



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0138245
(43) 공개일자 2017년12월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/108 (2006.01) A61K 38/48 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/0258 (2013.01)
A61K 38/4893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0070405
(22) 출원일자 2016년06월07일
심사청구일자 2016년06월07일

(71) 출원인
국방과학연구소
대전광역시 유성구 북유성대로488번길 160 (수남동)
(72) 발명자
송동현
대전광역시 유성구 지족로190번길 16, 205동 1805호 (지족동, 새미래숲아파트)
유치호
세종특별자치시 다솜로 290, 311동 201호 (어진동, 한뜰마을3단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단 도메인 돌연변이로 독성활성이 제거된 보툴리눔 독소 A형을 포함하는 보툴리눔 독소 A형 백신 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 보툴리눔 독소 A형의 Heavy Chain C-terminal(Hc) 도메인에 해당하는 트레오닌(Threonine; Thr) 876번부터 루신(Leusine; Leu) 1296번 세포결합 부위에 존재하는 알지닌(Arginine; Arg) 1269번, 타이로신(Tyrosine; Tyr) 1117번, 히스티딘(Histidine; His) 1253번, 트립토판(Tryptophan; Trp) 1266번, 글루탐산(Glutamate; Glu) 1203번을 알라닌(Alanine; Ala)으로 치환하여 독성활성 부위를 제거하고 세포결합력을 억제한 보툴리눔 독소 A형 백신 및 이의 제조방법에 관한 것으로 보툴리눔 독소 A형 중독에 의해 유발되는 질환의 예방 및 치료하기 위한 조성물로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1

보툴리눔 독소 A형 백신 유전자 서열 #1

```
ACCAGCATTCGAACTCGCTTATGAAAGCAACCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCCAGCAAAATCAATATTGGTAGCAAAGTGAACCTCGATC
CGATCGATAAAAAATCAGATCCAGCTGTTAATCTGGAAGCAGCAAAATTGAGGTGATCCTGAAAAACGCCATTGTGTATAATAGCATGTACGAGAA
TTTCTCGACCGAGCTTTGGATTCTGATCCCGAAATACTTTAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTACACCATTTAACTGCATGGAACCAATAGC
GGTTGGAAGTGAGCCTGAATTATGGTGAAATTATCTGGACCTGCAGGATACCAAGAAATCAACAGCGTGTGTGTCAATACAGCCAGATGA
TTAATACAGCGATTACATTAACCGCTGGATCTTTGTGACCATTAACAATAATCGTCTGAACAATAGCAAAATCTACATCAACGGTCTGCTGATTGA
CCAGAAACCGATTAGCAATCTGGGTAATATTCATGCGAGCAACAACATCATGTTTAACTGGATGGTTGTCGTGATACCCATGTTATATTGGATC
AAATACTTCAACCTGTTGATAAAGAACTGAACGAAAAAGAAATTAAGACCTGTATGATAACAGAGCAATAGCGGCATCCTGAAAGATTTTGGG
GTGATTATCTGCAGTATGATAAACCGTATTACATGCTGAATCTGTATGATCCGAACAATAATGTGGATGTGAATAATGTGGGTATCCGTGGCTATAT
GTATCTGAAAGGTCGCGTGGTATGCGTTATGACCAACACATTTATCTGAATAGCAGCCTGTATCGTGGCACCAAAATTCATCATCAAAAAATACGCC
AGCGGCAACAAAGATAATATTGCGCTAATATGACCGCGTGTATATTAACGTTGTGGTGAACCAAGAAATATCGCCTGGCAACCAATGCAAGCC
AGGCAGCGCTTGAAGAAATCTGAGCGCACTGGAAATCCGGATGTTGGTAATCTGAGCCAGGTTGTTGTTATGAAATCCAAAAATGATCAGGGCAT
CACCACAAATGCAAAATGAATCTGCAGGACAATAACGGCAACGATATTGTTTTATTGGCTTCCACAGTTCAACAACATTGCAAAATCGTTGCA
AGCAATTGGTATAACGCAAGATTGAACGTAGCAGCCGTACCTGGGTTGTAGCTGGGAATTTATCCGGTTGATGATGTTGGGGTGAAGCTCCGC
TGTA
```

보툴리눔 독소 A형 백신 단백질 서열 #1

```
TSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVNSMYENFSTSFWRIPKYFNSISLNEYTIINCMENNS
GWKVSINYEIIWTLQDTQEIQRVVFYKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPIISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWI
KYFNLFDKELNEKEIKLDYDNQNSGILKDFWGDYLYQDKPYMYLNLDPNKYVDVNNVIRGYMYLKGPRGSVMTNIIYLNSSLYRGTKFIIKKYA
SGNKDNIVRNDRVYINVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVMKSKNDQGITNCKMNLQDNNNGNDIGFIFGHQFNNAIKLVA
SNWYNAQIERSSRTLGCSEWEIFVDDGWGERPL
```

①: R1269A 치환 부위

(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 2039/55516 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

정우현

경상북도 구미시 왕산로 28-12, 110동 702호 (임은동, 삼도뷰엔빌W아파트)

허경행

대전광역시 유성구 가정로 63, 106동 602호 (신성동, 럭키하나아파트)

정성태

서울특별시 강남구 삼성로 212, 15동 706호 (대치동, 은마아파트)

김지천

대전광역시 유성구 배울1로 13, 212동 1404호 (관평동, 대우푸르지오)

김왕수

대전광역시 서구 청사로 65, 111동 907호 (월평동, 황실타운아파트)

신영기

서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 114동 1301호 (대치동, 삼성아파트)

김영덕

인천광역시 남구 주승로 231, 5동 907호 (관교동, 쌍용아파트)

최준영

경기도 광명시 하안로 320, 1011동 1001호 (하안동, 하안10단지고층주공아파트)

박경의

서울특별시 양천구 월정로8길 20, 201호 (신월동, 예담쉐르빌5차)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 5 내지 서열번호 7 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지는 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 독성이 제거된 보툴리눔 독소 A형으로 이루어진 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소 A형 백신.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 보툴리눔 독소 A형 백신은 서열번호 1의 아미노산 서열 중 N-말단으로부터 1269번째 아미노산이 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환되어 서열번호 2로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소 A형 백신.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 보툴리눔 독소 A형 백신은 서열번호 1의 아미노산 서열 중 N-말단으로부터 1117번째, 1253번째 및 1266번째 아미노산이 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환되어 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소 A형 백신.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 보툴리눔 독소 A형 백신은 서열번호 1의 아미노산 서열 중 N-말단으로부터 1203번째, 1253번째 및 1266번째 아미노산이 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환되어 서열번호 4로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소 A형 백신.

청구항 5

제1항의 서열번호 5로 기재된 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인을 코팅하는 서열번호 8로 기재된 핵산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소 A형 유전자.

청구항 6

제1항의 서열번호 6으로 기재된 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc)을 코팅하는 서열번호 9로 기재된 핵산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소 A형 유전자.

청구항 7

제1항의 서열번호 7로 기재된 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc)을 코팅하는 서열번호 10으로 기재된 핵산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소 A형 유전자.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 보툴리눔 독소 A형 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

청구항 9

제8항의 발현벡터로 형질전환된 원핵세포 형질전환체를 배양하는 단계; 및

상기 원핵세포 형질전환체로부터 발현된 목적 단백질을 보툴리눔 독소 A형을 분리 정제하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소 A형 백신의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 원핵세포가 대장균인 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소 A형 백신의 제조방법.

청구항 11

서열번호 5 내지 서열번호 7 중 어느 하나 항의 아미노산 서열을 가지는 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인을 포함하여 이루어진 보툴리눔 독소 A형 백신을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소 A형에 의해 유발되는 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 보툴리눔 독소 A형 백신은 서열번호 1의 아미노산 서열 중 N-말단으로부터 1269번째 아미노산이 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환되어 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열, 또는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 N-말단으로부터 1117번째, 1253번째 및 1266번째 아미노산이 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환되어 서열번호 4으로 기재된 아미노산 서열, 또는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 N-말단으로부터 1203번째, 1253번째 및 1266번째 아미노산이 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환되어 서열번호 5로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소 A형에 의해 유발되는 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 보툴리눔 독소 A형 백신은 제9항의 제조방법으로 제조된 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소 A형에 의해 유발되는 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 보툴리눔 독소 A형에 의해 유발되는 질환의 예방 및 치료용 조성물은 콜레라독신, 알루미늄 하이드록사이드, 카보폴(carbopol), 광물성 오일 및 생분해성(biodegradable) 오일 중에서 선택되는 어느 1종 이상의 면역증강제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소 A형에 의해 유발되는 질환의 예방 및 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인에 아미노산 치환을 통한 돌연변이를 만듦으로써 독성활성이 제거된 보툴리눔 독소 A형을 포함하는 보툴리눔 독소 A형 백신 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

보툴리눔 독소는 *Clostridium botulinum*이라는 박테리아에 의해 생성되는 독소로써 LD₅₀(여기서, LD₅₀은 감염 시에 50%의 치사율을 유도하는 농도를 의미함)이 kg당 1ng 수준으로 현존하는 생물독소 중 가장 강력한 독소로 알려져 있다. 이러한 높은 독성 때문에 미국 질병관리본부(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)에서는 위험도, 생산 및 무기화 가능성 등을 고려하여 분류한 생물학 작용제 카테고리중에서 탄저, 페스트 및 두창과 함께 A 등급에 포함되어 규제되고 있다. 이 독소는 다른 생물학 작용제에 해당하는 병원체와 달리 생장이나 감염과의 연관성은 없으나 독소 자체의 살상력이 강력하여 실제 과거 전쟁 등 테러에서 사용된 예가 있다.

[0003]

생물학 무기로 사용하기 위해서 1930년대 초 일본의 731 부대에서 독소에 대한 치사량을 측정하기 위해 포로들

을 대상으로 실험한 기록이 있고 1944년 미육군의 세균전 연구소의 산츠(Edward J. Schantz)에 의해 보툴리눔 균을 배양하고 독소를 분리하는 방법을 발견하면서 개발 및 방어에 대한 연구가 시작되었다. 또한 1995년 일본의 옴(Aum) 진리교에서 사린가스와 함께 사용되어 전 세계적으로 이슈화된 적이 있다. 이렇듯 생물학 무기로도 사용될 수 있지만 농경지나 가축 또는 음식물 등에 의한 감염 사례 역시 나타나고 있어 이에 대한 연구가 중요 시되고 있다. 현재 미국 등 일부 선진국들에 의해서 보툴리눔에 대한 치료와 예방을 위한 다양한 연구가 진행되고 있지만 사용이 제한적이거나 생산량이 많지 않아 백신 개발이 시급한 실정이다.

[0004] 보툴리눔 독소는 항원 특이성에 따라 7가지 혈청형(A, B, C, D, E, F, G)으로 구분되는데, 그 중 A, B, E형이 주로 인체에 질병을 일으키며, 특히 A형의 경우 인체에서 가장 강한 독성을 나타낸다. 이 독소는 사람사이의 전파는 일어나지 않으며, 독소 유입 경로에 따라 크게 식품 매개, 상처형, 유아형, 흡입형의 4가지 형태로 구분된다. 인위적으로 발생하는 보툴리눔 독소증은 주로 식품 매개나 흡입형으로 쉽게 전파될 수 있다.

[0005] 보툴리눔 독소 A형은 약 150kDa 크기의 단백질로 하나의 펩타이드(Peptide)로 구성되어 있고 그 기능에 따라 크게 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc), 중쇄 N말단(Heavy Chain N-terminal, Hn), 경쇄(Light Chain, LC) 세 가지의 도메인으로 나눌 수 있다.

[0006] 먼저 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 부분에 해당하는 도메인은 약 50 kDa의 분자량을 가지고 있으며 콜린성 신경세포에 존재하는 수용체(receptor)에 특이적인 결합에 관여하는 부분으로 폴리사이알로간글리시드(Polysialoganglioside)나 시냅토타그민(synaptotagmin)과 같은 수용체를 인지하는 것으로 알려져 있다. 이러한 수용체와 결합 후 보툴리눔 독소는 세포내로 들어가게 된다.

[0007] 다음으로는 중쇄 N말단(Heavy Chain N-terminal, Hn) 부분에 해당하는 도메인으로 이 역시 약 50 kDa의 분자량을 가지고 있으며 세포내로 들어온 보툴리눔 독소에서 실제 독성 활성을 띠는 경쇄(Light chain, LC)를 이동시키는 역할을 한다.

