



공개특허 10-2020-0066748



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0066748
(43) 공개일자 2020년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
C07K 14/4702 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7015408
(22) 출원일자(국제) 2015년11월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년06월05일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2015/081145
(87) 국제공개번호 WO 2016/072446
국제공개일자 2016년05월12일
(30) 우선권주장
JP-P-2014-225642 2014년11월05일 일본(JP)

(71) 출원인
고쿠리츠다이가쿠호진 규슈다이가쿠
일본 812-8581 후쿠오카Ken 후쿠오카시 히가시쿠
하코자키 6쵸메 10반 1고
(72) 별명자
타니 켄자부로
일본국 후쿠오카Ken 후쿠오카시 히가시쿠 하코자키
6쵸메 10반 1고 고쿠리츠다이가쿠호진 규슈다이가
쿠 내
히라모토 타카후미
일본국 후쿠오카Ken 후쿠오카시 히가시쿠 하코자키
6쵸메 10반 1고 고쿠리츠다이가쿠호진 규슈다이가
쿠 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주김장리

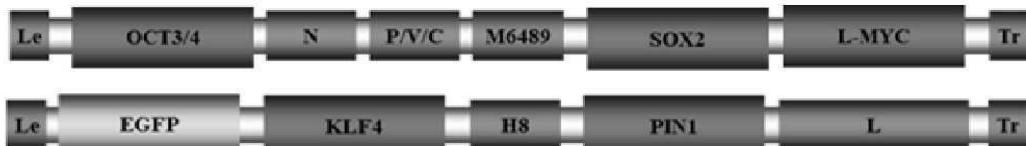
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 바이러스 벡터, 세포 및 작제물

(57) 요 약

바이러스 벡터는, 파라미소바이러스파에 속하는 바이러스 유래이고, 그리고 변형된 H 단백질을 암호화하는 유전자, 변형된 F 단백질을 암호화하는 유전자 및 외래유전자를 지니는 게놈을 포함한다. 해당 게놈은 복수로 분절되어도 되고, 분절된 게놈 각각은 리더 서열과 트레일러 서열을 지녀도 된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0634 (2013.01)

C12N 2510/02 (2013.01)

C12N 2760/18443 (2013.01)

(72) 발명자

타케다 마코토

일본국 도쿄도 신주쿠구 토야마 1쵸메 23-1 고쿠리

츠칸센쇼켄쿠쇼 내

타하라 마이노

일본국 도쿄도 신주쿠구 토야마 1쵸메 23-1 고쿠리

츠칸센쇼켄쿠쇼 내

명세서

청구범위

청구항 1

바이러스 벡터로서,

H 단백질을 암호화하는 유전자 및 F 단백질을 암호화하는 유전자의 양쪽이 변형된, 파라믹소바이러스과(family Paramyxoviridae)에 속하는 바이러스 유래의 게놈을 지니고,

상기 게놈은 외래유전자를 포함하는, 바이러스 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 게놈은 복수로 분절되고,

분절된 게놈 각각은 리더 서열(leader sequence)과 트레일러 서열(trailer sequence)을 지니는, 바이러스 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 게놈은 2개로 분절되어 있는, 바이러스 벡터.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형은,

상기 H 단백질을 암호화하는 유전자의 결손, 또는 상기 H 단백질의 하나 혹은 몇 개의 아미노산이 치환, 결실 혹은 부가되는 변이 및

상기 F 단백질을 암호화하는 유전자의 결손, 또는 상기 F 단백질의 하나 혹은 몇 개의 아미노산이 치환, 결실 혹은 부가되는 변이인, 바이러스 벡터.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 게놈에 있어서의 M 단백질을 암호화하는 유전자가, 상기 M 단백질의 하나 혹은 몇 개의 아미노산이 치환, 결실 혹은 부가되는 변이를 지니는, 바이러스 벡터.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 파라믹소바이러스과에 속하는 바이러스는 홍역 바이러스인, 바이러스 벡터.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 외래유전자는 OCT3/4, SOX2 및 KLF4를 포함하는, 바이러스 벡터.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 바이러스 벡터에 의해서 상기 외래유전자가 도입된 세포.

청구항 9

제8항에 있어서, 조혈줄기세포를 포함하는 혈액 세포인, 세포.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 혈액 세포는 나이브 T 세포(naive T cell), 줄기세포양 기억 T 세포(stem cell-like

memory T cell) 또는 미분화 B 세포인, 세포.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 외래유전자는 OCT3/4, SOX2 및 KLF4를 포함하고, 상기 세포는 기저상태의 다능성 줄기세포인, 세포.

청구항 12

작제물로서,

파라믹소바이러스파에 속하는 바이러스 유래의, 3' 말단에 리더 서열이, 5' 말단에 트레일러 서열이 각각 배치된 복수로 분절된 게놈의 주형이 되는 핵산을 포함하되,

상기 분절된 게놈에 있어서의 H 단백질을 암호화하는 유전자 및 F 단백질을 암호화하는 유전자의 양쪽이 변형되어 있는, 작제물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 바이러스 벡터, 세포 및 작제물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

채취 및 투여에 있어서의 침습성이 낮기 때문에, 혈액 세포는 재생 의료 등의 치료용 세포로서 가장 많이 임상 응용되고 있다. 특히 조혈줄기세포 및 조혈전구세포는, 과거 약 30년에 걸쳐 조혈기를 중심으로 한 악성 종양의 치료법으로 이용되었으며, 현재도 일반치료법으로 이용되고 있다. 이들에 더하여, 림프구, NK 세포, NKT 세포 및 수지상 세포 등의 혈액 세포는, 악성 종양 세포에 대한 면역세포요법으로서 임상시험에 진척되고 있다.

[0003]

또한 최근 유전자를 변형한 혈액 세포를 이용한 유전자 치료에 관하여, 종종 선천성 질환 또는 악성 종양에 대하여 임상시험에 진척되고 있다. 특히 T 세포 수용체 혹은 키메라 항원 수용체 유전자를 도입한 유전자 변형 T 세포 요법은, 악성 종양에 대한 현저한 치료 효과를 기대할 수 있는 신규치료법으로서 주목받고 있다.

[0004]

현재, T 세포에의 유전자 도입에는 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터가 사용되고 있다. 그러나, 렌티바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터의 경우, 게놈 DNA에의 삽입에 의한 게놈 독성이 문제이다.

[0005]

이것에 대해서, 게놈 DNA에의 삽입 가능성이 낮은 유전자 도입법으로서, 아데노 바이러스 벡터를 사용하는 방법, 또한, mRNA 및 플라스미드 등을 이용하는 비바이러스계 벡터를 사용하는 방법이 알려져 있다. 그러나, 아데노 바이러스 벡터 및 비바이러스계 벡터로는 도입 효율이 지극히 낮고, 사용할 수 있는 세포종이 한정되어 있다.

