMVNIDYLNRYMY-ANSR--	1129
C*	P18640	1073	FYIFAKELDGKDINILPNSLQYTNVVKDYWGNDLRYNKEYYMVNIDYLNRYMY-ANSR--	1129
Tet	AAA23282	347	FRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYL	388
Tet	1DIWA	215	FRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYL	256
Tet	1FV2A	246	FRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYL	287
Tet	1D0HA	243	FRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYL	284
Tet	1DLLA	215	FRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYL	256
Tet	1AF9	226	FRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYL	267

Figure 34Xii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
Tet	AAF73267	185	NGVLMGSAEITGLGAIREDNNI--TL-----KLDRCN--------NNNQY---VS--IDK	224
F*	AAG01403	180	NGNLIDEKSISNLGDIHVSDNI--LFKIVG-C----------NDTRY---VG--IRY	218
A*	AA80610	174	NGRLIDQKPISNLGNIHASNNI--MF-----KLDGCR--------DTHRY---IW--IKY	213
B*	CAB43706	177	NGKLESNIDIKDIGEVIANGEI--IPKLDGDI----------DRTQF---IW--MKY	216

Figure 34Wiii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	1040	--NNIYLTINNTNNLNLQASK--PKLLSIN---PNKQYVQKPDEVIISVLD---------	1083
F	CAA72807	1037	--NKIYLSINNDDNLNVKPLS--FMLLSVD---SNKKYVQKCDEVIISVLD---------	1080
E	P46082	1039	--NNIYLSINNENNLNFKPLK--FKLLNTN---PNKQYVQKWDEVIFSVLD---------	1082
E	A47708	1039	--NNIYLSINNENNLNFKPLK--FKLLNTN---PNKQYVQKWDEVIFSVLD---------	1082
E	Q06366	1039	--NNIYLSNNNENSLNFKPLK--FKLLNTN---PNKQYVQKWDEVIFSVLD---------	1082
E*	P30995	1107	SINNIRSTILLANRL-YSGIK--VKIQRVNNSSTNDNLVRKNDQVYINFVASKTHLLPLY	1163
E*	BAC05434	1107	SINNIRSTILLANRL-YSGIK--VKIQRVNNSSTNDNLVRKNDQVYINFVASKTHLLPLY	1163
E*	BAB12249	1110	SINNIRSTILLANRL-YSGIK--VKIQRVNNSSTNDNLVRKNDQVYINFVASKTHLLPLY	1166
E*	BAB3512	1107	SINNIRSTILLANRL-YSGIK--VKIQRVNDSSTNDRFVRKNDQ	1147
E*	S21178	1107	SINNIRSTILLANRL-YSGIK--VKIQRVNNSSTNDNLVRKNDQVYINFVASKTHLPPLY	1163
E*	Q00496	1107	SINNIRSTILLANRL-YSGIK--VKIQRVNNSSTNDNLVRKNDQVYINFVASKTHLPPLY	1163
C*	A4977	1130	--QIVFNTRRNNNDFN-EGYKIIIKRIRGN---TNDTRVRGGD	1166
C*	P18640	1130	--QIVPNTRRNNNDFN-EGYKIIIKRIRGN---TNDTRVRGGD	1166
F*	AAG01403	274	--SN	275

FIGURE 34Yii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
A*	1DFQA	218	FRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYL	259
Tet	AAP73267	225	FRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYL	266
F*	AAG01403	219	FKVFDTELGKTEIETLYSDEPDPSILKDFWGNYLLYNKRYYLLNLLRTDKS---ITQN--	273
A*	AA80610	214	FNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNSGILKDFWGDYLQYDKPYYMLNLYDP	261
B*	CAB43706	217	FSIFNTELSQSNIKEIYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFN	260