[0008] 마지막으로 경쇄(Light Chain, LC)는 활성화 부위에 존재하는 아연(Zinc, Zn^{2+})을 매개로 하여 synaptic vesicle 단백질을 가수분해하는 역할을 한다. 보툴리눔 독소 A형의 경우에는 SNAP-25(synaptosomal-associated protein of 25 kDa) 단백질을 분해하여 아세틸콜린의 분비를 방해하고 이로 인해 근수축을 차단함으로써 마비증상을 나타낸다.

[0009] 독소이드 방식으로 처음 시도된 보툴리눔 백신은 보툴리눔 독소 A형과 B형에 대한 것으로 1946년 미국 국방부(Department of Defense, DoD)에 의해 개발되었으며 이는 충분한 중화항체가를 나타내기는 하였으나 박테리아 단백질 등 불순물을 많이 포함하고 있어 이를 해결하기 위해 정제과정에서 독소를 침전시킬 때 염화칼슘($CaCl_2$)과 에탄올(EtOH)을 사용한 침전법을 이용하여 순도를 높이는 방법으로 제작하였다.

[0010] 이를 토대로 보툴리눔 C형, D형, E형 역시 동일한 방식으로 제작하였고 그렇게 만들어진 것이 Pentavalent Botulinum Toxoid(PBT)이다. PBT는 미시간 공중보건부(Michigan Department of Public Health, MDPH)에 의해 처음 개발된 것으로 1971년에 처음 생산되었으며 미국 질병관리본부(CDC)에 의해 IND 161(고위험 직업군)과 IND 3723(군인) 허가를 받아 오늘날까지 생산해오고 있다.

[0011] 보툴리눔 독소에 대한 독소이드 백신은 제작이 간편하고 빠른 시간 안에 생산할 수 있는 장점을 가지고는 있으나 생산량이 매우 적어 많은 양의 배양이 요구되며 많은 양을 생산하더라도 매우 위험하기 때문에 다루는데 어려움이 많다. 그리고 독소 외에 다른 단백질 등에 의해 백신으로 사용되기 위한 충분한 항체가가 나오기 어려울 수 있으며 비활성화 하더라도 약간의 독성이 남아있을 경우 심각한 부작용을 나타낼 수 있기 때문에 광범위한 사용을 위한 제한점이 많다. 이러한 문제점들 때문에 오늘날에는 독소의 일부 서열만 포함하거나 혹은 독성활성을 아미노산 변이 등을 통해 완전히 제거하는 재조합 방식을 응용한 백신 제조 및 개발이 진행되고 있다.

[0012] 보툴리눔 독소 A형 재조합 백신으로 rBV A/B(Recombinant Botulinum Toxin A/B Vaccine) 백신은 독성활성은 갖지 않으나 중화항체 생산이 용이한 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인만을 유전자 재조합을 통해 발현시켜 정제하여 사용한 것이다. 이 백신은 에어로졸에 의한 노출 시 방어를 목적으로 개발된 것으로 처음에는 미육군 전염병의학연구소(US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, USAMRIID)에서 연구를 시작하였으며 현재는 CSC's Dynport Vaccine Company와 MCS-JVAD에 의해 임상3상(NCT01940315)까지 완료되었고 2021년 FDA 승인을 목표로 개발 중에 있다.

[0013] 또 다른 보툴리눔 독소 A형 백신으로 BoNT/A HC50 백신은 중쇄 C말단(Heavy chain C-terminal)부위에 존재하는 ganglioside 부착 모티프(ganglioside binding motif)에 변이를 준 백신으로 세포내로 유입되는 것을 차단하여

만든 것이다. 이 백신은 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Hc)에 해당하는 865번 내지1296번 아미노산을 재조합하고 이 중 세포 유입에 관여하는 아미노산인 트립토판 1266번을 루신으로 타이로신 1267번을 세린으로 치환하여 세포 내 유입 활성을 억제하였다. 이 외에 경쇄(Light Chain, LC)를 재조합한 백신 연구도 시도되었으며, 이는 보툴리눔 독소 A형의 경쇄(Light Chain, LC) 부분 중 독성활성을 갖는 부위에 존재하는 아미노산 224과 262번 글루타민을 각각 알라닌으로 치환하여 스네어(SNARE) 단백질과의 결합 활성을 억제하여 독성을 제거한 백신이다.

[0014] 이와 같이 다양한 방식으로 보툴리눔 독소 A형 백신 개발을 위한 시도가 진행되고 있으나 현재까지 개발 및 허가가 완료된 백신은 없으며 특히 우리나라의 경우에는 보툴리눔 독소 백신 개발에 대한 시도가 미미하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0015] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0594787호 (2006.06.22)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 이에 상기와 같은 점을 감안한 본 발명은 컴퓨터 시뮬레이션을 기반으로 하여 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 삼차원구조를 주형으로 다양한 아미노산 변이를 시도함으로써 보툴리눔의 독성 제거, 단백질 안정화, 중화항체 결합부위 유지 등을 갖는 새로운 형태의 보툴리눔 독소 A형 백신의 제공에 목적이 있다.

[0017] 또한, 상기와 같은 점을 감안한 본 발명의 목적은 보툴리눔 독소 A형에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 백신을 제조할 수 있는 원핵세포 발현백터를 제조하고, 상기 발현백터에 의해 형질전환체로부터 보툴리눔 백신을 생산하는 것으로 보툴리눔 독소 A형 백신 제조방법의 제공에 목적이 있다.

[0018] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 제조된 보툴리눔 독소 A형 백신을 통해 보툴리눔 독소 A형에 의해 유발되는 질환 예방 및 치료용 조성물의 제공에 목적에 있다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명의 보툴리눔 독소 A형 백신은 서열번호 5 내지 서열번호 7 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인을 포함하여 독성이 제거된 보툴리눔 독소 A형을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 이와 같은 상기 보툴리눔 독소 A형 백신은 서열번호 1의 아미노산 서열 중 N-말단으로부터 1269번째 아미노산이 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환되어 서열번호 2로 기재된 아미노산 서열, 또는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 N-말단으로부터 1117번째, 1253번째 및 1266번째 아미노산이 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환되어 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열, 또는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 N-말단으로부터 1203번째, 1253번째 및 1266번째 아미노산이 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환되어 서열번호 4로 기재된 아미노산 서열을 갖는 독성이 제거된 보툴리눔 독소 A형을 포함한다.

[0021] 구체적으로 상기 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 독성이 제거된 보툴리눔 독소 A형은 서열번호 5로 기재된 아미노산 서열로 표시된 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인을 갖고, 상기 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 독성이 제거된 보툴리눔 독소 A형은 서열번호 6로 기재된 아미노산 서열로 표시된 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인을 가지며, 상기 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 독성이 제거된 보툴리눔 독소 A형은 서열번호 7로 기재된 아미노산 서열로 표시된 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인을 가질 수 있다.

[0022] 아울러 본 발명의 보툴리눔 독소 A형 유전자는 상기 서열번호 5 내지 서열번호 7로 기재된 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인을 코딩하는 핵산서열을 가질 수 있다.

[0023] 보툴리눔 독소 A형 유전자는 예를 들면, 서열번호 5로 기재된 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-

terminal, Hc) 도메인을 코팅하는 서열번호 8로 기재된 핵산 서열을 가질 수 있고, 서열번호 6으로 기재된 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc)을 코팅하는 서열번호 9로 기재된 핵산 서열을 가질 수 있다. 그리고 서열번호 7로 기재된 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc)을 코팅하는 서열번호 10으로 기재된 핵산 서열을 가질 수 있다.

[0024] 또한, 상기와 같은 목적으로 보툴리눔 백신을 제조하기 위해 상기 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc)을 코딩하는 서열번호 8 내지 서열번호 10 중 어느 하나의 핵산 서열을 가지는 보툴리눔 A형 독소의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 유전자를 포함하는 발현백터를 재조합하여 준비한다.

[0025] 본 발명의 보툴리눔 백신의 제조방법은 상기 발현백터로 형질전환된 원핵세포 형질전환체를 배양하는 단계, 및 상기 형질전환체로부터 발현된 목적 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 원핵세포는 대장균인 것이 바람직하다.

[0026] 또한, 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 보툴리눔 독소 A형에 의해 유발되는 질환 예방 및 치료용 조성물은 서열번호 5 내지 서열번호 7 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인을 포함하여 이루어진 보툴리눔 독소 A형 백신을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0027] 상기 보툴리눔 독소 A형 백신은 보툴리눔 독소 A형의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 1269번째 아미노산, 또는 1117번째, 1253번째 및 1266번째 아미노산, 또는 1203번째, 1253번째 및 1266번째 아미노산은 알라닌(Alanine, Ala)을 포함하고, 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인이 서열번호 5 내지 서열번호 7 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진다.

[0028] 이때, 상기 보툴리눔 독소 A형 백신은 상기 설명된 보툴리눔 독소 A형 백신의 제조방법과 동일한 방법으로 제조한 것이다.

[0029] 이러한 본 발명의 보툴리눔 독소 A형에 의해 유발되는 질환 예방 및 치료용 조성물은 콜레라톡신, 알루미늄 하이드록사이드, 카보폴(carbopol), 광물성 오일 및 생분해성(biodegradable) 오일 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 면역증강제를 추가로 포함할 수 있다.

[0030] 또한, 본 명세서에서 사용된 '치료'라는 용어는 보툴리눔 독소의 중독에 의해 유발된 질환의 억제 및 보툴리눔 독소 중독에 의해 유발된 질환의 병적 상태를 경감하는 모든 행위를 의미한다.

[0031] 본 발명의 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 및 또는 부형제를 이용하여 제제화됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0032] 상기 조성물이 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제화 시 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토소, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것이 아니다.

[0033] 여기서, 상기 '약학적으로 허용되는 담체'란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미한다.

[0034] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0035] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수도 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수도 있다.

발명의 효과

[0036] 본 발명에 따라 제작된 백신은 효과적으로 보툴리눔 독소 중에서 특히, 보툴리눔 독소 A형에 대한 중독을 억제할 뿐만 아니라 백신의 발현, 수용액에서의 용해성을 안정적으로 유지하는데 효과적으로써 보툴리눔 독소 A형에