[0006]

게놈 DNA에의 삽입 가능성이 낮은 유전자 도입법으로서, 센다이 바이러스(Sendai virus) 벡터도 알려져 있다. 예를 들면, 특허문현 1에는, F 유전자를 결손시켜 2차적인 감염성 바이러스 입자를 방출하지 않도록 변형한 센다이 바이러스 벡터가 개시되어 있다. 또한, 특허문현 2에는, 세포의 리프로그래밍에 관한 유전자를 탑재한 센다이 바이러스 벡터가 개시되어 있다.

[0007]

센다이 바이러스와 동일한 파라믹소바이러스파(family Paramyxoviridae)에 속하는 홍역 바이러스는, 면역세포 및 상피세포에 지극히 높은 감염력을 보유하는 바이러스이다. 특허문현 3에는 복수로 분절된 게놈을 지니고, 적어도 1개의 분절 게놈이 숙주 내에서 발현가능한 외래유전자를 포함하는 홍역 바이러스가 개시되어 있다.

선행기술문현

특허문현

[0008]

(특허문현 0001) JP 3602058 B

(특허문현 0002) WO2010/008054 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] T 세포에 유전자를 도입할 경우, 상기 특허문헌 1 및 특허문헌 2에 개시된 센다이 바이러스 백터로는 센다이 바이러스 백터의 작제가 비교적 곤란한데다, 센다이 바이러스가 잔존하기 쉽고, 제거하는 것이 곤란하다는 부적합성이 있다. 또한, 센다이 바이러스의 본래의 숙주가 아닌 인간에 대하여, 센다이 바이러스 백터가 어떠한 영향을 미치는지 의견이 적어, 안전성 면에서 실제의 임상 이용에는 주저할 수 밖에 없다.

[0010] 또한, 아데노 바이러스 백터와 마찬가지로, 상기 특허문헌 1 및 특허문헌 2에 개시된 센다이 바이러스 백터 및 상기 특허문헌 3에 개시된 홍역 바이러스에서는, 유전자의 도입 효율을 높이기 위해서, 유전자 도입에 앞서 T 세포를 자극시켜 활성화시킬 필요가 있다. 이 때문에 T 세포의 활성화에 의한 T 세포의 분화가 유기되는 것이 우려되고, 나이브 T 세포 및 미분화 B 세포 등에의 유전자 도입이 곤란하다.

[0011] 전술한 바와 같이 종래의 바이러스 백터에서는 인간에 대한 사용에 있어서의 안전성이 충분히 담보되어 있지 않고, 효율적으로 유전자를 도입할 수 있는 세포가 한정되어 있다.

[0012] 본 발명은 상기 실상을 감안하여 이루어진 것으로, 안전성이 높고 또한 광범위한 세포에 대해서 효율적으로 유전자를 도입할 수 있는 바이러스 백터, 세포 및 작제물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 제1 관점에 따른 바이러스 백터는, H 단백질을 암호화하는 유전자 및 F 단백질을 암호화하는 유전자의 양쪽이 변형된 파라믹소바이러스파에 속하는 바이러스 유래의 계놈을 지니고, 상기 계놈은 외래유전자를 포함한다.

[0014] 이 경우 상기 계놈은 복수로 분절되고, 분절된 계놈 각각은 리더 서열(leader sequence)과 트레일러 서열(trailer sequence)을 지니는 것으로 해도 된다.

[0015] 또 상기 계놈은 2개로 분절되어 있는 것으로 해도 된다.

[0016] 또한, 상기 변형은 상기 H 단백질을 암호화하는 유전자의 결손, 또는 상기 H 단백질의 하나 혹은 몇 개의 아미노산이 치환, 결실 혹은 부가되는 변이 및 상기 F 단백질을 암호화하는 유전자의 결손, 또는 상기 F 단백질의 하나 혹은 몇 개의 아미노산이 치환, 결실 혹은 부가되는 변이인 것으로 해도 된다.

[0017] 또, 상기 계놈에 있어서의 M 단백질을 암호화하는 유전자가 상기 M 단백질의 하나 혹은 몇 개의 아미노산이 치환, 결실 혹은 부가되는 변이를 지니는 것으로 해도 된다.

[0018] 또한, 상기 파라믹소바이러스파에 속하는 바이러스는 홍역 바이러스인 것으로 해도 된다.

[0019] 또, 상기 외래유전자는 OCT3/4, SOX2 및 KLF4를 포함하는 것으로 해도 된다.

[0020] 본 발명의 제2 관점에 따른 세포는, 상기 본 발명의 제1 관점에 따른 바이러스 백터에 의해 상기 외래유전자가 도입된 것이다.

[0021] 이 경우, 상기 본 발명의 제2 관점에 따른 세포는 조혈줄기세포를 포함하는 혈액 세포인 것으로 해도 된다.

[0022] 또한, 상기 혈액 세포는 나이브 T 세포(naive T cell), 줄기세포양 기억 T 세포(stem cell-like memory T cell) 또는 미분화 B 세포인 것으로 해도 된다.

[0023] 또, 상기 외래유전자는 OCT3/4, SOX2 및 KLF4를 포함하고, 상기 세포는 기저 상태(ground state)의 다능성 줄기 세포인 것으로 해도 된다.

[0024] 본 발명의 제3 관점에 따른 작제물은 파라믹소바이러스파에 속하는 바이러스 유래의, 3' 말단에 리더 서열이, 5' 말단에 트레일러 서열이 각각 배치된 복수로 분절된 계놈의 주형이 되는 핵산을 포함하고, 상기 분절된 계놈에 있어서의 H 단백질을 암호화하는 유전자 및 F 단백질을 암호화하는 유전자의 양쪽이 변형되어 있다.