FIGURE 34Xiii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	1118	------DEEKYVDISSENNRIQLVSSRDTAKKIIFNNDIFKPNCLTFAYNNKYLSLSFRD	1171
B/F	CAA72807	1118	------DEEKYVDISSENNRIQLVSSKDTAKRIIFNNDIFRPNCLTFAYNNKYLSLSLRD	1171
A/B/F	CAA55074	1118	------DEEKYVDISSENNRIQLVNSKDTAKRIIFNNDIFMPNCLTFAYNNKYLSLSLRD	1171
B	AAB64350	1118	------DEEKYVDISSENNRIQLVNSKDTAKRIIFNNDIFMPNCLTFAYNNKYLSLSLRD	1171
A/B	CAA61125	1119	------DEEKYVDISSENNRIQLVSSKDTAKRIIFNNDIFRPNCLTFAYNNKYLSLSLRD	1172
A	CAA74634	1119	------DEEKYVDISSENNRIQLVSSKDTAKRIIFNNDIFRPNCLTFAYNNKYLSLSLRD	1172
A	S68216	1119	------NMEKYIDI-SEDNRLQLIDNKNNAKKMIISNDIFISNCLTLSYNGKYICLSMKD	1171
A	CAA63550	1119	------NMEKYIDI-SEDNRLQLIDNKNNAKKMIISNDIFISNCLTLSYNGKYICLSMKD	1171
A	AAB42191	1119	------NMEKYIDI-SEDNRLQLIDNKNNAKKMIISNDIFISNCLIISYNGKYICLSMKD	1171
G	CAA1228	1119	------DTEKYADIQAGNNRIQLVNSKDNARKIIVNNNIFRPNCVLFSYNNKYLSLSLRN	1172
D	BAA90660	1118	------GTEKYLDISPENNRIQLVSSKDNAKKITVNTDLFRPDCITFSYNDKYFSLSLRD	1171
C	BAA89712	1118	------GTEKYLDISSENNRIQLVSSKDNAKKITVNTDLFRPDCITFSYNDKYFSLSLRD	1171
C	BAB71748	1118	------GTEKYLDISPENNRIQLVSSKDNAKKITVNTDLFRPDCITFSYNDKYFSLSLRD	1171
D	BAA75083	1118	------GTEKYLDISPENNRIQLVSSKDNAKKITVNTDLFRPDCITFSYNDKYFSLSLRD	1171
C	S46430	1118	------GTEKYLDISPENNRIQLVSSKDNAKKITVNTDLFRPDCITFSYNDKYFSLSLRD	1171
D	AAB36016	1118	------GTEKYLDISPENNRIQLVSSKDNAKKITVNTDLFRPDCITFSYNDKYFSLSLRD	1171
C	P46081	1118	------GTEKYLDISPENNRIQLVSSKDNAKKITVNTDLFRPDCITFSYNDKYFSLSLRD	1171
A	JC4901	1119	------NMEKYIDI-SEDNRLQLIDNKNGAKKMIISNDMFISNCLTLSCGGKYICLSMKD	1171
?	BAA12299	1119	------NMEKYIDI-SEDNRLQLIDNKNGAKKMIISNDMFISNCLTLSCGGKYICLSMKD	1171
A	CAA74630	1087	------NMEKYIDI-SEDNRLQLIDNKNNAKKMIISNDIFISNCLIISYNGKYICLSMKD	1139
A	CAA61123	1087	------NMEKYIDI-SEDNRLQLIDNKNNAKKMIISNDIFISNCLIISYNGKYICLSMKD	1139
F	CAA67511	1085	------NMEKYIDI-SEDNRLQLIDNKNGAKKMIISNNIFISNCLTLSCGGKYICLSMKD	1137
F	CAA61233	1085	------NMEKYIDI-SEDNRLQLIDNKNGAKKMIISNDMFISNCLTLSCGGKYICLSMKD	1137
F	AAC60474	1086	------DTEKYVCISNENNRVKIIDNKIMQVKFIISNDIFISNCLTHAHNNKYICLSMKD	1139
F	I40644	1086	------DTEKYVCISNENNRVKIIDNKIMQVKFIISNDIFISNCLTHAHNNKYICLSMKD	1139