의한 질병의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0037] 도 1 내지 도 3은 각각 본 발명의 실시예에 따른 제1 보툴리눔 독소 A형 백신 내지 제3 보툴리눔 독소 A형 백신의 유전자 및 이에 상응하는 단백질 서열을 나타낸 모식도이다.
- 도 4는 본 발명에 실시예에 따른 보툴리눔 독소 A형 백신 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc)의 세포결합부위를 삼차원 구조 가상 시뮬레이션을 통해 모델링한 결과이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 제1 보툴리눔 독소 A형 백신과 제2 보툴리눔 독소 A형 백신의 발현 벡터를 나타낸 모식도이다.
- 도 6은 본 발명에 따른 제3 보툴리눔 독소 A형 백신의 발현 벡터를 나타낸 모식도이다.
- 도 7a 내지 도 7c는 본 발명의 실시예에 따른 크기 배제 크로마토그래피의 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- 도 8a 내지 도 8c는 본 발명의 실시예에 따른 크기 배제 크로마토그래피로 정제한 보툴리눔 독소 A형 백신을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.
- 도 9는 크기 배제 크로마토그래피 방법을 통해 최종정제를 마친 보툴리눔 독소 A형 백신을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.
- 도 10 내지 도 12는 본 발명의 생체 내 실험(*in vivo*)을 통해 그룹별로 보툴리눔 독소 A형을 20LD₅₀의 양으로 투여한 뒤 생존을 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 본 명세서에서 사용되는 기술적 용어는 본 발명에서 특별히 다른 의미로 정의되지 않는 한, 본 발명의 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 의미로 해석되어야 하며, 과도하게 포괄적인 의미로 해석되거나, 과도하게 축소된 의미로 해석되지 않아야 한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 일반적인 용어는 사전에 정의되어 있는 바에 따라, 또는 전후 문맥상에 따라 해석되어야 한다.
- [0039] 또한, 본 명세서에서 사용되는 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 즉, 본 명세서에서, '구성된다', '이루어진다' 또는 '포함한다' 등의 용어는 명세서상에 기재된 여러 구성 요소들, 또는 여러 단계 들을 반드시 모두 포함하는 것으로 해석되지 않아야 하며, 그 중 일부 구성 요소들 또는 일부 단계들은 포함되지 않을 수도 있고, 또는 추가적인 구성 요소 또는 단계들을 더 포함할 수 있는 것으로 해석되어야 한다.
- [0040] 본 발명은 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc)에 대한 단백질 구조를 이용해 삼차원 구조 모델링 프로그램으로 세포 결합 부위를 예측한 후, 세포 결합 부위에 해당하는 아미노산 중 알지닌(Arginine, Arg) 1269번, 타이로신(Tyrosine, Tyr) 1117번, 히스티딘(Histidine, His) 1253번, 트립토판(Tryptophan, Trp) 1266번, 글루탐산(Glutamate, Glu) 1203번을 선정하고, 이를 세 가지 형태로 조합하여 가상의 보툴리눔 백신 구조를 설계하고 이를 바탕으로 유전자를 합성하였다.
- [0041] 이렇게 합성된 유전자는 트레오닌(Threonine, Thr) 876번부터 루신(Leucine, Leu) 1296번까지 한정하여 제작하고, 또한 합성 유전자는 히스티딘 표지(His tag) 또는 글루타티온 S-전달효소(Glutathione S-transferase, GST) 표지(tag) 결합의 형태로 발현시킬 수 있는 벡터에 클로닝하여 발현시켰다. 발현된 보툴리눔 백신은 친화도 크로마토그래피와 크기 배제 크로마토그래피를 통해 순수 분리하였으며, 최종 정제 과정을 마친 보툴리눔 백신은 생체 외(*in vitro*), 생체 내(*in vivo*) 실험을 통해 중화항체 생성 및 보툴리눔 독소 A형에 대한 중화능을 갖는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0042] 이하 실시예에서 본 발명의 보툴리눔 백신과 이의 제조방법을 보다 상세하게 설명되며, 이는 본 발명의 구체적 이해에 도움을 주기위한 것이며 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 실시예 1은 보툴리눔 백신의 설계에 관한 것으로, 본 발명의 보툴리눔 백신을 설계하기 위해서 보툴리눔 독소 A형에 대한 아미노산 및 유전자 서열을 현재까지 문헌상으로 알려져 있는 중화항체 결합부위를 분석하고, 이를 이용하여 보툴리눔 독소 A형 단백질의 3차원 구조를 가지고 이 중화항체 결합부위가 구조적 영향을 미치지 않는 지 재확인하여 백신을 설계한다.

- [0044] 구체적으로 실시예 1은 보툴리눔 독소 A형에 대한 단백질 서열(P10845)을 ExPASy Bioinformatics Resource Portal 웹사이트(<http://expasy.org/>)를 이용하여 유전자 및 단백질 서열을 분석하고, 분석한 서열을 이용하여 단백질 데이터 은행인 RCSB PDB(Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb>)에서 수록된 데이터베이스로부터 보툴리눔 독소 A형의 삼차원 구조파일인 PDB code로 3BTA를 제공받아 구조 분석을 실시한다. 이때, 단백질의 삼차원 구조 정보는 RCSB PDB 뿐만 아니라 공지의 다양한 데이터베이스를 통하여 제공받을 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.
- [0045] 이후, 공지의 3차원 구조 데이터베이스로부터 제공받은 보툴리눔 독소 A형의 3차원 구조 정보는 3차원 분자 시각화 프로그램인 Discovery Studio 4.5 단백질 모델링 프로그램을 이용하여 분석하며, 이를 통해 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인에서 세포 결합 부위에 해당하는 아미노산을 정의하고, 정의된 아미노산을 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환하여 보툴리눔 백신을 설계한다.
- [0046] 여기서, 상기 세포 결합 부위는 앞서 배경기술에서 설명한 바와 같이 보툴리눔 독소 A형의 단백질 구조는 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc), 중쇄 N말단(Heavy Chain N-terminal, Hn), 경쇄(Light Chain, LC) 세 가지의 도메인으로 나뉘며, 이 중에서 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인은 보툴리눔 독소가 신경 세포 내로 들어가도록 하여 독성을 일으키는 역할을 한다.
- [0047] 바람직하게 상기 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인은 보툴리눔 독소 A형의 아미노산 서열로 서열번호 1의 아미노산 서열 중 N-말단으로부터 876번 트레오닌(Threonine, Thr)부터 1296번 루신(Leusine, Leu)까지의 아미노산 서열로 표시되는 것이다.
- [0048] 본 발명에서는 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인에서 아미노산 치환 및 단백질 발현 서열 부위에 대해 현재까지 문헌상으로 알려져 있는 중화항체 결합부위를 확인하여 결정하였다. 따라서 상기 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인에서 세포 결합 부위에 해당하는 아미노산인 독성활성부위를 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환하여 독성 활성을 제거한 보툴리눔 독소 A형 백신을 설계한다.
- [0049] 도 1 내지 도 3은 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인에서 독성활성부위에 해당하는 아미노산을 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환하여 설계된 보툴리눔 독소 A형 백신에 대한 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단의 아미노산 서열과 해당 아미노산 서열에 따라 정의된 유전자 서열을 나타낸 것이다.
- [0050] 일 구체예로서 서열번호 1의 아미노산 서열 중 N-말단으로부터 1269번째 알지닌(Arginine, Arg)이 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환하여 서열번호 2로 기재된 독성이 제거된 보툴리눔 독소 A형으로서, 도 1에 도시된 바와 같이 중쇄 C말단의 아미노산 서열과 아미노산을 설정하여 보툴리눔 독소 A형 백신을 설계하고, 이를 본 발명에서 '제1 보툴리눔 독소 A형 백신' 또는 '보툴리눔 독소 A형 백신 #1'이라 명칭한다.
- [0051] 다른 구체예로서 도 2는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 N-말단으로부터 1117번째 타이로신(Tyrosine, Tyr), 1253번째 히스티딘(Histidine, His) 및 1266번째 트립토판(Tryptophan, Trp)을 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환하여 서열번호 3로 기재된 독성이 제거된 보툴리눔 독소 A형으로서, 도 2에 도시된 바와 같이 중쇄 C말단의 아미노산 서열과 아미노산을 설정하여 보툴리눔 독소 A형 백신을 설계하고, 이를 본 발명에서 '제2 보툴리눔 독소 A형 백신' 또는 '보툴리눔 독소 A형 백신 #2'이라 명칭한다.
- [0052] 또 다른 구체예로 서열번호 1의 아미노산 서열 중 N-말단으로부터 1203번째 글루탐산(Glutamate, Glu), 1253번째 히스티딘(Histidine, His) 및 1266번째 트립토판(Tryptophan, Trp)을 알라닌(Alanine, Ala)으로 치환하여 서열번호 4로 기재된 독성이 제거된 보툴리눔 독소 A형으로서, 도 3에 도시된 바와 같이 중쇄 C말단의 아미노산 서열과 아미노산을 설정하여 보툴리눔 독소 A형 백신을 설계하고, 이를 '제3 보툴리눔 독소 A형 백신' 또는 '보툴리눔 독소 A형 백신 #3'이라 명칭하였다.
- [0053] 도 4는 상기 실시예 1에 따라 설계된 보툴리눔 독소 A형 백신이 보툴리눔 독소 A형 단백질과 유사성과 설계된 보툴리눔 독소 A형 백신의 구조형성의 안정성을 확인하기 위해 설계된 보툴리눔 독소 A형 백신의 중쇄 C말단 도메인에서의 세포결합부위를 삼차원 구조 가상 시뮬레이션을 통해 모델링하여 확인하였다.
- [0054] 실시예 2는 보툴리눔 독소 A형 백신 발현 균주의 제조에 관한 것으로, 상기 실시예 1에서 설계된 제1 보툴리눔 독소 A형 백신과 제2 보툴리눔 독소 A형 백신의 경우는 독성활성이 제거된 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인에 대한 유전자(서열번호 7, 8)를 pET28a 발현벡터에 제한효소 NdeI 및 NotI를 사용하여 삽입한 뒤 대장균(E.coli) BL21 균주에 클로닝하여, 최종적으로 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말

단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인 유전자가 클로닝된 재조합 벡터로써 보툴리눔 독소 A형 백신의 발현백터를 포함하는 보툴리눔 독소 A형 백신 발현 균주를 제작한다. 이처럼 제1 보툴리눔 독소 A형 백신과 제2 보툴리눔 독소 A형 백신이 삽입된 발현백터는 도 5에 도시된 바와 같다.

[0055] 또 다른 보툴리눔 독소 A형 백신 발현 균주의 제조 방법으로 상기 실시예 1를 통해 설계된 제3 보툴리눔 독소 A형 백신의 경우는 독성활성이 제거된 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인에 대한 유전자(서열번호 9)를 pGEX4T3 발현벡터에 제한효소 BamHI 및 NotI를 사용하여 삽입한 뒤 대장균(E.coli) BL21 균주에 클로닝하여, 최종적으로 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 도메인 유전자가 클로닝된 재조합 벡터로써 제3 보툴리눔 독소 A형 백신의 발현백터를 포함하는 보툴리눔 독소 A형 백신 발현 균주를 제작한다. 이렇게 제 3 보툴리눔 독소 A형 백신이 삽입된 발현백터는 도 6에 나타난 바와 같다.

[0056] 그리고 제1 보툴리눔 독소 A형 백신 내지 제3 보툴리눔 독소 A형 백신의 발현백터를 포함하는 백신 발현 균주만 선별하기 위해, 선별 항생제로 카나마이신(Kanamycin)이 포함된 LB배지(1% 트립톤, 0.5% 효모추출물, 1% 염화나트륨)에 상기 백신 발현 균주를 접종한 다음 37℃에서 배양하여 카나마이신에 저항성을 가지는 최종 균주를 선별함으로써 보툴리눔 독소 A형 백신 발현 균주를 제조한다.

[0057] 실시예 3은 상기 실시예 2를 통해 제조된 보툴리눔 백신 발현 균주로부터 보툴리눔 백신을 발현하고 정제하는 방법에 관한 것으로, 발현백터의 따라 보툴리눔 독소 A형 백신의 발현과 정제를 수행한다.

[0058] 제1 보툴리눔 독소 A형 백신 및 제2 보툴리눔 독소 A형 백신의 경우는 상기 클로닝된 대장균 균주를 선별 항생제로 카나마이신(Kanamycin)이 포함된 LB배지(1% 트립톤, 0.5% 효모추출물, 1% 염화나트륨)에 접종한 다음 37℃에서 한밤동안 진탕 배양하여, 배양한 배양액의 OD₆₀₀(600 nm에서의 흡광도)값이 0.5 내지 0.6 사이이면, 유도 발현물질인 이소프로필 1-티오-β-D-갈락토시드(isopropyl 1-thio-β-D-galactoside, IPTG)를 최종 1mM 농도로 넣고 다시 3시간 동안 추가 배양하여 본 발명의 보툴리눔 백신의 발현을 유도한다. 그 다음 배양액으로부터 대장균 균주는 15000 rpm의 속도로 4℃ 온도에서 10분 동안 원심분리를 통하여 수확하였으며, 펠렛(pellet)형태로 수확한 대장균 균주에서 단백질을 정제하기 위해 20 mM Tris-HCl(pH8.0), 200mM NaCl 완충용액에 부유시킨 후, 초음파 파쇄(sonication)방법으로 초음파 파쇄기를 이용하여 균체를 파쇄하고 다시 원심분리하여 상등액만 얻는다.

[0059] 이렇게 얻은 상등액은 친화도 크로마토그래피(Affinity chromatography)방법으로 미리 평형화시킨 금속 친화성(immobilized metal affinity) 컬럼인 니켈-NTA(Ni-NTA)컬럼에 첨가하여 컬럼 레진에 히스티딘(histidine)이 붙여진 과다 발현된 보툴리눔 독소 A형 백신을 결합시킨 후 트롬빈(Thrombin)을 처리하여 보툴리눔 백신을 1차 정제한다.

[0060] 그 다음, 상기 1차 정제한 리신 백신에 대해 2차 정제 방법으로 크기배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 이용 통해 정제한다. 본 발명에서 크기 배제 크로마토그래피는 120ml 부피의 HiLoad 16/60 superdex 200 column(GE healthcare 사)를 사용하여 크기 배제 크로마토그래피를 pH7.4의 20mM 인산완충용액(phosphate buffer saline, PBS)를 완충용액 조건에서 수행하여 보툴리눔 백신을 최종 정제한다.