발명의 효과

[0025]

본 발명에 따르면 안전성이 높고 그리고 광범위한 세포에 대해서 효율적으로 유전자를 도입할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026]

도 1은 6개의 유전자를 탑재한 비전파형의 홍역 바이러스 벡터의 분절된 게놈의 구성을 나타낸 도면;

도 2는 도 1에 나타낸 홍역 바이러스 벡터 플라스미드의 구성을 나타낸 도면;

도 3은 홍역 바이러스 벡터를 도입한 BJ 세포 및 활성화 T 세포의 형광 화상을 나타낸 도면;

도 4는 홍역 바이러스 벡터에 탑재한 유전자의 발현 해석의 결과를 나타낸 도면;

도 5는 홍역 바이러스 벡터 및 센다이 바이러스 벡터의 각 혈구계 세포에의 도입 효율을 나타낸 도면;

도 6은 홍역 바이러스 벡터 및 센다이 바이러스 벡터의 제대혈 유래 T 세포에의 도입 효율을 나타낸 도면;

도 7은 홍역 바이러스 벡터와 센다이 바이러스 벡터의 말초혈 유래 T 세포의 각 분획에의 도입 효율을 나타낸 도면;

도 8은 BJ 세포로부터 수립한 다능성 줄기세포(iPS 세포)의 콜로니의 위상차도 및 형광화상을 나타낸 도면;

도 9는 T 세포로부터 수립한 iPS 세포의 초대 콜로니의 위상차도 및 형광화상을 나타낸 도면;

도 10은 BJ 세포 유래 iPS 세포의 미분화 마커의 발현을 나타낸 도면;

도 11은 RT-PCR법에 의한 미분화 마커 및 바이러스 유래 유전자의 발현 해석의 결과를 나타낸 도면;

도 12는 시험관 내에 있어서의 3배엽계 분화 유도 해석의 결과를 나타낸 도면;

도 13은 기형종 형성 시험에 의한 3배엽계 분화능의 해석 결과를 나타낸 도면;

도 14는 BJ 세포 유래 iPS 세포의 핵형 해석의 결과를 나타낸 도면;

도 15는 기저상태의 iPS 세포의 형태를 나타낸 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027]

본 발명에 따른 실시형태에 대해서 설명한다.

[0028]

(실시형태 1)

[0029]

우선, 실시형태 1에 대해서 상세히 설명한다. 본 실시형태에 따른 바이러스 벡터는 파라믹소바이러스과에 속하는 바이러스 유래의 게놈을 포함한다.

[0030]

파라믹소바이러스과에 속하는 바이러스(이하, 단지 「바이러스」라고도 칭함)는, (-)가닥 RNA 게놈을 지니는 RNA 바이러스이다. 바이러스로서는 홍역 바이러스(Measles virus), 센다이 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스(Newcastle disease virus), 이하선염 바이러스(Mumps virus), 1형 파라인플루엔자 바이러스(Parainfluenza virus 1), 2형 파라인플루엔자 바이러스(Parainfluenza virus 2), 3형 파라인플루엔자 바이러스(Parainfluenza virus 3), 5형 파라인플루엔자 바이러스(Parainfluenza virus 5, Simian virus 5), 메타뉴모바이러스(Metapneumo virus), RS 바이러스(Respiratorysyncytial virus), 우역 바이러스(Rinderpest virus) 및 디스템퍼 바이러스(Distemper virus)를 들 수 있다. 상기 파라믹소바이러스과에 속하는 바이러스는 적합하게는 홍역 바이러스이다.

[0031]

파라믹소바이러스과에 속하는 바이러스의 게놈은 비분절의 단일가닥 RNA이고, 3' 말단에 리더 서열(Le)과, 5' 말단에 트레일러 서열(Tr)을 지닌다. 리더 서열과 트레일러 서열 사이에는 바이러스를 구성하는 기능성 단백질을 암호화하는 각종 유전자가 배치되어 있다. 리더 서열은 프로모터 활성을 지닌다. 트레일러 서열은 안티 게놈인 경우에 프로모터 활성을 지닌다.

[0032]

기능성 단백질을 암호화하는 주된 유전자는, N 단백질을 암호화하는 유전자(N 유전자), P 단백질을 암호화하는 유전자(P 유전자), M 단백질을 암호화하는 유전자(M 유전자), F 단백질을 암호화하는 유전자(F 유전자), H 단백질을 암호화하는 유전자(H 유전자) 및 L 단백질을 암호화하는 유전자(L 유전자)이다. 게놈에 있어서의 6개의 유

전자 각각의 양 말단에는, 전사개시서열 및 전사종결서열이라는 전사의 제어 서열이 있다.