FIGURE 34Zi

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	1074	--NNIYLSIKDTNDLNIQGAK--FKLINID---TNKQYVQKWDEGVVCLLG---------	1117
B/F	CAA72807	1074	--NNIYLSIKDTNNLNIQGAK--FKLINID---ANKQYVQKWDEGVVCLLG---------	1117
A/B/F	CAA55074	1074	--NNIYLSIKDTNNLNIQGAK--FKLINID---ANKQYVQKWDEGVVCLLG---------	1117
B	AAB64350	1074	--NNIYLSIKDTNNLNIEGAK--FKLINID---ANKQYVQKWDEGVVCLLG---------	1117
A/B	CAA61125	1075	--NNIYLSIKNTNNLNIQGAK--FKLINID---ANKQYVQKWDEGVVCLLG---------	1118
A	CAA74634	1075	--NNIYLSIKNTNNLNIQGAK--FKLINID---ANKQYVQKWDEGVVCLLG---------	1118
A	S68216	1075	--NNIYLTINNTNNLNLQASK--FKLLSIN---PNKQYVQKLDEVIISVLD---------	1118
A	CAA63550	1075	--NNIYLTINNTNNLNLQASK--FKLLSIN---PNKQYVQKLDEVIISVLD---------	1118
A	AAB42191	1075	--NNIYLTINNTNNLNLQVSK--FKLLSIN---PNKQYVQKLDEVIISVLD---------	1118
G	CAA1228	1075	--NNMYLSIKNINNTNILGAK--FKLINTD---ESKQYVQKWDEVIICVLG---------	1118
D	BAA90660	1074	--NKSYLSLKNTDGINIPSVK--FKLINID---ESKGYVQKWDECIICVSD---------	1117
C	BAA89712	1074	--NKSYLSLKNTDGINIPSVK--FKLINID---ESKGYVQKWDECIICVSD---------	1117
C	BAB71748	1074	--NKSYLSLKNTDGINISSVK--FKLINID---ESKVYVQKWDECIICVLD---------	1117
D	BAA75083	1074	--NKSYLSLKNTDGINISSVK--FKLINID---ESKGYVQKWDECIICVLD---------	1117
C	S46430	1074	--NKSYLSLKNTDGINISSVK--FKLINID---ESKVYVQKWDECIICVLD---------	1117
D	AAB36016	1074	--NKSYLSLKNTDGINISSVK--FKLINID---ESKGYVQKWDECIICVLD---------	1117
C	P46081	1074	--NKSYLSLKNTDGINISSVK--FKLINID---ESKVYVQKWDECIICVLD---------	1117
A	JC4901	1075	--NNIYLTINNTNNLNLQPSK--FKLLSIN---PNKQYVQKLDEVIISVLG---------	1118
?	BAA12299	1075	--NNIYLTINNTNNLNLQPSK--FKLLSIN---PNKQYVQKLDEVIISVLG---------	1118
A	CAA74630	1043	--NNIYLTINNTNNLNLQVSK--FKLLSIN---PNKQYVQKLDEVIISVLD---------	1086
A	CAA61123	1043	--NNIYLTINNTNNLNLQVSK--FKLLSIN---PNKQYVQKLDEVIISVLD---------	1086
F	CAA67511	1041	--NNIYLTINNTNNLNLQASK--FKLLSIN---PNKQHVQKFDEVIISILD---------	1084
F	CAA61233	1041	--NNIYLTINNTNNLNLQPSK--FKLLSIN---SNKQYVQKFDEVIISILG---------	1084
F	AAC60474	1042	--NNIYLTINNINNLNMKPCK--FKLLSIN---SNKQYVQKWDEVIISVLY---------	1085
F	I40644	1042	--NNIYLTINNINNLNMKPCK--FKLLSIN---SNKQYVQKWDEVIISVLY---------	1085

FIGURE 34Yi

(92) JP 2005-538954 A 2005.12.22

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B/F	CAA73971	1084	------NMEKYIDI-SEDNRLQLIDMKNSAKKMIISNDIFISNCLTLSYGDKYVCLSMKD	1136
F	CAA72807	1081	------DKERYLCKSNEDNRIEIVDNKSSANIFIINNDIFISNCLTLKFNNKFIYLSEKV	1134
E	P46082	1083	------GTEKYLDISTTNNRIQLVDNKNNAQIFIINNDIFISNCLTLTYNNVNVYLSIKN	1136
E	A47708	1083	------GTEKYLDISTTNNRIQLVDNKNNAQIFIINNDIFISNCLTLTYNNVNVYLSIKN	1136
E	Q06366	1083	------GTEKYLDISIDNNRIQLVDNKNNAKTFIINNDIFISNCLTLTYNNVNVYLSIKN	1136
E*	P30995	1164	ADTATTNKEKTIKISSSGNRFNQV	1187
E*	BAC05434	1164	ADTATTNKEKTIKISSSGNRFNQV	1187
E*	BAB12249	1167	ADTATTNKEKTIKISSSGNRFNQV	1190
E*	S21178	1164	ADTATTNKEKTIKISSSGNRFNQV	1187
E*	Q00496	1164	ADTATTNKEKTIKISSSGNRFNQV	1187
F	AAA23209	1	KKMIISNNIFISNCLTLSCGGKYICLSMKD	30