[0061] 제3 보툴리눔 독소 A형 백신경우에는 상기 클로닝된 대장균 균주를 선별 항생제로 카나마이신(Kanamycin)이 포함된 LB배지(1% 트립톤, 0.5% 효모추출물, 1% 염화나트륨)에 접종한 다음 37℃에서 한밤동안 진탕 배양하여, 배양한 배양액의 OD₆₀₀(600 nm에서의 흡광도)값이 0.4 내지 0.5 사이이면, 유도 발현물질인 이소프로필 1-티오-β-D-갈락토시드(isopropyl 1-thio-β-D-galactoside, IPTG)를 최종 0.5mM 농도로 넣고 다시 20℃ 온도에서 12시간 동안 추가 배양하여 본 발명의 보툴리눔 백신의 발현을 유도한다. 그 다음 배양액으로부터 대장균 균주는 15000 rpm의 속도로 4℃ 온도에서 10분 동안 원심분리를 통하여 수확하였으며, 펠렛(pellet)형태로 수확한 대장균 균주에서 단백질을 정제하기 위해 20 mM Tris-HCl(pH8.0), 200mM NaCl 완충용액에 부유시킨 후, 초음파 파쇄(sonication)방법으로 초음파 파쇄기를 이용하여 균체를 파쇄하고 다시 원심분리하여 상등액만 얻는다.

[0062] 이렇게 얻은 상등액은 GST 친화 크로마토그래피(Affinity chromatography)방법으로 미리 평형화시킨 GST 컬럼(Glutathione S-transferase binding resin column)을 사용하여 GST(Glutathione S-transferase) 태그가 붙여진 제3 보툴리눔 독소 A형 백신을 결합시킨 후 트롬빈(Thrombin)을 처리하여 보툴리눔 백신을 1차 정제한다.

[0063] 그 다음, 상기 1차 정제한 리신 백신에 대해 2차 정제 방법으로 크기배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 이용 통해 정제한다. 본 발명에서 크기 배제 크로마토그래피는 120ml 부피의 HiLoad 16/60 superdex 200 column(GE healthcare 사)를 사용하여 크기 배제 크로마토그래피를 pH7.4의 20mM 인산완충용액

(PBS)를 완충용액 조건에서 선택적 분리 및 정제를 하였다.

[0064] 그리고 앞서 설명한 바와 같이 최종 정제를 마친 단백질을 Agilent사의 Bio-analyzer 장비를 이용해 분자량, 순도 및 농도를 분석하였다. 이때 분석 키트(kit)로는 agilent protein 230 reagent와 chip를 사용하여 분석을 수행하였다.

[0065] 도 7a 내지 도 7c는 크기 배제 크로마토그래피의 크로마토그램을 나타낸 것으로 도 7a에 도시된 바와 같이 완충용액으로부터 용출시켜 나온 제1 보툴리눔 독소 A형 백신과 제2 보툴리눔 독소 A형 백신 단백질의 피크(peak)가 분획번호 E1 내지 E9 사이에서 확인되고, 제3 보툴리눔 독소 A형 백신 단백질의 피크는 분획번호 E2 내지 E10 사이에서 존재함을 확인할 수 있었다.

[0066] 그리고 도 8a 내지 도 8c는 크기 배제 크로마토그래피를 진행한 후 피크에서 확인된 보툴리눔 백신 A형의 분획물을 정성 및 정량적으로 확인하기 위해 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 분석을 실시한 것으로, 각 레인(lane)에 나타난 숫자는 상기 도 7a 내지 도 7c에서 분획된 분획물(fraction)에 해당하는 시료를 나타내며, 약 49kDa의 위치의 보툴리눔 독소 A형은 대부분이 컬럼에 결합하여 용출되어 나온 피크의 분획에 존재하는 것을 확인하였다.

[0067] 도 9는 최종 정제를 마친 제1 보툴리눔 독소 A형 백신, 제2 보툴리눔 독소 A형 백신 내지 제3 보툴리눔 독소 A형 백신을 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타내며, 세 가지 보툴리눔 독소 A형 백신의 분자량은 약 49kDa 위치에서 단백질 밴드를 확인할 수 있었고, 순도는 제1 보툴리눔 독소 A형 백신과 제2 보툴리눔 독소 A형 백신의 경우에는 약 99%, 제3 보툴리눔 독소 A형 백신의 경우에는 85% 정도 순도를 갖는 것을 확인하였다.

[0068] 앞서 설명한 바와 같이 본 발명의 일 실시예에 따라 분리된 보툴리눔 독소 A형 백신에 대한 생체내실험(*in vivo*)을 수행하여 보툴리눔 독소 A형 백신의 효능 평가를 하였다. 생체내실험(*in vivo*)에서 사용한 ICR 마우스는 실험군당 5마리로 그룹을 나누었다. 보툴리눔 독소 A형 백신 투여군은 앞서 실시예에서 제조된 제1 보툴리눔 독소 A형 백신 내지 제3 보툴리눔 독소 A형 백신 투여군으로 나눈 뒤, 각각의 보툴리눔 독소 A형 백신을 0, 2, 4 주에 10 ug/마리 및 20 ug/마리의 양으로 피하투여(subcutaneous injection, 이하, 'SC'라고도 명명함) 및 근육내투여(intramuscular injection, 이하, 'IM'이라고도 명명함) 하고, 음성대조군으로 인산완충용액(phosphate buffer saline, PBS)를 동일용량으로 피하투여 하였다. 백신 투여 5주째에 보툴리눔 독소 A형을 각각 20LD₅₀의 용량으로 복강투여(intraperitoneal injection)하였다. 이때 상기 보툴리눔 독소 A형 20LD₅₀의 투여량은 2.5 ng/마리의 농도로 하여 투여하였다.

[0069] 도 10 내지 도 12는 본 발명의 생체내실험(*in vivo*)을 통해 그룹별 각각 보툴리눔 독소 A형을 20LD₅₀의 양으로 투여한 뒤 생존율을 나타낸 것이다. 도 10 내지 도 12에 도시된 바와 같이 보툴리눔 독소 A형 투여 후 인산완충식염수를 투여한 음성 대조군은 전수 폐사하였고, 이와 달리 본 발명의 제1 보툴리눔 독소 A형 백신 내지 제3 보툴리눔 독소 A형 백신을 10 ug/마리 피하투여한 군에서 전수 생존하였으며, 20 ug/마리 피하투여한 군에서 100% 생존율을 보였으며, 10 ug/마리 근육내투여한 군과, 20 ug/마리 근육내 투여한 군에서도 100%의 생존율을 보였다.

[0070] 본 발명의 보툴리눔 독소 A형 백신에 대한 항체역가를 측정하고자 보툴리눔 독소 A형 백신 투여 3주와 5주째에는 안와채혈을 통하여 각 그룹의 혈액을 채취하여, 채취된 혈액에서 보툴리눔 독소 A형 백신의 항체역가(antibody titer)를 분석하여, 그 결과를 아래 표 1 내지 표 3에 순서대로 나타내었다. 항체역가 분석은 효소결합면역흡착측정법(Enzyme Linked immunosorbent assay, ELISA)를 이용하였으며, 이때, 항체역가의 정량방법은 종점희석기법(end point dilution)을 시행하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

표 1

그룹	제1 보툴리눔 독소 A형 백신	평균 항체역가
3주	SC, 10 ug/마리	< 50
	SC, 20 ug/마리	< 50
	IM, 10 ug/마리	< 50
	IM, 20 ug/마리	< 50
5주	SC, 10 ug/마리	21
	SC, 20 ug/마리	4731
	IM, 10 ug/마리	179
	IM, 20 ug/마리	886

표 2

그룹	제2 보툴리눔 독소 A형 백신	평균 항체역가
3주	SC, 10 ug/마리	< 50
	SC, 20 ug/마리	< 50
	IM, 10 ug/마리	< 50
	IM, 20 ug/마리	< 50
5주	SC, 10 ug/마리	559
	SC, 20 ug/마리	1054
	IM, 10 ug/마리	1691
	IM, 20 ug/마리	3017

표 3

그룹	제3 보툴리눔 독소 A형 백신	평균 항체역가
3주	SC, 10 ug/마리	2049
	SC, 20 ug/마리	2851
	IM, 10 ug/마리	1741
	IM, 20 ug/마리	5065
5주	SC, 10 ug/마리	4584
	SC, 20 ug/마리	17761
	IM, 10 ug/마리	9604
	IM, 20 ug/마리	5686

[0072] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 제1 보툴리눔 독소 A형 백신의 경우 투여 3주째 항체역가는 백신 용량에 관계없이 피하 및 근육 투여에서 50이하로 낮게 측정되었다. 이는 3주째에는 항체가 형성이 미약하다는 것을 보여준다. 그리고 5주째에는 3주째보다 증가한 양상을 보였다. 특히, 백신 용량을 20 ug/마리, 피하 투여한 경우 항체역가는 급격히 증가하였고 근육 투여보다 높은 항체역가를 나타내었다.

[0075] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 제 2 보툴리눔 독소 A형 백신의 경우 3주째에는 항체 형성이 50 이하로 미약하였지만 5주째는 급격히 증가하였다. 특히, 백신 용량을 20 ug/마리, 근육 투여한 경우 항체역가는 급격히 증가하였고 피하 투여 보다 높은 항체역가를 나타내었다.

[0076] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 제 3 보툴리눔 독소 A형 백신의 경우 제1, 2형과는 다르게 3주째에서 항체역가는 1500 이상의 수치를 보였다. 이는 3주째에도 항체가 형성이 왕성하게 이루어진 것이다. 5주째에는 10 ug/마리, 피하 투여의 경우 3주째보다 약 2배 이상 증가하였고, 20 ug/마리, 피하 투여에서는 약 6배 이상 증가하여 백신과 항체역가 형성에 용량 상관성을 보였다. 10 ug/마리, 근육 투여의 경우 백신과 항체가 형성이 용량 상관성을 보였지만, 20 ug/마리, 근육 투여의 경우에는 3주와 5주의 항체역가는 유사한 수치를 나타내었다.

[0077] 전술된 바와 같이, 본 발명의 실시예에 따라 컴퓨터 시뮬레이션을 기반으로 하여 보툴리눔 독소 A형의 중쇄 C말단(Heavy Chain C-terminal, Hc) 삼차원구조를 주형으로 다양한 아미노산 변이를 시도함으로써 제조된 보툴리눔 독소 A형 백신은 생체외실험(*in vitro*), 생체내실험(*in vivo*)을 통해 중화능을 확인한 결과, 보툴리눔의 독성 제거하고, 단백질 안정화, 중화항체 결합부위 유지 등을 가짐을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명은 새로운 형태의 보툴리눔 독소 백신으로 보툴리눔 독소 A형에 의해 유발되는 질환 예방 및 치료 조성물로 이용될 수 있음을 알 수 있다.

[0078] 앞서 살펴본 실시예는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자 당업자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있도록 하는 바람직한 실시예일 뿐, 전술한 실시예 및 첨부한 도면에 한정되는 것은 아니므로 이로 인해 본 발명의 권리범위가 한정되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능하다는 것이 당업자에게 있어 명백할 것이며, 당업자에 의해 용이하게 변경 가능한 부분도 본 발명의 권리범위에 포함됨은 자명하다.