- [0033] N 단백질은 바이러스의 게놈에 대하여 5' 말단으로부터 순서대로 정연하게 나열되어 결합하고 게놈 RNA를 포장한다. P 단백질은 RNA 의존성 RNA 폴리메라제의 작은 서브유닛으로서 기능하고, 바이러스의 게놈의 전사복제에 관여한다. 또한 P 유전자로부터는, RNA 편집(RNA editing) 기구 등에 의해 V 단백질 및 C 단백질 등의 보조 단백질이 합성되는 일이 있다. L 단백질은 RNA 의존성 RNA 폴리메라제의 큰 서브유닛으로서 기능하고, P 단백질과 함께 바이러스의 게놈의 전사복제에 관여한다.
- [0034] M 단백질은 바이러스 입자의 구조를 내측으로부터 지지하는 매트릭스 단백질이다. F 단백질은 세포융합에 관여하고 있고, 바이러스에 병원성을 초래한다. H 단백질은 바이러스 수용체 결합 단백질이다. H 단백질은 야생형의 바이러스가 감염을 위한 수용체로서의 SLAM(Signaling lymphocyte activation module) 또는 Nectin4에 결합한다. SLAM 및 Nectin4는 한정된 세포종에서만 발현되고 있기 때문에 바이러스의 숙주 영역을 한정하고 있다.
- [0035] 파라믹소바이러스과에 속하는 바이러스 유래의 게놈이란, 상기 기능성 단백질을 암호화하는 유전자를 지니고 있고, 감염 세포에 있어서 증폭될 수 있는 게놈을 의미한다.
- [0036] 본 실시형태에 따른 바이러스 벡터에 포함되는 상기 게놈에서는, H 유전자 및 F 단백질의 양쪽이 변형되어 있다. H 유전자의 변형은 예를 들면 H 유전자의 결손이다. H 유전자를 결손시킴으로써 H 단백질의 발현을 소실시킬 수 있다. 또한, H 유전자의 변형은 H 단백질의 하나 혹은 몇 개의 아미노산이 치환, 결실 혹은 부가되는 변이어도 된다.
- [0037] 보다 구체적으로는 H 유전자의 변형은 예를 들면, H 단백질의 390번째의 아스파라긴의 아이소류신으로의 치환(N390I), 416번째의 아스파라긴의 아스파라진산으로의 치환(N416D), 446번째의 트레오닌의 세린으로의 치환(T446S), 481번째의 아스파라긴의 티로신으로의 치환(N481Y) 및 492번째의 글루탐산의 글리신으로의 치환(E492G)이다. 이들 치환에 의해서 H 단백질은 SLAM 및 Nectin4에 더하여, 거의 모든 세포에 있어서 발현이 인정되는 막 보조인자 단백질(membrane co-factor protein(CD46))에 결합할 수 있다.
- [0038] H 유전자를 변형시킴으로써 야생형의 H 단백질에 대하여 H 단백질의 구조 또는 기능을 변화시킬 수 있다. 상술한 바와 같이 H 단백질은 바이러스 수용체 결합 단백질이기 때문에, 해당 바이러스 벡터는 H 유전자의 변형에 의해서 SLAM 및 Nectin4 이외의 분자를 수용체로서 이용할 수 있다. 즉, H 유전자를 변형시킴으로써 바이러스 벡터가 감염시킬 수 있는 세포종을 증가시킬 수 있다.
- [0039] F 유전자의 변형은 예를 들면 F 유전자의 결손이다. F 유전자를 결손시킴으로써 F 단백질의 발현을 소실시킬 수 있다. 예를 들면, 홍역 바이러스의 게놈을 이용한 경우, F 단백질을 결손시킨 바이러스 벡터는, 특수한 세포주(Vero/SLAM/F 세포)를 제외한 다른 세포 내에서 병원성을 가진 바이러스를 생산할 수 없다. 이 때문에 상기 특수한 세포주에 감염시키지 않는 한, 해당 바이러스 벡터의 전파성을 소실시킬 수 있다.
- [0040] F 유전자의 변형은, F 단백질의 하나 혹은 몇 개의 아미노산이 치환, 결실 혹은 부가되는 변이이어도 된다. 해당 변이에 의해서 야생형의 F 단백질에 대하여 F 단백질의 구조 또는 기능을 변화시키면 된다.
- [0041] 또한, 상기 게놈에 있어서의 M 단백질을 암호화하는 유전자가, M 단백질의 하나 혹은 몇 개의 아미노산이 치환, 결실 혹은 부가되는 변이를 지녀도 된다. 변이의 예로서, M 단백질의 64번째의 프롤린의 세린으로의 치환(P64S) 및 89번째의 글루탐산의 글라이신으로의 치환(E89G)을 들 수 있다. M 단백질은 바이러스 입자의 구조를 내측으로부터 지지하는 매트릭스 단백질이기 때문에, M 단백질에 변이를 도입함으로써 바이러스 입자 형성능을 향상시켜 더욱 세포융합능을 저하시킬 수 있다.
- [0042] 본 실시형태에 따른 바이러스 벡터에 포함되는 상기 게놈은, 외래유전자를 지닌다. 이 때문에 해당 바이러스 벡터는 외래유전자를 발현시킬 수 있다. 외래유전자는 한정되지 않지만, 예를 들면 바이러스, 세균 및 기생충 등의 병원성을 야기하는 각종 단백질을 암호화하는 유전자, 각종 사이토카인을 암호화하는 유전자, 각종 웨티드 호르몬을 암호화하는 유전자, 및 세포의 리프로그래밍 인자를 암호화하는 유전자 등을 들 수 있다. 또한, 외래유전자로서 GFP(Green Fluorescent Protein) 또는 EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein)를 암호화하는 유전자 등의 리포터 유전자를 삽입해도 된다.
- [0043] 외래유전자의 수는 특별히 한정되지 않지만 적합하게는 2 내지 6개이다. 구체적으로 예시되는 외래유전자로서, 리프로그래밍 인자인 OCT3/4, SOX2 및 KLF4 등을 들 수 있다. 물론 그 밖의 리프로그래밍 인자인 L-MYC 및 PIN1 등이 외래유전자로서 게놈에 더욱 삽입되어도 된다.
- [0044] 상기 기능성 단백질을 암호화하는 유전자 및 외래유전자의 게놈에 있어서의 배치는, 리더 서열과 트레일러 서열

사이이면 특별히 한정되지 않는다. 게놈에 있어서의 상기 기능성 단백질을 암호화하는 유전자의 상호의 위치 관계는, 야생형의 바이러스의 게놈에 있어서의 정렬순서 등의 위치와는 관계없이 임의로 결정할 수 있다.

[0045] 본 실시형태에 따른 바이러스 벡터에 포함되는 상기 게놈은, 복수로 분절되어도 된다. 분절이란 게놈 RNA가 복수 개의 RNA로 단편화되는 것을 의미한다. 즉, 복수로 분절된 게놈은 1개의 게놈으로서 기능하는 1조의 RNA군이다. 분절된 게놈의 개수는 한정되지 않지만 최대로 6개인 것이 바람직하고, 특히 바람직하게는 2개이다.

[0046] 이 경우, 분절된 게놈 각각은 리더 서열과 트레일러 서열을 지닌다. 바람직하게는 분절된 게놈 각각의 일단에 리더 서열이 배치되고, 타단에 트레일러 서열이 배치된다. 이 경우, 분절된 각 게놈의 리더 서열과 트레일러 서열 사이에 상기 기능성 단백질을 암호화하는 유전자 중 어느 하나 및 외래유전자가 배치된다.

[0047] 기능성 단백질을 암호화하는 유전자 및 외래유전자는, 복수로 분절된 게놈의 1개에 삽입되어도 좋고, 2개 이상에 삽입되어도 된다. 복수 개의 외래유전자를 발현시킬 경우에는, 복수로 분절된 게놈의 1개에, 복수 개의 외래유전자의 모두가 삽입되어도 되고, 혹은 복수로 분절된 게놈의 2개 이상에, 각각 1개 이상의 외래유전자가 삽입됨으로써, 전체로서 복수 개의 외래유전자가 삽입되어도 된다. 복수로 분절된 게놈의 1개에 복수 개의 외래유전자가 삽입될 경우, 그 개수는 상기 기능성 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 효율이 현저하게 저하하지 않는 범위 내이면 한정은 되지 않는다.

[0048] 복수로 분절된 게놈에 있어서의 외래유전자의 배치는, 특히 한정되지 않는다. 예를 들면, 홍역 바이러스의 게놈을 2개로 분절시키고 F 유전자를 결손시켜서, 리프로그래밍 인자를 외래유전자로서 삽입한 경우, 제1 분절된 게놈에는 3' 말단으로부터 5' 말단을 향하여, 리더 서열, OCT3/4, N 유전자, P 유전자, 변형된 M 유전자, SOX2, 트레일러 서열의 순서로 배치되고, 제2 분절된 게놈에는 3' 말단으로부터 5' 말단을 향하여, 리더 서열, KLF4, 변형된 H 유전자, L 유전자, 트레일러 서열의 순서로 배치된다. 외래유전자로서 L-MYC 및 PIN1을 더 삽입할 경우, 적절하게는 SOX2와 트레일러 서열 사이에 L-MYC을, H 유전자와 L 유전자 사이에 PIN1을 삽입하면 된다.