Figure Zii

Toxin Sero-type	Accession No.		Sequence Alignment	
B	CAA73971	1172	RNYNWMIYNNNDNIPKAAHLWTLKGI	1197
B/F	CAA72807	1172	RNYNWMICNNNNNIPKAAHLWALKGI	1197
A/B/F	CAA55074	1172	RNYNWMICNNNDNIPKAAHLWALKGI	1197
B	AAB64350	1172	RNYNWMICNNNDNIPKAAHLWALKGI	1197
A/B	CAA61125	1173	RNYNWMICNNNDNIPKAAHLWALKGI	1198
A	CAA74634	1173	RNYNWMICNNNDNIPKAAHLWALKGI	1198
G	CAA1228	1173	RNYNWMICNDNSFIPKHAHLWILKKI	1198
D	BAA90660	1172	GDYNWMICNDNNKVPKGAHLWILK	1195
C	BAA89712	1172	GDYNWMICNDNNKVPKGAHLWILE	1195
C	BAB71748	1172	GDYNWMICNDNNKVPKGAHLWILE	1195
D	BAA75083	1172	GDYNWMICNDNNKVPKGAHLWILE	1195
C	S46430	1172	GDYNWMICNDNNKVPKGAHLWILE	1195
D	AAB36016	1172	GDYNWMICNDNNKVPKGAHLWILE	1195
C	P46081	1172	GDYNWMICNDNNKVPKGAHLWILE	1195
F	CAA67511	1138	ENYNWMICNNESNIPKKAYLWTLKEV	1163
F	AAC60474	1140	ENYNWMICNNESNIPKKAYLWILKEV	1165
F	I40644	1140	ENYNWMICNNESNIPKKAYLWILKEV	1165
B/F	CAA73971	1137	ENYNWMICNNESNIPKKAYLWILKEV	1162
F	CAA72807	1135	MNYNWIECENKYTIPKKAYLWILKNI	1160
E	P46082	1137	QDYNWVICDLNHDIPKKSYLWILKNI	1162
E	A47708	1137	QDYNWVICDLNHDIPKKSYLWILKNI	1162
E	Q06366	1137	QDYNWVICDLNHDIPKKSYLWILKNI	1162
F	AAA23209	31	ENYNWMICNNESNIPKKAYLWTLKEV	56

FIGURE 34AAi

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/17408

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A61K 39/08
US CL : 424/239.1
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)
U.S. : 424/239.1, 424/199.1, 435/69.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
NPL (ASM electronic journals, JBC, PUBMED)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPIDS, CNFSCI, SCISEARCH, WEST 2.1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	PARK et al. " Inhalational Poisoning by Botulinum Toxin and Inhalation Vaccination with Its Heavy Chain Component". Infection and Immunity. March 2003, Vol. 71, No. 3, pages 1147-1154, see the entire document.	1-29
Y	MAKSYMOWYCH et al. " Pure Botulinum Neurotoxin Is Absorbed from the Stomach and Small Intestine and Produces Peripheral Neuromuscular Blokade". Infection and Immunity. September 1999, Vol. 67, No. 9, pages 4708-4712, see the entire document.	1-29
Y	KIYATKIN et al. " Induction of Immune Response by Oral Administration of Recombinant Botulinum Toxin". Infection and Immunity. November 1997, Vol. 65, No. 11, pages 4586-4591, see the entire document.	1-29
Y	MAKSYMOWYCH et al. " Binding and Transcytosis of Botulinum Neurotoxin by Polarized Human Colon Carcinoma Cells". The Journal of Biological Chemistry. 21 August 1998, Vol. 273, No. 34, pages 21950-21957, see the entire document.	1-29
Y	WO 00/02524 A2 (U.S. MEDICAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES) 20 January 2000 (20.01.2000), see entire document.	1-29

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 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
24 September 2003 (24.09.2003)

Date of mailing of the international search report
13 NOV 2003

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer
Khatol Shahnan-Shah
Telephone No. (703)308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

PCT/US03/17408

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEE et al. " Candidate Vaccine against Botulinum Neurotoxin Serotype A Derived from a Venezuelan Equine Encephalitis Virus Vector System". Infection and Immunity. September 2001, Vol. 69, No. 9, pages 5709-5715, see the entire document.	1-29
Y	PLESS et al. " High-Affinity Antibodies to the Binding Domain of Botulinum Neurotoxin Type A ". Infection and Immunity. January 2001, Vol. 69, No. 1, pages 570-574, see the entire document.	1-29
Y	SaATHYAMOORTHY et al. " Separation, Purification, Partial Characterization and Comparison of the Heavy and Light Chains of Botulinum Neurotoxin Types A, B and E". The Journal of Biological Chemistry. 5 September 1985, Vol. 260, No. 19, pages 10461-10466, see the entire document.	1-29
Y	BANDYOPADHYAH et al. " Role of the Heavy and Light Chains of Botulinum Neurotoxin in Neuromuscular Paralysis". The Journal of Biological Chemistry. 25 February 1987, Vol. 262, No. 6, pages 2660-2663, see the entire document.	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/17408