도면

도면1

보툴리눔 독소 A형 백신 유전자 서열 #1

```
ACCAGCATTCGAATCTGCGTTATGAAAGCAACCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCCAGCAAAATCAATATTGGTAGCAAAGTGAACCTCGATC
CGATCGATAAAAAATCAGATCCAGCTGTTTAAATCTGGAAAGCAGCAAAATTGAGGTGATCCTGAAAAACGCCATTGTGTATAATAGCATGTACGAGAA
TTTCTCGACAGCTTTTGGATTCTGATCCCGAAATACTTTAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTACACCATTTATAACTGCATGGAAGCAATAGC
GGTTGGAAGTGAGCCTGAATTATGGTGAAATTATCTGGACCCGTCAGGATACCCAAAGAAATCAAAACAGCGTGTGTGTCAAAATACAGCCAGATGA
TTAACATCAGCGATTACATTAACCGCTGGATCTTTGTGACCATTACCAATAATCGTCTGAACAATAGCAAAATCTACATCAACGGTCGTCTGATTGA
CCAGAAACCGATTAGCAATCTGGGTAATATTCATGCGAGCAACAACATCATGTTTAAACTGGATGGTTGTCGTGATACCCATCGTTATATTTGGATC
AAATACTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAACGAAAAAGAAATTAAGACCTGTATGATAACAGAGCAATAGCGGCATCCTGAAAGATTTTGGG
GTGATTATCTGCAGTATGATAAACCGTATTACATGCTGAATCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTGAATAATGTGGGTATCCGTGGCTATAT
GTATCTGAAAGGTCCGCGTGGTAGCGTTATGACCACCAACATTTATCTGAATAGCAGCCTGTATCGTGGCACCATAATTCATCATCAAAAAATACGCC
AGCGGCAACAAAGATAAATATTGCGTAATAATGACCGCGTGTATTAACGTTGTGGTGAAAAACAAAGAATATCGCCTGGCAACCAATGCAAGCC
AGGCAGGCGTTGAAAAAATCTGAGCGCACTGGAATTCGGGATGTTGGTAACTTGAGCCAGGTTGTGTATGAAATCCAAAAATGATCAGGGCAT
CACCACAAATGCAAAATGAATCTGCAGGACAATAACGGCAACGATATTGGTTTTATTGGCTTCCACCGAGTTCAACAACATTGCAAAACTGGTTGCA
AGCAATTGGTATAACGCAAGATTGAACGTAGCAGCCGTACCTGGGTTGTAGCTGGGAATTTATCCGGTTGATGATGGTTGGGGTGAAACGTCGCC
TGTAAT
```

보툴리눔 독소 A형 백신 단백질 서열 #1

```
TSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVNYSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMMENNS
GWKVSINLYGEIIWTLQDTQEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPI SNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWI
KYFNLFDEKELNEKEIKDLYDNQNSGILKDFWGDYLYQDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSMVTNNIYLNSSLYRGTKFIKKYA
SGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVMKSKNDQGITNCKMNLQDNNNGNDIGFIGFHQFNIAKLVA
SNWYNAQIERSSRTLGCSEWEPVDDGWGERPL
```

①: R1269A 치환 부위

도면2

보툴리눔 독소 A형 백신 유전자 서열 #2

```
ACCAGCATTCGAATCTGCGTTATGAAAGCAACCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCCAGCAAAATCAATATTGGTAGCAAAGTGAACCTCGATC
CGATCGATAAAAAATCAGATCCAGCTGTTTAAATCTGGAAAGCAGCAAAATTGAGGTGATCCTGAAAAACGCCATTGTGTATAATAGCATGTACGAGAA
TTTCTCGACAGCTTTTGGATTCTGATCCCGAAATACTTTAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTACACCATTTATAACTGCATGGAAGCAATAGC
GGTTGGAAGTGAGCCTGAATTATGGTGAAATTATCTGGACCCGTCAGGATACCCAAAGAAATCAAAACAGCGTGTGTGTCAAAATACAGCCAGATGA
TTAACATCAACGATTACATTAACCGCTGGATCTTTGTGACCATTAACCAATAATCGTCTGAACAATAGCAAAATCTACATCAACGGTCGTCTGATTGA
CCAGAAACCGATTAGCAATCTGGGTAATATTCATGCGAGCAACAACATCATGTTTAAACTGGATGGTTGTCGTGATACCCATCGTTATATTTGGATC
AAATACTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAACGAAAAAGAAATTAAGACCTGTATGATAACAGAGCAATAGCGGCATCCTGAAAGATTTTGGG
GTGATTATCTGCAGTATGATAAACCGTATTACATGCTGAATCTGCGCATCCGAACAAATATGTGGATGTGAATAATGTGGGTATCCGTGGCTATAT
GTATCTGAAAGGTCCGCGTGGTAGCGTTATGACCACCAACATTATCTGAATAGCAGCCTGTATCGTGGCACCATAATTCATCATCAAAAAATACGCC
AGCGGCAACAAAGATAAATATTGCGTAATAATGACCGCGTGTATTAACGTTGTGGTGAAAAACAAAGAAATATCGCCTGGCAACCAATGCAAGCC
AGGCAGGCGTTGAAAAAATCTGAGCGCACTGGAATTCGGGATGTTGGTAACTCTGAGCCAGGTTGTGTATGAAATCCAAAAATGATCAGGGCAT
CACCACAAATGCAAAATGAATCTGCAGGACAATAACGGCAACGATATTGGTTTTATTGGCTTTGCGCATGTTCAACAACATTGCAAAACTGGTTGCA
AGCAATGCGTATGATGAACTAGCAGCCGTACCTGGGTTGTAGCTGGGAATTTATCCGGTTGATGATGGTTGGGGTGAAACGTCGCC
TGTAAT
```

보툴리눔 독소 A형 백신 단백질 서열 #2

```
TSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVNYSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCMMENNS
GWKVSINLYGEIIWTLQDTQEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPI SNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWI
KYFNLFDEKELNEKEIKDLYDNQNSGILKDFWGDYLYQDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSMVTNNIYLNSSLYRGTKFIKKYA
SGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVMKSKNDQGITNCKMNLQDNNNGNDIGFIGFHQFNIAKLVA
SNWYNAQIERSSRTLGCSEWEPVDDGWGERPL
```

①: Y1117A 치환 부위, ②: H1253A 치환 부위, ③: W1266A 치환 부위

도면3

보툴리눔 독소 A형 백신 유전자 서열 #3

```

ACCAGCATTCTGAATCTGCGTTATGAAAGCAACCATCTGATTGATCTGAGCCGTATGCCAGCAAAATCAATATTGGTAGCAAAGTGAACCTCGATC
CGATCGATAAAAAATCAGATCCAGCTGTTTAATCTGGAAAGCAGCAAAATTGAGGTGATCCTGAAAAACGCCATTGTGTATAATAGCATGTACGAGAA
TTTCTCGACACGCTTTGGATTCTGATCCCAGAACTTTAACAGCATTAGCCTGAACAACGAGTACACCATTTAACTGCATGGAACAACATAGC
GGTTGGAAAGTGAGCCTGAATTATGGTGAAATTTATCTGGACCTGCAGGATACCCAGAAATCAAACAGCGTGTGTGTTCAAATACAGCCAGATGA
TTAATCATCAGCGATTACATTAAACCGCTGGATCTTTGTGACCATTAACCAATAATCGTCTGAACAATAGCAAAATCTACATCAACGGTCTGTGATTGA
CCAGAAACCGATTAGCAATCTGGGTAAATATTCATGCGAGCAACAACATCATGTTTAACTGGATGGTTGTCGTGATACCCATCGTTATATTGGATC
AAATACTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAACGAAAAAGAAATTAAGACCTGTATGATAACCAGAGCAATAGCGGCATCCTGAAAGATTTTGGG
GTGATTATCTGCAGTATGATAAACCGTATTACATGCTGAATCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTGAATAATGTGGGTATCCGTGGCTATAT
GTATCTGAAAGGTCGCGTGGTAGCGTTTATGACCACCAACATTTATCTGAATAGCAGCCTGTATCGTGGCACCATAATTCATCATCAAAAAATACGCC
AGCGGCAACAAAGATAAATATTGTGCGTAATAATGACCGCGTGTATTAACGTTGTGGTGAAAAACAAGAAATATCGCCTGGCAACCAATGCAAGCC
AGGCAGCGCTT①GCAAAATCTGAGCGCATGGAATTCGGATGTTGGTAATCTGAGCCAGGTTGTTGTTATGAAATCCAAAAATGATCAGGGCAT
CACCACAAATGCAAAATGAATCTGCAGGACAAATACGGCAACGATATTGGTTTATTTGGCTTT②GCCAGTTCAACAACATTGCAAAACTGTTGCA
AGCAAT③GCCATAATCGTCAGATTGAACGTAGCAGCCGTACCTGGGTTGTAGCTGGGAATTTATCCGTTGATGATGTTGGGGTGAACGTCGCC
TG
    
```

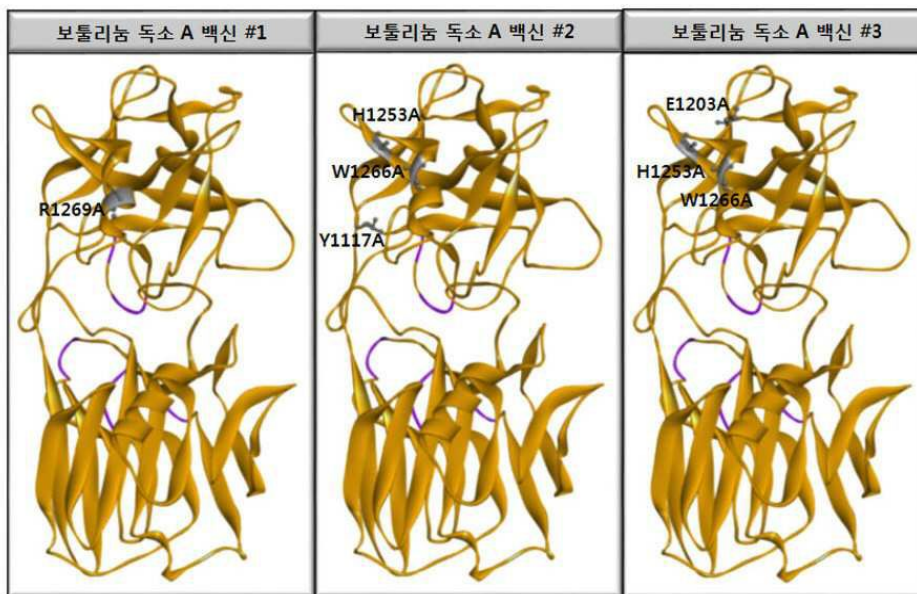
보툴리눔 독소 A형 백신 단백질 서열 #3

```

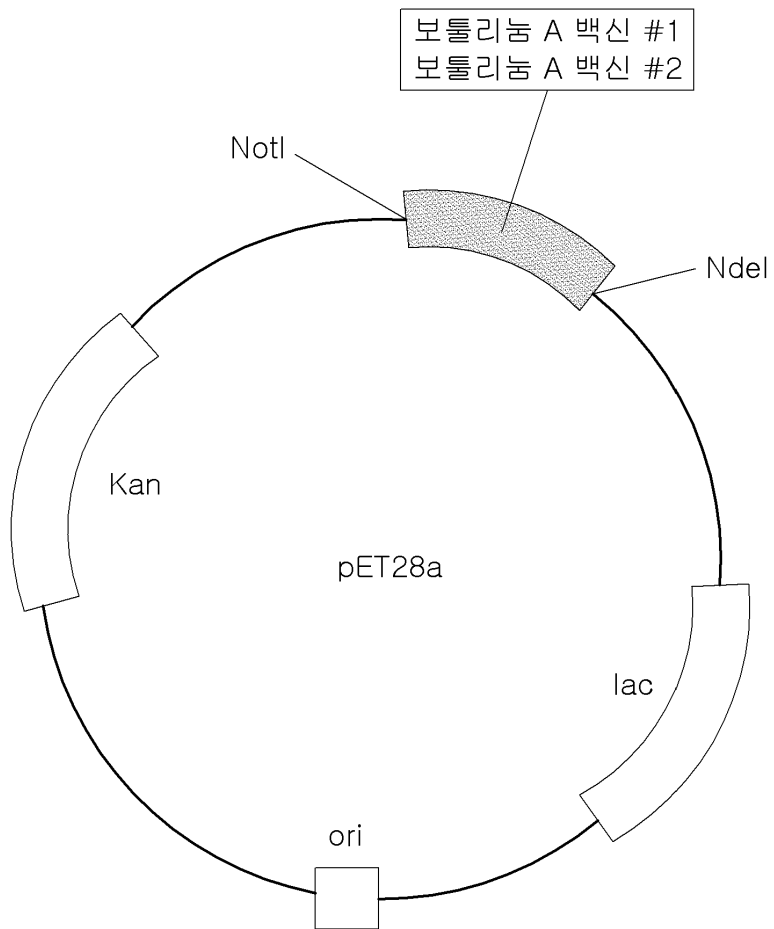
TSILNLRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCENNNS
GWKVSILNYGEIWTLDQTEIKQVVFKYSQMINISDYINRWIFVTTNNRLNNSKIYINGRLIDQKPI SNLGNHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWI
KYFNLFDKELEKEIKDLYDNQSNIGILKDFWGDYLDYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGI RGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFI IKKYA
SGNKDNIVRNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGV①AKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQG②ITNKCKMNLQDNNNGNDIGIFG③AQFNNIAKLVA
SN④AYNRQIERSSRTLGCSEWFI⑤PVDDGWGERPL
    
```