[0049] H 유전자, F 유전자 및 M 유전자를 제외한 상기 기능성 단백질을 암호화하는 유전자는, 야생형 바이러스의 게놈에 포함되는 각 유전자의 염기서열과 완전히 동일하지 않더라도, 전사 및 복제에 있어서의 활성이 야생형의 활성과 동등하거나 그 이상이면 변이가 도입된 것이어도 된다. 기능성 단백질을 암호화하는 유전자는, 예를 들면 전사 및 복제에 있어서의 활성이 천연형의 각 단백질과 동등하거나 또는 그 이상이면, 하나 혹은 몇 개, 예를 들면 1 내지 15개, 바람직하게는 1 내지 8개, 보다 바람직하게는 1 내지 5개)의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산으로 이루어지는 단백질을 암호화하는 염기서열이어도 된다. 해당 변이형의 단백질과 천연형의 단백질의 아미노산 서열의 상동성은, 예를 들면 90 내지 100%인 것이 바람직하지만, 전사 및 복제에 있어서의 활성이 보유되어 있으면 아미노산의 상동성은 예를 들면 40 내지 90%이어도 된다.

[0050] 상기 리프로그래밍 인자를 암호화하는 유전자 및 EGFP를 암호화하는 유전자를 외래유전자로서 지니는 분절된 게놈의 적합한 예를 도 1에 나타낸다. 2개의 해당 분절된 게놈에서는, H 단백질에 N390I, N416D, T446S, N481Y 및 E492G의 변이가 가해지도록 H 유전자가 변형되고(H8), 또한 F 유전자가 결손되어 있다. 또한, M 단백질에 P64S 및 E89G의 변이가 가해지는 바와 같이 M 유전자가 변형되어 있다(M6489). 또 P 유전자는 P/V/C로서 나타나 있다.

[0051] 해당 바이러스 벡터는, 세포감염능 및 전파력을 지니고 있다. 세포감염능이란 숙주가 되는 세포에의 접착능 및 막 용합능을 보유함으로써, 세포 내에 바이러스 내부의 게놈 등을 도입할 수 있는 능력이다. 또한, 전파력이란 세포 내에 도입된 게놈을 복제하고, 감염성 입자 또는 그것에 준하는 복합체를 형성하여 해당 게놈을 다른 세포에 전파할 수 있는 능력이다.

[0052] 본 실시형태에 따른 바이러스 벡터는 공지의 바이러스 벡터의 작제 방법으로 작제할 수 있다. 예를 들면 해당 바이러스 벡터는, 바이러스의 게놈에 대응하는 cDNA를 이용하여, 혹은 바이러스의 게놈을 이용하여, 바이러스 입자의 재구성을 행하는 것에 의해 작제할 수 있다. 여기서 바이러스 입자의 재구성이란 바이러스의 게놈을 인공적으로 작제하고, 시험관 내 또는 세포 내에 있어서 원래의 바이러스 또는 재조합 바이러스를 작제하는 것을 의미한다.

[0053] 어느 방법에 있어서나 통상적으로는 바이러스로부터 게놈을 단리하고, 역전사 반응 등에 의해 게놈의 cDNA를 작제한다. 이어서, 게놈을 분절할 경우에는, 공지의 유전자 재조합 기술 및 핵산증폭법 등에 의해, 해당cDNA를 복수의 cDNA로 단편화한 후에, 외래유전자의 삽입 등의 조작을 실시한다. 단편화의 방법은 게놈으로부터 작제한 cDNA의 염기서열 등에 근거해서 결과적으로 복수의 cDNA 단편이 조제되는 방법이면 되고, 한정은 되지 않는다.

[0054] 게놈으로부터 작제한 cDNA의 염기서열에 근거하는 조제 방법으로는, 예를 들면 게놈으로부터 작제한 cDNA 중의

소정의 영역을 주형으로 하여 PCR법 등으로 증폭 단편을 얻는 방법을 들 수 있다. 소정의 영역은 발현시키는 게놈의 구조를 고려해서 적당히 설정할 수 있고, 한정은 되지 않는다. 소정의 영역은 바이러스의 기능성 단백질을 암호화하는 각 유전자 단편을 각각 개별적으로 증폭시킬 수 있도록 설정하는 것이 바람직하다. 이와 같이 영역을 설정한 경우에는 얻어진 각 유전자의 증폭 단편을, 소망의 종류, 개수, 정렬순서(위치)로 결합시킴으로써 cDNA 단편을 조제할 수 있다.

[0055] 분절된 게놈에 외래유전자를 삽입하려면, 별도 조제한 외래유전자를 포함하는 DNA 단편을, 전술한 분절화한 cDNA 중에 공지의 유전자 재조합 기술을 이용해서 삽입하면 된다. 도 1에 나타내는 N 유전자를 포함하는 제1 분절된 게놈에 대응하는 cDNA의 염기서열 및 H 유전자를 포함하는 제2 분절된 게놈에 대응하는 cDNA의 염기서열은 각각 서열 번호 1 및 서열 번호 2로 나타낸다.

[0056] 바이러스 입자의 재구성에는, 조제된 cDNA 단편을 포함하는 DNA, 바람직하게는 플라스미드 DNA, 또는, cDNA를 미리 시험관 내에서 전사한 RNA를 이용하면 된다.

[0057] 일반적으로, 파라믹소바이러스파에 속하는 바이러스의 게놈 또는 그 안티게놈을 노출형의 RNA인 채로 숙주 세포 내에 도입해도, RNA 의존성 RNA 폴리메라제의 주형이 되지는 않는다. 주형이 되려면 해당 RNA 의존성 RNA 폴리메라제에 의한 RNA합성 반응의 초기 단계에 있어서, N 단백질, P 단백질 및 L 단백질이 존재하고, 이들 단백질과 게놈 RNA의 복합체(RNP 복합체)의 형성이 필요하다. 그 때문에 바이러스 벡터를 재구성하려면, N 단백질, P 단백질 및 L 단백질을 합쳐서 발현시키거나, 혹은 N 단백질, P 단백질 및 L 단백질을 발현시킬 수 있는 숙주를 이용하는 것이 바람직하다. 이에 더하여 상기 바이러스 벡터에 포함되는 RNA의 F 유전자를 결손시킨 경우에는, F 단백질도 발현될 수 있는 숙주를 이용하는 것이 바람직하다.

[0058] 상기 바이러스 벡터는, 예를 들면 바이러스의 N 단백질, P 단백질 및 L 단백질을 발현하는 숙주 내에, 상기 게놈 또는 그 cRNA를 도입함으로써 작제할 수 있다. 또한, 바이러스의 N 단백질, P 단백질 및 L 단백질을 발현하는 숙주 내에, 상기 게놈 또는 그 cRNA의 주형이 되는 cDNA를 포함하는 DNA와, 해당 DNA의 전사유닛을 도입해도 된다. 이밖에, 숙주 내에 상기 게놈 또는 그 cRNA의 주형이 되는 cDNA를 포함하는 DNA와, 바이러스의 N 유전자를 포함하는 DNA와, 바이러스의 P 유전자를 포함하는 DNA와, 바이러스의 L 유전자를 포함하는 DNA와, 이들 DNA의 전사유닛을 도입해도 된다.