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-29

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/17408

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING:

I. Claims 1-29 are, drawn to a composition for translocating an entity across epithelium of an animal.
II. Claims 30-40 and 52 are, drawn to a composition that elicits an immune response against an antigen in a vertebrate.
III. Claims 41-47 are, drawn to a composition that elicits an immune response against a Botilinum neurotoxin in a vertebrate.
VI. Claims 48-51 are, drawn to a vaccine.
V. Claims 53-80 are, drawn to a method of translocating an entity across epithelium of an animal.
VI. Claim 81 is, drawn to a method of inducing an immune response against botulinum neurotoxin in a vertebrate.
VII. Claims 82-83 are drawn to a pharmaceutical composition for rapid delivery of an entity to the bloodstream.
VIII. Claim 84 is, drawn to a foodstuff.
IX. Claim 85 is drawn to a polypeptide.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 39/07	Ａ６１Ｋ 39/08		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ 39/08	Ａ６１Ｋ 39/10		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ 39/10	Ａ６１Ｋ 39/106		
Ａ６１Ｋ 39/106	Ａ６１Ｋ 39/12		
Ａ６１Ｋ 39/12	Ａ６１Ｋ 39/193		
Ａ６１Ｋ 39/193	Ａ６１Ｋ 39/215		
Ａ６１Ｋ 39/215	Ａ６１Ｋ 39/395	Ｄ	
Ａ６１Ｋ 39/395	Ａ６１Ｋ 39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｋ 47/42	Ａ６１Ｋ 47/42		
Ａ６１Ｐ 31/04	Ａ６１Ｐ 31/04		
Ａ６１Ｐ 31/12	Ａ６１Ｐ 31/04	１７１	
Ｃ０７Ｋ 14/33	Ａ６１Ｐ 31/12		
Ｃ１２Ｎ 5/06	Ａ６１Ｐ 31/12	１７１	
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ０７Ｋ 14/33		
// Ａ６１Ｋ 49/04	Ａ６１Ｋ 37/02		
Ａ６１Ｋ 51/00	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ｅ	
Ｃ１２Ｎ 15/09	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ｂ	
	Ａ６１Ｋ 43/00		
	Ａ６１Ｋ 49/02	Ａ	
	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ａ	
	Ａ６１Ｋ 49/04	Ａ	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100130465
弁理士 吉田 匠
(74)代理人 100129333
弁理士 中島 拓
(72)発明者 ラーンス シンプソン
アメリカ合衆国 ０８０５７ ニュージャージー、モーズタウン、フォックスウッド ドライブ １２２
(72)発明者 アンドルー マクシモウィッチ
アメリカ合衆国 １９４２８ ペンシルベニア、ガルフ ミルズ、レベル ヒル ロード １２１０
(72)発明者 パク ジョンビク
アメリカ合衆国 ０８０４３ ニュージャージー、ブーリーズ、ビブス ロード １１５０－７

Ｆターム(参考) 4B018 MD20 MD44 MD94
4B024 AA01 AA05 AA20 BA31 BA38 CA02 DA02 GA11 HA20
4B065 AA23Y AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 BA01 BA30 CA24 CA41 CA43 CA44 CA45
4C076 AA12 BB21 BB22 BB24 BB25 BB29 BB30 BB34 BB36 CC03 CC06 EE41N EE59N FF11 FF34 GG41
4C084 AA01 AA02 AA12 CA01 CA03 CA04 DC50 MA05 MA17 MA55

	MA56	MA57	MA58	MA59	MA60	NA14	ZB33	ZB35		
4C085	AA03	AA13	AA14	AA33	BA07	BA12	BA17	BA20	BA47	BA51
	BA71	CC07	CC08	FF11	FF13	GG10	HH01	HH03	HH05	JJ02
	KA26	KA29								
4H045	AA10	AA30	BA10	BA41	BA50	CA11	CA40	DA83	EA20	FA50
	FA74									