①: E1203A 치환 부위, ②: H1253A 치환 부위, ③: W1266A 치환 부위

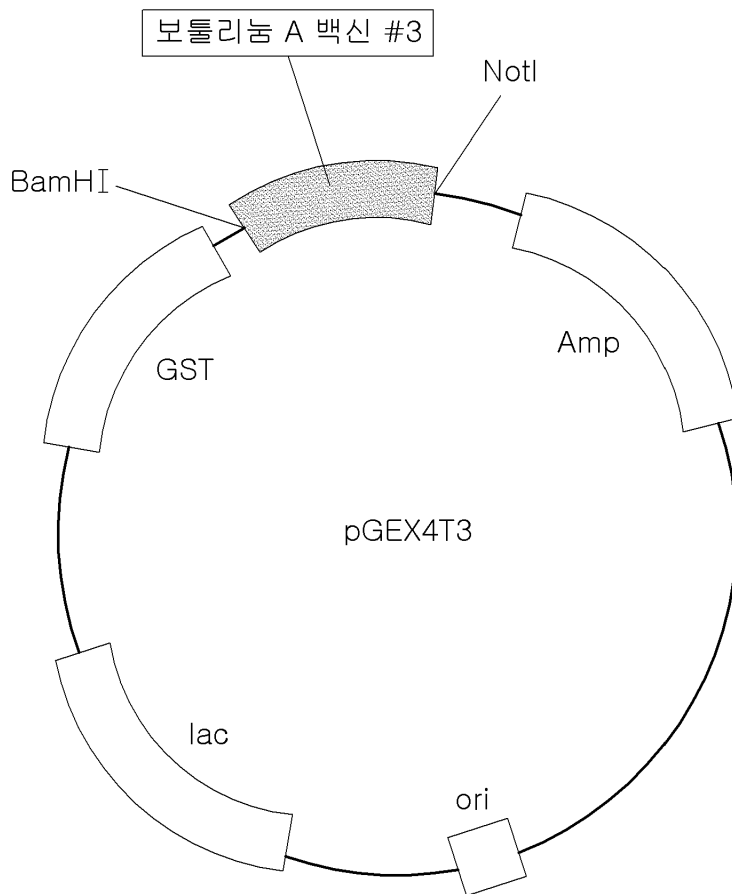
도면4



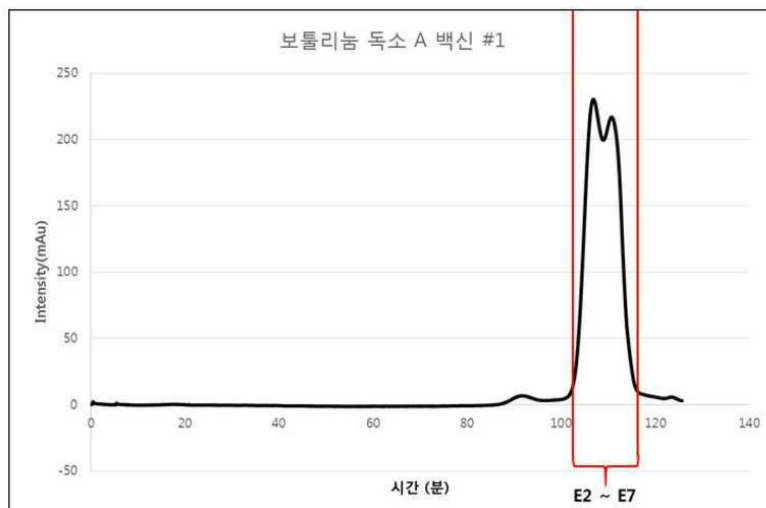
도면5



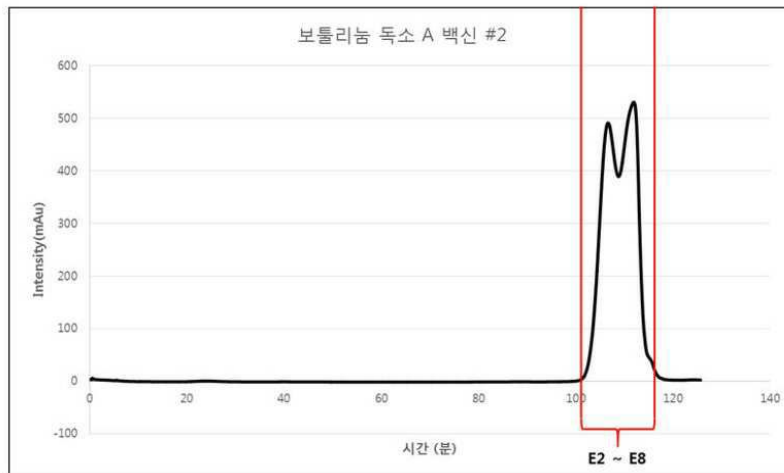
도면6



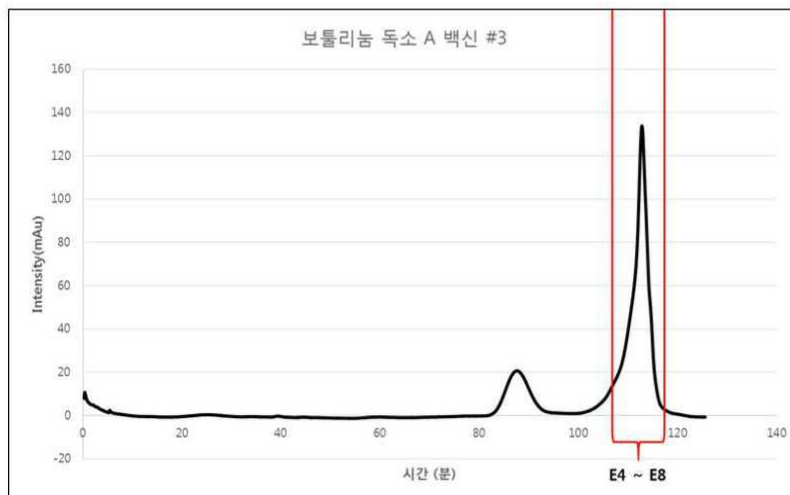
도면7a



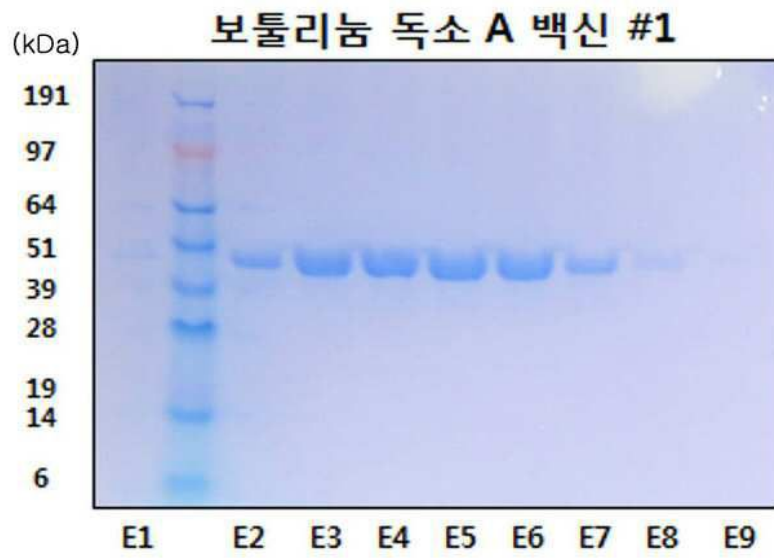
도면7b



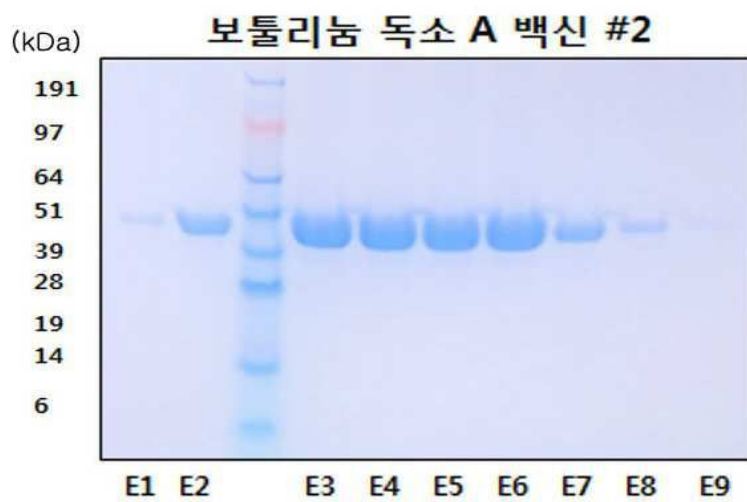
도면7c



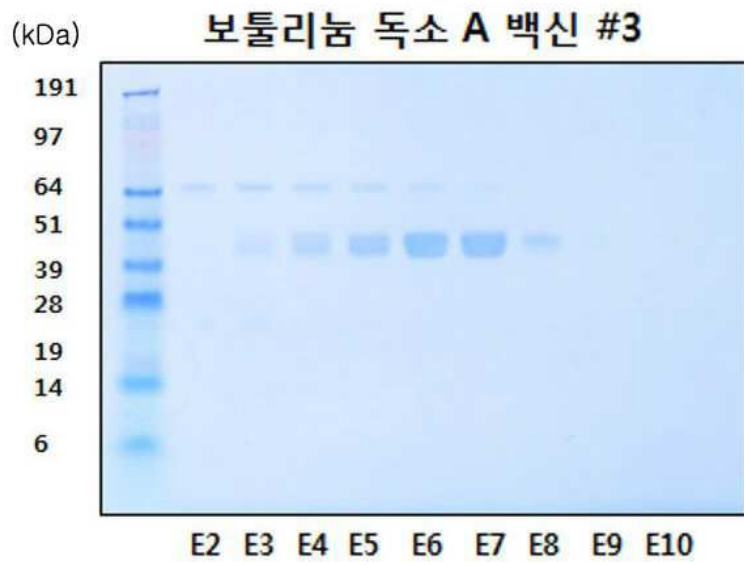
도면8a



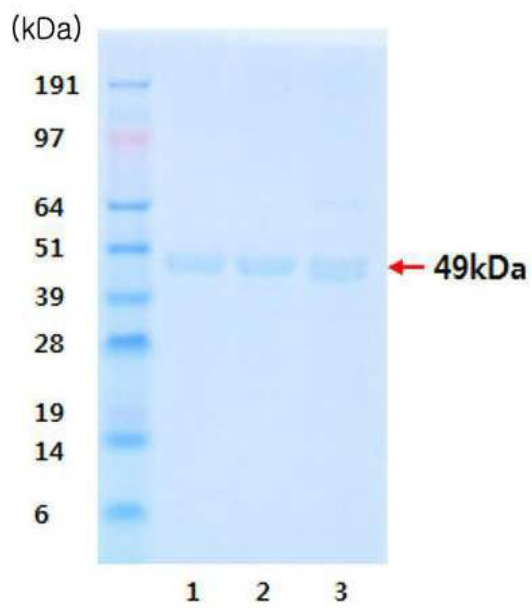
도면8b



도면8c

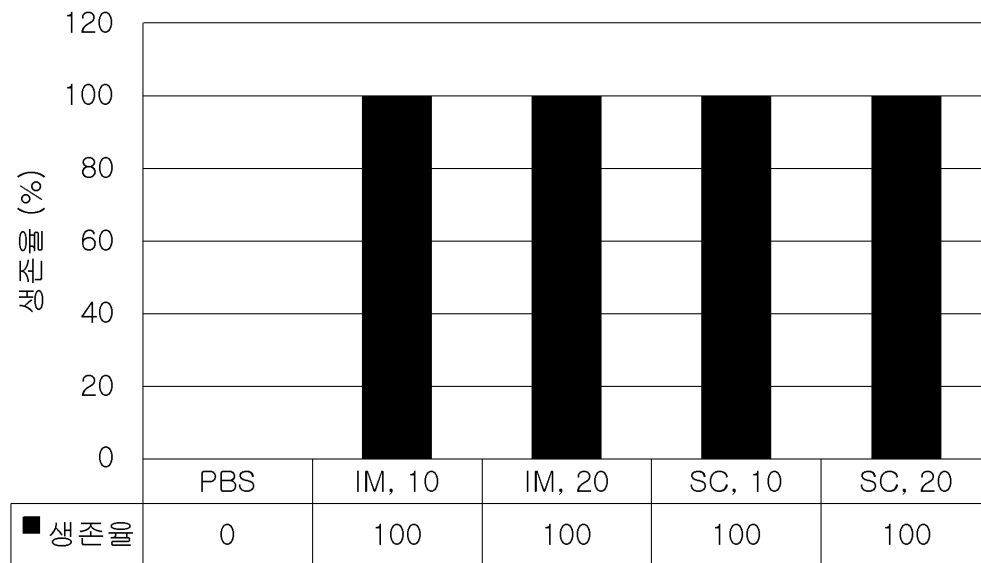


도면9

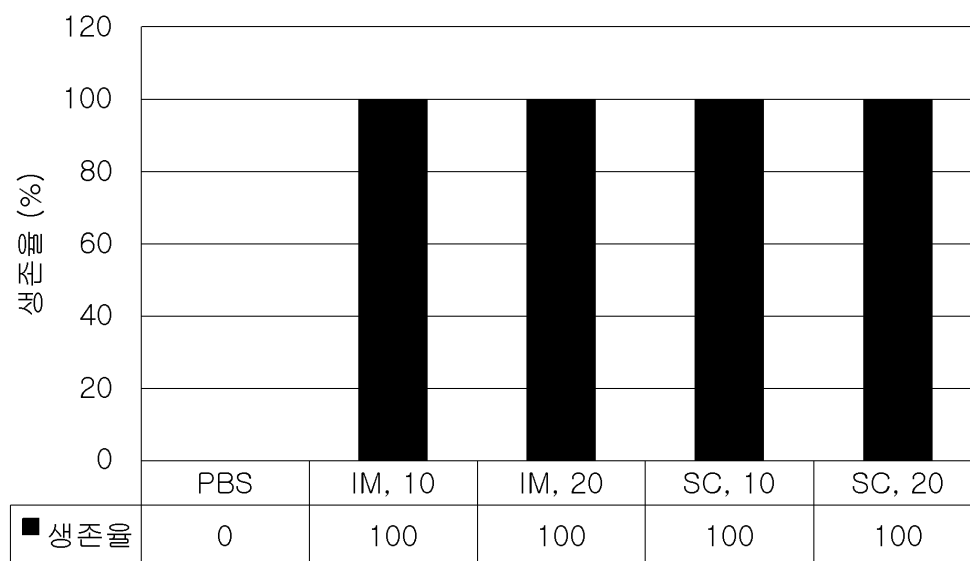


1: 보툴리눔 독소 A 백신 #1
2: 보툴리눔 독소 A 백신 #2
3: 보툴리눔 독소 A 백신 #3

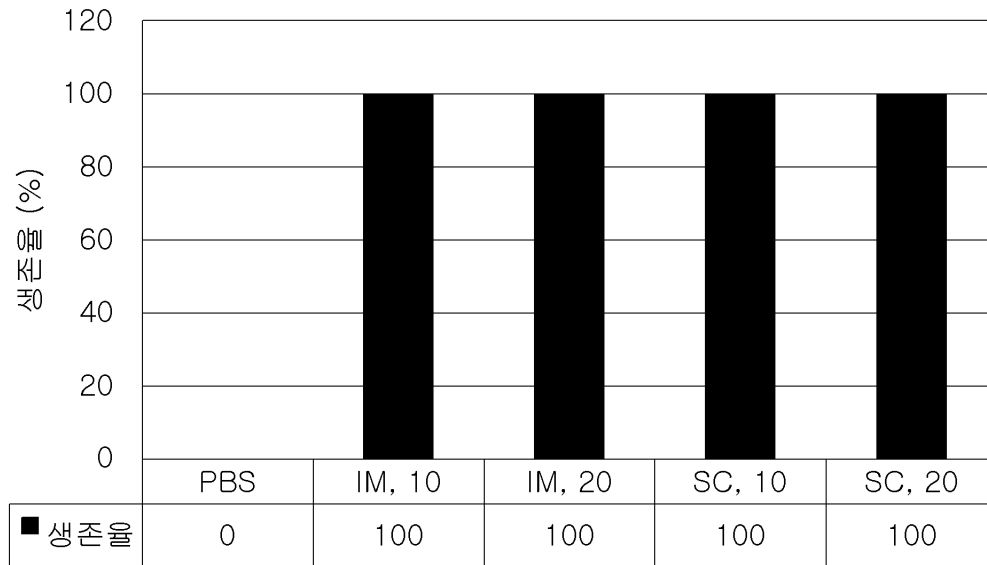
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> AGENCY FOR DEFENSE DEVELOPMENT
- <120> BOTULINUM TOXIN TYPE A VACCINE COMPRISING HEAVY CHAIN C-TERMINAL OF BOTULINUM TOXIN TYPE A MUTANT INHIBITING TOXIC ACTIVITY AND METHOD THEREOF
- <130> AD160038
- <160> 10
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1296
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Botulinum Toxin Type A
- <400> 1

Met Gln Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly

1 5 10 15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro

20 25 30

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg

35 40 45

Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu

50 55 60
 Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
 65 70 75 80
 Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu

 85 90 95
 Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
 100 105 110
 Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
 115 120 125
 Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
 130 135 140
 Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
 145 150 155 160

 Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
 165 170 175
 Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
 180 185 190
 Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
 195 200 205
 Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
 210 215 220
 Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn

 225 230 235 240
 Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
 245 250 255
 Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
 260 265 270
 Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
 275 280 285
 Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
 290 295 300

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
 305 310 315 320
 Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
 325 330 335
 Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
 340 345 350
 Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
 355 360 365
 Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
 370 375 380
 Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
 385 390 395 400
 Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
 405 410 415
 Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
 420 425 430
 Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys
 435 440 445
 Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
 450 455 460
 Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
 465 470 475 480
 Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
 485 490 495
 Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
 500 505 510
 Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
 515 520 525
 Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
 530 535 540
 Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
 545 550 555 560

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

Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
580 585 590

Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
595 600 605

Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
610 615 620

Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
625 630 635 640

Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
645 650 655

Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
660 665 670

Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
675 680 685

Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
690 695 700

Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
705 710 715 720

Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
725 730 735

Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
740 745 750

Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
755 760 765

Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
770 775 780

Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
785 790 795 800

Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys

805 810 815
 Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
 820 825 830
 Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
 835 840 845
 Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
 850 855 860
 Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
 865 870 875 880

 Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
 885 890 895
 Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn
 900 905 910
 Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu
 915 920 925
 Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser
 930 935 940
 Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn

 945 950 955 960
 Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
 965 970 975
 Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu
 980 985 990
 Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser
 995 1000 1005
 Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu
 1010 1015 1020

 Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro
 1025 1030 1035 1040
 Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys
 1045 1050 1055
 Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe

1060 1065 1070
Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr

1075 1080 1085
Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr

1090 1095 1100
Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn

1105 1110 1115 1120
Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu

1125 1130 1135
Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser

1140 1145 1150
Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly

1155 1160 1165

Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val

1170 1175 1180

Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala

1185 1190 1195 1200

Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn

1205 1210 1215

Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr

1220 1225 1230

Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly

1235 1240 1245

Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser

1250 1255 1260

Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys

1265 1270 1275 1280

Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu

1285 1290 1295

<210> 2

<211> 1296

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Botulinum Toxin Type A Vaccine #1

<400> 2

Met Gln Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly

1 5 10 15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro

20 25 30

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg

35 40 45

Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu

50 55 60

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr

65 70 75 80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys

115 120 125

Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr

130 135 140

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile

145 150 155 160

Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr

165 170 175

Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe

180 185 190

Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu

195 200 205

Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu

210 215 220

Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
 225 230 235 240
 Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
 245 250 255
 Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
 260 265 270
 Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
 275 280 285
 Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
 290 295 300
 Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
 305 310 315 320
 Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
 325 330 335
 Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
 340 345 350

 Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
 355 360 365
 Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
 370 375 380
 Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
 385 390 395 400
 Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
 405 410 415
 Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
 420 425 430
 Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys
 435 440 445
 Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
 450 455 460
 Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
 465 470 475 480

Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
485 490 495

Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
500 505 510

Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
515 520 525

Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
530 535 540

Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
545 550 555 560

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

Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
580 585 590

Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
595 600 605

Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
610 615 620

Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
625 630 635 640

Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
645 650 655

Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
660 665 670

Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
675 680 685

Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
690 695 700

Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
705 710 715 720

Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu

725 730 735
 Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
 740 745 750
 Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
 755 760 765
 Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
 770 775 780

 Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
 785 790 795 800
 Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
 805 810 815
 Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
 820 825 830
 Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
 835 840 845
 Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser

 850 855 860
 Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
 865 870 875 880
 Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
 885 890 895
 Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn
 900 905 910
 Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu
 915 920 925

 Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser
 930 935 940
 Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn
 945 950 955 960
 Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
 965 970 975
 Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu

980 985 990
Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser

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

1010 1015 1020
Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro

1025 1030 1035 1040
Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys

1045 1050 1055
Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe

1060 1065 1070

Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr

1075 1080 1085

Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr

1090 1095 1100

Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn

1105 1110 1115 1120

Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu

1125 1130 1135

Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser

1140 1145 1150

Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly

1155 1160 1165

Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val

1170 1175 1180

Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala

1185 1190 1195 1200

Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn

1205 1210 1215

Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr

1220 1225 1230

Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly
1235 1240 1245

Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser
1250 1255 1260

Asn Trp Tyr Asn Ala Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys
1265 1270 1275 1280

Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu
1285 1290 1295

<210> 3
<211> 1296
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Botulinum Toxin Type A Vaccine #2
<400> 3

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

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

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

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

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

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

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
100 105 110

Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
115 120 125

Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
130 135 140

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
 145 150 155 160
 Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
 165 170 175
 Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
 180 185 190
 Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
 195 200 205
 Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
 210 215 220
 Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
 225 230 235 240
 Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
 245 250 255
 Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
 260 265 270
 Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
 275 280 285
 Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
 290 295 300
 Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
 305 310 315 320
 Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
 325 330 335
 Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
 340 345 350
 Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
 355 360 365
 Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
 370 375 380
 Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn

385 390 395 400

 Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
 405 410 415
 Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
 420 425 430
 Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys
 435 440 445
 Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
 450 455 460
 Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu

 465 470 475 480
 Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
 485 490 495
 Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
 500 505 510
 Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
 515 520 525
 Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
 530 535 540

 Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
 545 550 555 560
 His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu
 565 570 575
 Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
 580 585 590
 Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
 595 600 605
 Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr

 610 615 620
 Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
 625 630 635 640

Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
 645 650 655
 Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
 660 665 670
 Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
 675 680 685
 Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
 690 695 700
 Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
 705 710 715 720
 Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
 725 730 735
 Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
 740 745 750
 Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
 755 760 765
 Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
 770 775 780
 Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
 785 790 795 800
 Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
 805 810 815
 Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
 820 825 830
 Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
 835 840 845
 Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
 850 855 860
 Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
 865 870 875 880
 Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
 885 890 895

Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn

900 905 910

Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu

915 920 925

Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser

930 935 940

Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn

945 950 955 960

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

965 970 975

Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu

980 985 990

Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser

995 1000 1005

Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu

1010 1015 1020

Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro

1025 1030 1035 1040

Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys

1045 1050 1055

Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe

1060 1065 1070

Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr

1075 1080 1085

Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr

1090 1095 1100

Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Ala Asp Pro Asn

1105 1110 1115 1120

Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu

1125 1130 1135

Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser

1140 1145 1150
 Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly
 1155 1160 1165
 Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val
 1170 1175 1180
 Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala

 1185 1190 1195 1200
 Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn
 1205 1210 1215
 Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr
 1220 1225 1230
 Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly
 1235 1240 1245
 Phe Ile Gly Phe Ala Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser
 1250 1255 1260

 Asn Ala Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys
 1265 1270 1275 1280
 Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu
 1285 1290 1295

 <210> 4
 <211> 1296
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Botulinum Toxin Type A Vaccine #3
 <400> 4
 Met Gln Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
 1 5 10 15

 Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
 20 25 30
 Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
 35 40 45
 Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu

50 55 60
 Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
 65 70 75 80
 Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu

 85 90 95
 Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
 100 105 110
 Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
 115 120 125
 Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
 130 135 140
 Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
 145 150 155 160

 Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
 165 170 175
 Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
 180 185 190
 Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
 195 200 205
 Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
 210 215 220
 Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn

 225 230 235 240
 Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
 245 250 255
 Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
 260 265 270
 Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
 275 280 285
 Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
 290 295 300