[0059] 상기 숙주가 발현되는 N 단백질, P 단백질 및 L 단백질로는, 이들의 천연형의 단백질의 활성과 동등하거나 또는 그 이상이라면 완전히 동일한 것이 아니더라도 되고, 예를 들면 하나 혹은 몇 개, 예를 들면 1 내지 15개, 바람직하게는 1 내지 8개, 보다 바람직하게는 1 내지 5개)의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산으로 이루어지는 단백질이어도 되고, 혹은 다른 바이러스 유래 또는 아미노산 서열이 크게 다른 완전히 별개의 단백질이어도 된다.

[0060] 상기 숙주는 상기 기능성 단백질 및 외래유전자가 발현될 수 있는 세포이면 특별히 한정은 되지 않고, 예를 들면 배양된 포유 동물 또는 조류의 세포, 계란 등을 들 수 있다. 구체적으로, 배양 세포로는 예를 들면 BHK-T7/9 세포, CHO, 293세포, B95a, 원숭이세포COS-7, Vero, 마우스L세포, 래트GH3, 인간FL세포, LLCMK2, MDCK, MDBK, CV-1, HeLa, HepG2, P19, F9, PC1Z, BAF3, Jurkat, 인간PBMNC, MT-4, Molt-4, NIH3T3, L929, Vero/hSLAM, CHO/hSLAM, A549/hSLAM, HeLa/hSLAM, 293T, BHK 및 닭의 배아섬유아세포 등을 이용할 수 있다. 또한, Sf9 세포, Sf21세포 등의 곤충세포를 이용할 수도 있다.

[0061] 상기 전사유닛으로는, 예를 들면 소정의 DNA 의존성 RNA 폴리메라제를 발현하는 재조합 천연두 바이러스, 소정의 DNA 의존성 RNA 폴리메라제유전자를 포함하는 DNA 등이 바람직하다.

[0062] 또한, 상기 제조방법으로 얻어지는 바이러스 벡터는, 다른 세포와의 공배양 등에 의해 선택적으로 또한 효율적으로 증식시킬 수 있다. 예를 들면, 홍역 바이러스를 이용한 바이러스 벡터의 경우, 상기 제조방법으로 얻어진 재구성한 바이러스 벡터를 포함하는 배양 세포를, 미리 배양해 둔 Vero/SLAM/F 세포 상에 파종하고 공배양하는 것에 의해, 바이러스 벡터가 감염 및 증식된 Vero/SLAM/F 세포의 거대세포를 얻을 수 있다.

[0063] 보다 구체적으로는, 예를 들면 홍역 바이러스 벡터를 작제할 경우, 도 1에 나타내는 분절된 게놈에 대응하는 2개의 플라스미드를, 필요에 따라서 기능성 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 다른 플라스미드와 함께 적절한 세포에 도입하면 된다. 그 후 세포를 회수하고 Vero/SLAM/F 세포 상에 파종하고, 출현한 거대세포를 채취하면 홍역 바이러스 벡터를 취득할 수 있다. 홍역 바이러스 벡터를 새로운 Vero/SLAM/F 세포에 감염시키고, 증폭시키고 나서 홍역 바이러스 벡터를 방출시켜도 된다. 이 경우, 원심분리에 의해서 바이러스를 포함하는 상청액을 바이러스액으로서 회수할 수 있다.