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
 305 310 315 320
 Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
 325 330 335
 Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
 340 345 350
 Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
 355 360 365
 Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
 370 375 380
 Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
 385 390 395 400
 Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
 405 410 415
 Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
 420 425 430
 Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys
 435 440 445
 Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
 450 455 460
 Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
 465 470 475 480
 Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
 485 490 495
 Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
 500 505 510
 Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
 515 520 525
 Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
 530 535 540
 Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
 545 550 555 560

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

Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
580 585 590

Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
595 600 605

Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
610 615 620

Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
625 630 635 640

Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
645 650 655

Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
660 665 670

Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
675 680 685

Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
690 695 700

Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
705 710 715 720

Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
725 730 735

Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
740 745 750

Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
755 760 765

Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
770 775 780

Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
785 790 795 800

Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys

805 810 815
 Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
 820 825 830
 Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
 835 840 845
 Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
 850 855 860
 Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
 865 870 875 880

 Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
 885 890 895
 Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn
 900 905 910
 Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu
 915 920 925
 Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser
 930 935 940
 Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn

 945 950 955 960
 Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
 965 970 975
 Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu
 980 985 990
 Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser
 995 1000 1005
 Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu
 1010 1015 1020

 Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro
 1025 1030 1035 1040
 Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys
 1045 1050 1055
 Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe

1060 1065 1070
Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr

1075 1080 1085
Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr

1090 1095 1100
Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn

1105 1110 1115 1120
Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu

1125 1130 1135
Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser

1140 1145 1150
Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly

1155 1160 1165

Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val

1170 1175 1180

Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala

1185 1190 1195 1200

Gly Val Ala Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn

1205 1210 1215

Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr

1220 1225 1230

Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly

1235 1240 1245

Phe Ile Gly Phe Ala Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser

1250 1255 1260

Asn Ala Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys

1265 1270 1275 1280

Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu

1285 1290 1295

<210> 5

<211> 421

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Heavy Chain C-Terminal of Botulinum Toxin Type A #1

<400> 5

Thr Ser Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu

1 5 10 15

Ser Arg Tyr Ala Ser Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp

20 25 30

Pro Ile Asp Lys Asn Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys

35 40 45

Ile Glu Val Ile Leu Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu

50 55 60

Asn Phe Ser Thr Ser Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser

65 70 75 80

Ile Ser Leu Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn

85 90 95

Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu

100 105 110

Gln Asp Thr Gln Glu Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln

115 120 125

Met Ile Asn Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile

130 135 140

Thr Asn Asn Arg Leu Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu

145 150 155 160

Ile Asp Gln Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn

165 170 175

Asn Ile Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile

180 185 190

Trp Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu

195 200 205

Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp

210 215 220

Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn
 225 230 235 240
 Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg
 245 250 255
 Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn
 260 265 270
 Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys

 275 280 285
 Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg
 290 295 300
 Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr
 305 310 315 320
 Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile
 325 330 335
 Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn
 340 345 350

 Asp Gln Gly Ile Thr Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn
 355 360 365
 Gly Asn Asp Ile Gly Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala
 370 375 380
 Lys Leu Val Ala Ser Asn Trp Tyr Asn Ala Gln Ile Glu Arg Ser Ser
 385 390 395 400
 Arg Thr Leu Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp
 405 410 415
 Gly Glu Arg Pro Leu

420

<210> 6

<211> 421

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain C-Terminal of Botulinum Toxin Type A #2

<400> 6

Thr Ser Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu
 1 5 10 15
 Ser Arg Tyr Ala Ser Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp
 20 25 30
 Pro Ile Asp Lys Asn Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys
 35 40 45

 Ile Glu Val Ile Leu Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu
 50 55 60
 Asn Phe Ser Thr Ser Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Ile Ser Leu Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn
 85 90 95
 Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu
 100 105 110
 Gln Asp Thr Gln Glu Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln

 115 120 125
 Met Ile Asn Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile
 130 135 140
 Thr Asn Asn Arg Leu Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu
 145 150 155 160
 Ile Asp Gln Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn
 165 170 175
 Asn Ile Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile
 180 185 190

 Trp Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu
 195 200 205
 Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp
 210 215 220
 Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn
 225 230 235 240
 Leu Ala Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg
 245 250 255

Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn

260 265 270

Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys

275 280 285

Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg

290 295 300

Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr

305 310 315 320

Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile

325 330 335

Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn

340 345 350

Asp Gln Gly Ile Thr Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn

355 360 365

Gly Asn Asp Ile Gly Phe Ile Gly Phe Ala Gln Phe Asn Asn Ile Ala

370 375 380

Lys Leu Val Ala Ser Asn Ala Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser

385 390 395 400

Arg Thr Leu Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp

405 410 415

Gly Glu Arg Pro Leu

420

<210> 7

<211> 421

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain C-Terminal of Botulinum Toxin Type A #3

<400> 7

Thr Ser Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu

1 5 10 15

Ser Arg Tyr Ala Ser Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp

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

Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys
 275 280 285
 Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg
 290 295 300
 Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr
 305 310 315 320

Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Ala Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile
 325 330 335
 Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn
 340 345 350
 Asp Gln Gly Ile Thr Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn
 355 360 365
 Gly Asn Asp Ile Gly Phe Ile Gly Phe Ala Gln Phe Asn Asn Ile Ala
 370 375 380
 Lys Leu Val Ala Ser Asn Ala Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser

385 390 395 400
 Arg Thr Leu Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp
 405 410 415
 Gly Glu Arg Pro Leu
 420

<210> 8

<211> 1266

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain C-Terminal of Botulinum Toxin Type A #1

<400> 8

accagcattc tgaatctgcg ttatgaaagc aaccatctga ttgatctgag ccgttatgcc 60

agcaaaatca atatggtag caaagtgaac ttgatccga tcgataaaaa tcagatccag 120

ctgtttaatc tggaaagcag caaaattgag gtgacatcga aaaacgccat tgtgtataat 180

agcatgtacg agaatttctc gaccagcttt tggattcgta tccgaaata ctttaacagc 240

attagcctga acaacgagta caccattatt aactgcatgg aaaacaatag cggttggaag 300

gtgagcctga attatggtag aattatctgg acctgcagg ataccaaga aatcaaacag 360

cggtttgtgt tcaaatacag ccagatgatt aacatcagcg attacattaa ccgctggatc	420
tttgtgacca ttaccaataa tcgtctgaac aatagcaaaa tctacatcaa cggctgtctg	480
attgaccaga aaccgattag caatctgggt aatattcatg cgagcaacaa catcatgttt	540
aaactggatg gtgtctgtga taccatcgt tatatttga tcaaatactt caacctgttt	600
gataaagaac tgaacgaaaa agaaattaaa gacctgtatg ataaccagag caatagcggc	660
atcctgaaag atttttgggg tgattatctg cagtatgata aaccgtatta catgctgaat	720
ctgtatgatc cgaacaaata tgtggatgtg aataatgtgg gtatccgtgg ctatatgtat	780
ctgaaaggtc cgcgtggtag cgttatgacc accaacattt atctgaatag cagcctgtat	840
cgtggcacca aattcatcat caaaaaatac gccagcggca acaaagataa tattgtgcgt	900
aataatgacc gcgtgtatat taacgttgtg gtgaaaaaca aagaatatcg cctggcaacc	960
aatgcaagcc aggcaggcgt tgaaaaaatt ctgagcgcac tggaaattcc ggatgttgg	1020
aatctgagcc aggttgtgtg tatgaaatcc aaaaatgac agggcatcac caacaaatgc	1080
aaaatgaatc tgcaggacaa taacggcaac gatattggtt ttattggctt ccaccagttc	1140
aacaacattg caaaactggt tgcaagcaat tggataaac cacagattga acgtagcagc	1200
cgtaccctgg gtgttagctg ggaatttatt ccggttgatg atggttgggg tgaacgtccg	1260
ctgtaa	1266
<210> 9	
<211> 1266	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Heavy Chain C-Terminal of Botulinum Toxin Type A #2	
<400> 9	
accagcattc tgaatctgcg ttatgaaagc aaccatctga ttgatctgag ccgttatgcc	60
agcaaaatca atattggtag caaagtgaac ttgatccga tcgataaaaa tcagatccag	120
ctgtttaatc tggaaagcag caaaattgag gtgatcctga aaaacgcat tgtgtataat	180
agcatgtacg agaatttctc gaccagcttt tggattcgta tcccgaata cttaacagc	240
attagcctga acaacgagta caccattatt aactgcatgg aaaacaatag cggttggaaa	300
gtgagcctga attatgggtg aattatctgg accctgcagg atacccaaga aatcaaacag	360
cggtttgtgt tcaaatacag ccagatgatt aacatcagcg attacattaa ccgctggatc	420
tttgtgacca ttaccaataa tcgtctgaac aatagcaaaa tctacatcaa cggctgtctg	480
attgaccaga aaccgattag caatctgggt aatattcatg cgagcaacaa catcatgttt	540

aaactggatg gttgtcgtga tacccatcgt tatatttga tcaaatactt caacctgttt	600
gataaagaac tgaacgaaaa agaaattaaa gacctgtatg ataaccagag caatagcggc	660
atcctgaaag atttttgggg tgattatctg cagtatgata aaccgtatta catgctgaat	720
ctggccgac cgaacaaata tgtggatgtg aataatgtgg gtatccgtgg ctatatgtat	780
ctgaaaggtc cgcgtggtag cgttatgacc accaacattt atctgaatag cagcctgtat	840
cgtggcacca aattcatcat caaaaaatac gccagcggca acaaagataa tattgtgcgt	900
aataatgacc gcgtgtatat taacgttgtg gtgaaaaaca aagaatatcg cctggcaacc	960
aatgcaagcc aggcaggcgt tgaaaaaatt ctgagcgac tggaaattcc ggatgttggt	1020
aatctgagcc aggttgttgt tatgaaatcc aaaaatgac agggcatcac caacaaatgc	1080
aaaatgaatc tgcaggacaa taacggcaac gatattggtt ttattggctt tgcccagttc	1140
aacaacattg caaaactggt tgcaagcaat gcctataatc gtcagattga acgtagcagc	1200
cgtagcctgg gttgtagctg ggaatttatt ccggttgatg atggttgggg tgaacgtccg	1260
ctgtaa	1266
<210> 10	
<211> 1266	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Heavy Chain C-Terminal of Botulinum Toxin Type A #3	
<400> 10	
accagcattc tgaatctgcg ttatgaaagc aaccatctga ttgatctgag ccgttatgcc	60
agcaaaatca atattgtag caaagtgaac ttgatccga tcgataaaaa tcagatccag	120
ctgtttaatc tggaaagcag caaaattgag gtgatcctga aaaacgccat tgtgtataat	180
agcatgtacg agaatttctc gaccagcttt tggattcgta tcccgaata ctttaacagc	240
attagcctga acaacgagta caccattatt aactgcatgg aaaacaatag cggttgga	300
gtgagcctga attatggtga aattatctgg accctgcagg atacccaaga aatcaaacag	360
cgtgttgtgt tcaaatacag ccagatgatt aacatcagcg attacattaa ccgctggac	420
tttgtgacca ttaccaataa tcgtctgaac aatagcaaaa tctacatcaa cggtcgtctg	480
attgaccaga aaccgattag caatctgggt aatattcatg cgagcaacaa catcatgttt	540
aaactggatg gttgtcgtga tacccatcgt tatatttga tcaaatactt caacctgttt	600
gataaagaac tgaacgaaaa agaaattaaa gacctgtatg ataaccagag caatagcggc	660
atcctgaaag atttttgggg tgattatctg cagtatgata aaccgtatta catgctgaat	720

ctgtatgata cgaacaaata tgtggatgtg aataatgtgg gtatccgtgg ctatatgtat	780
ctgaaaggta cgcgtggtag cggttatgacc accaacatatt atctgaatag cagcctgtat	840
cgtggcacca aattcatcat caaaaaatac gccagcggca acaaagataa tattgtgcgt	900
aataatgacc gcgtgtatat taacgttgtg gtgaaaaaca aagaatatcg cctggcaacc	960
aatgcaagcc aggcaggcgt tgcaaaaatt ctgagcgcac tggaattcc ggatgttgtt	1020
aatctgagcc aggttgttgt tatgaaatcc aaaaatgata agggcatcac caacaaatgc	1080
aaaatgaatc tgcaggacaa taacggcaac gatattgggt ttattggctt tgcccagttc	1140
aacaacattg caaaactggt tgcaagcaat gcctataatc gtcagattga acgtagcagc	1200
cgtaccctgg gttgtagctg ggaatttatt ccggttgatg atggttgggg tgaacgtccg	1260
ctgtaa	1266