- [0064] 이상 상세히 설명한 바와 같이, 본 실시형태에 따른 바이러스 벡터는 H 유전자가 변형되어 있기 때문에, 다양한 세포종에 감염시킬 수 있고, 즉 숙주 영역을 넓힐 수 있다. 또한, 해당 바이러스 벡터는 F 유전자가 변형되어 있기 때문에, 세포감염능을 가지는 바이러스의 생산을 막을 수 있고, 전파성을 소실시킴으로써 안전성을 향상시킬 수 있다. 또, 상기 바이러스 벡터는 복제 과정 전부가 세포질 내에서 행하여지고 DNA합성을 수반하지 않기 때문에, 게놈 독성의 염려가 없고 지극히 안전성이 높다.
- [0065] 또한, 본 실시형태에 따른 바이러스 벡터에 포함되는 게놈은 복수로 분절되어도 되도록 하였다. 이와 같이 함으로써 복수의 외래유전자 또는 사이즈가 큰 유전자를 탑재할 수 있다. 또한, 분절된 게놈 각각은 리더 서열과 트레일러 서열을 지녀도 되도록 하였다. 파라믹소바이러스과에 속하는 바이러스에서는, 하류(5'측)의 유전자일수록 발현이 낮아지는 특징적인 유전자 발현의 패턴이 알려져 있지만, 분절된 게놈 각각이 리더 서열과 트레일러 서열을 지님으로써, 분절된 게놈 각각에 폴리메라제가 작용할 수 있고, 각 유전자의 발현량을 높일 수 있다. 또한, 숙주에 있어서 복수의 외래유전자를 동시에 발현되게 할 수 있다. 또 게놈을 2개로 분절함으로써, 단백질의 발현 효율을 높게 유지하기에도 적합한 게놈의 사이즈가 된다. 물론 분절되지 않은 1개의 게놈에서도 마찬가지의 기능을 발휘할 수 있다.
- [0066] 또, 본 실시형태에서는 분절된 게놈상의 M 단백질을 암호화하는 유전자가, M 단백질의 하나 혹은 몇 개의 아미노산이 치환, 결실 혹은 부가되는 변이를 지녀도 되도록 하였다. 이와 같이 함으로써 해당 바이러스 벡터의 세포에 대한 유전자 도입효율 및 안전성을 더욱 높일 수 있다.
- [0067] 또한, 본 실시형태에서는 바이러스가 홍역 바이러스이더라도 되도록 하였다. 홍역 바이러스는 면역세포에 대한 강한 지향성을 지니기 때문에, 상기 바이러스 벡터에 따르면 B 세포, T 세포 및 과립구에 대해서도 고효율로 유전자 도입이 가능하다. 또, 상기 바이러스 벡터는 하기 실시예에 나타내는 바와 같이, 활성화되어 있지 않은 나이브 T 세포, 중앙 기억 T 세포, 이谶터 기억 T 세포 및 B 세포 나아가서는 조혈줄기세포를 포함하는 혈액 세포에도 지극히 고효율로 유전자 도입이 가능하다. 또한, 홍역 바이러스는 본래 인간을 숙주로 하므로 인간에 대한 영향에 관한 지견이 축적되어 있기 때문에, 안전면에서 배려하면서 적절하게 사용할 수 있다.
- [0068] 또, 본 실시형태에서는 외래유전자의 예로서, OCT3/4, SOX2 및 KLF4를 들었다. 본 실시형태에 따른 바이러스 벡터의 게놈으로서 홍역 바이러스의 게놈을 이용한 경우, 리프로그래밍 인자를 암호화하는 유전자를 탑재한 해당 바이러스 벡터에 의해, 종래법으로는 작제가 매우 곤란한 기저상태의 iPS 세포를 작제할 수 있다.
- [0069] 또한, 본 실시형태에 따른 바이러스 벡터에 포함되는 RNA는 바이러스가 원래 지니는 게놈과 마찬가지로 (-)가닥 RNA 이외에, 필요에 따라서 (+)가닥 RNA이어도 된다.
- [0070] 다른 실시형태에서는, 상기 바이러스 벡터에 포함되는 게놈의 작제에 적합한 작제물이 제공된다. 해당 작제물은 파라믹소바이러스과에 속하는 바이러스 유래의, 3' 말단에 리더 서열이, 5' 말단에 트레일러 서열이 각각 배치된 복수로 분절된 게놈의 주형이 되는 핵산을 포함하고, 해당 분절된 게놈에 있어서의 H 단백질을 암호화하는 유전자 및 F 단백질을 암호화하는 유전자 양쪽이 변형되어 있다.
- [0071] 상기 핵산은 전술한 분절된 각 게놈에 근거해서 작제된 cDNA 또는 cRNA이어도 된다. 예를 들면 해당 핵산은 분절된 각 게놈에 대응하는 복수의 cDNA 또는 플라스미드 DNA이어도 된다.
- [0072] 예를 들면, 홍역 바이러스의 게놈을 2개로 분절시키고, F 유전자를 결손시킨 경우, 상기 작제물은 3' 말단으로부터 5' 말단을 향하여, 리더 서열, N 유전자, P 유전자, M 유전자 및 트레일러 서열의 순서로 배치된 게놈에 대응하는 cDNA와, 3' 말단으로부터 5' 말단을 향하여, 리더 서열, H 유전자, L 유전자 및 트레일러 서열의 순서로 배치된 게놈에 대응하는 cDNA를 포함한다.
- [0073] 해당 작제물은 종래의 유전자공학에 있어서의 유전자 재조합 기술을 이용하여, 용이하게 외래유전자를 삽입할 수 있다. 해당 작제물을 상기한 바와 같이 바이러스 입자의 재구성에 이용함으로써, 상기 분절된 각 게놈을 포함하는 바이러스 벡터를 효율적으로 작제할 수 있다.
- [0074] 해당 작제물은 종래의 형질전환 또는 형질감염기술을 개재하여 원핵세포 또는 진핵세포에 도입될 수 있다. 예를 들면, 해당 발현 작제물을 플라스미드의 형태로 각종 세포에 도입할 수 있다.
- [0075] 또한, 상기 작제물이 포함하는 핵산은 파라믹소바이러스과에 속하는 바이러스의 게놈 유래의, 3' 말단에 리더 서열이, 5' 말단에 트레일러 서열이 각각 배치된 복수로 분절된 게놈의 cRNA이어도 된다. 또, 상기 작제물은 파라믹소바이러스과에 속하는 바이러스 유래의, 3' 말단에 리더 서열이, 5' 말단에 트레일러 서열이 배치된 게놈의 주형이 되는 핵산을 포함하고, 해당 게놈에 있어서의 H 단백질을 암호화하는 유전자 및 F 단백질을 암호화하

는 유전자의 양쪽이 변형되어 있어도 된다.

[0076] (실시형태 2)

[0077] 다음으로 실시형태 2에 대해서 설명한다. 본 실시형태에 따른 세포는 상기 실시형태 1에 따른 바이러스 백터에 의해 외래유전자가 도입된 것이다.

[0078] 바이러스 백터는 공지의 방법으로 세포에 감염시킬 수 있다. 예를 들면, 세포를 포함하는 배양액에 바이러스 백터를 첨가하고, 실온에 있어서 $1,200 \times g$ 로 45분간 원심시키면 된다. 이 밖에 바이러스 백터를 세포에 감염시키는 방법으로서 전기천공법, 리포렉션법, 히트쇼크법, PEG법, 인산칼슘법 및 DEAE 텍스트란법 등의 각종 바이러스를 세포에 감염시키는 방법을 들 수 있다.

[0079] 세포는 특별히 한정되지 않지만, 인간의 체세포, 섬유아세포, 혈액세포 외에 원숭이의 체세포 등이다. 세포로서는 B 세포, 활성화되거나 또는 활성화되어 있지 않은 T 세포, 과립구, 조혈줄기세포를 포함하는 혈액 세포 등이 적합하다. 특히 적합한 세포는 나이브 T 세포, 줄기세포양 기억 T 세포 또는 미분화 B 세포다. 세포에 외래유전자를 도입할 때의 해당 바이러스 백터의 역가는 특별히 한정되지 않지만, MOI(multiplicity of infection)가 1 내지 100, 바람직하게는 3 내지 20, 보다 바람직하게는 5 내지 10이다.

[0080] 적어도 OCT3/4, SOX2 및 KLF4를 외래유전자로서 포함하는 상기 바이러스 백터로 외래유전자가 도입된 세포는, 미분화 마커를 발현하고, 3배엽계 분화능을 지니는 iPS 세포로 유도된다. 상기 바이러스 백터로 유전자를 도입함으로써, 기저상태의 iPS 세포도 유도할 수 있다.

[0081] 이상 상세히 설명한 바와 같이 본 실시형태에 따른 세포는 상기 바이러스 백터에 의해 유전자가 도입되므로, 소망의 복수의 외래유전자를, 동시에 장기에 걸쳐 발현시킬 수 있다. 또한, 유전자 도입의 대상으로서 나이브 T 세포, 줄기세포양 기억 T 세포 또는 미분화 B 세포, 나아가 조혈줄기세포를 선택할 수 있기 때문에, 본 실시형태에 따른 세포는 유전자를 변형한 혈액 세포를 이용한 유전자 치료, 특히 유전자 변형 T 세포 요법에 지극히 유용하다.

[0082] 또한, 해당 세포는 OCT3/4, SOX2 및 KLF4를 포함하는 상기 바이러스 백터로 외래유전자가 도입되고, 기저상태의 iPS 세포로 유도된다. 기저상태의 iPS 세포는 증식 효율이 보다 높고 단세포로 파종해도 증식할 수 있기 때문에, 대량 작제와 용이한 보존이 가능하게 된다. 또한, 기저상태이기 때문에 광범위한 세포종으로 분화시킬 수 있다.

[0083] 또, 본 실시형태에 따른 세포의 용도는 외래유전자에 따라서 다양하다. 세포에 도입하는 외래유전자를 T 세포 수용체 유전자 또는 키메라 항원 수용체 유전자로 함으로써 악성 종양에 대한 T 세포 요법에 이용할 수 있다. 또한, 외래유전자로서 T 세포에 Zn 핑거 뉴클레아제 등을 도입해서 CCR5유전자를 파괴(유전자 편집)함으로써, HIV/AIDS에 대한 치료에 이용할 수 있다. 아데노신 데아미나제(ADA) 등의 효소결손증 환자의 세포에 효소를 암호화하는 유전자를 도입함으로써, 효소결손증의 치료도 가능하다.

[0084] 또한, 다른 실시형태에서는 iPS 세포의 작제 방법이 제공된다. 해당 iPS 세포의 작제 방법은 상기 실시형태 2에 따른 바이러스 백터를 세포에 감염시키는 감염 공정을 포함한다. 해당 세포는 혈액 세포이어도 되고, 활성화(자극)되어 있지 않은 면역세포, 적합하게는 나이브 T 세포이다. 해당 iPS 세포의 작제 방법은 기저상태의 iPS 세포의 작제 방법을 포함한다.

실시예

[0086] 이하의 실시예에 의해 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 실시예로 한정되는 것이 아니다.

[0087] (세포배양)

[0088] 하기 실시예에 있어서의 세포배양은 이하와 같이 행하였다. 마우스 태아섬유아세포(MEF 세포), Vero/SLAM 세포, 섬유아세포주인 BJ 세포는, 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified eagle's medium: DMEM)(나카라이테스크사(NACALAI TESQUE, INC.) 제품)에 10%의 소 태아 혈청(FBS)(하이클론(Hyclone)사 제품)을 함유시킨 배양액에서 배양하였다. Vero/SLAM/F 세포는 DMEM에 0.5mg/ml의 G418(나카라이테스크사 제품) 및 FBS를 7.5%로 함유시킨 배양액에서 배양하였다.

[0089] BHK-T7/9 세포는 α 변형 최소필수배지 이글(α -modified minimum essential medium eagle: α -MEM)(라이프 테크놀로지즈사(Life Technologies Corporation) 제품)에, $600\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Hygromycin B(나카라이테스크사 제품) 및 10% FBS를 함유시킨 배양액에서 배양하였다. 건강인의 말초혈 유래 혈액 세포는, RPMI1640(나카라이테스크사 제

품)에 10% FBS를 함유시킨 배양액에서 배양하였다. 제대혈 유래 또는 건강인 유래 T 세포는, RPMI1640에 10% FBS를 함유시킨 배양액, 해당 배양액에 175IU/ml의 인간 재조합 IL-2(페프로텍사(PeproTech, Inc.) 제품)을 더 옥 첨가한 배양액, 또는 KBM502 배양액(코진 바이오사(Kohjin Bio Co., Ltd.) 제품)으로 배양하였다. 제대혈 유래 조혈줄기세포는 Stemspan 배양액(베리타스사(Veritas Corporation) 제품)에, 인간 재조합 SCF, 인간 재조합 Flt-3L 및 인간 재조합 TPO (모두 페프로텍사 제품)을 첨가한 배양액에서 배양하였다.

[0090] 모든 프라임드형의 iPS 세포는, 인간 ES 세포유지 배양액으로 MEF 세포 상에 있어서 배양하였다. 인간 ES 세포유지 배양액의 조성은, DMEM/F12(나카라이테스크사 제품)에, 20% KSR(라이프 테크놀로지즈사 제품), 2-머캅토에탄올(시그마(Sigma)사 제품), 2mM L-글루타민(나카라이테스크사 제품), 1% 비필수 아미노산(나카라이테스크사 제품), 4ng/ml basic FGF(페프로텍사 제품)이다.

[0091] 기저상태의 iPS 세포는, 혼합 배양액으로 MEF 세포 상에 있어서 배양하였다. 해당 혼합 배양액의 조성은, DMEM/F12에, 20% KSR, 2-머캅토에탄올, 2mM L-글루타민, 1% 비필수 아미노산, 1µM CHIR99021(밀테니 바이오텍사(Militenyi Biotec K.K.) 제품), 1µM PD0325901(밀테니 바이오텍사 제품), 1,000 단위/ml의 인간 재조합 LIF(나카라이테스크사 제품)이다.

[0092] (실시예 1: 비전파형 유전자변형 홍역 바이러스 백터의 구축)

[0093] 비전파형 유전자변형 홍역 바이러스 백터는, 홍역 바이러스를 구성하는 기능성 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 2개의 플라스미드(MV-HL-K-Pin1-EGFP 및 MV-NPM-OSM)와, 바이러스 합성을 촉진하는 4개의 플라스미드(pCITE-IC-N, pCITE-IC-PΔC, pCITEko-9301B-L, pCA7-IC-F)를, 이하와 같이 패키지 세포로서 BHK-T7/9 세포에 SLAM 유전자 및 홍역 바이러스의 F 유전자를 도입한 Vero/SLAM/F 세포와 공배양하는 것에 의해 생산하였다. 외래유전자로서, iPS 세포의 작제에 사용되는 OCT3/4 유전자, SOX2 유전자, L-MYC유전자, KLF4 유전자 및 PIN1 유전자와, 리포터 유전자로서 EGFP 유전자를 삽입하였다.

[0094] 우선, H 단백질에 N390I, N416D, N481Y, E492G의 변이 및 M 단백질에 P64S, E89K의 변이가 삽입되도록, 홍역 바이러스주 MV-IC323-EGFP에 있어서의 야생형의 H 유전자 및 M 유전자를, 유전자 재조합으로 변형하였다.

[0095] 이어서 도 2에 나타내는 바와 같이, MV-NPM-OSM플라스미드는, 상기 변이를 삽입한 MV-IC323-EGFP의 EGFP 유전자를 OCT3/4 유전자에, F 유전자를 SOX2 유전자로, H 유전자 및 L 유전자를 L-MYC유전자로 재조합하는 것에 의해 작제하였다. 한편, MV-HL-K-Pin1-EGFP 플라스미드는, 상기 변이를 삽입한 MV-IC323-EGFP의 N 유전자, P 유전자, M 유전자 및 F 유전자를 KLF4 유전자로 재조합하고, L 유전자와 H 유전자 사이에 PIN1 유전자를 삽입함으로써 작제하였다.

[0096] MV-NPM-OSM플라스미드 및 MV-HL-K-Pin1-EGFP 플라스미드와, 4개의 플라스미드(pCAG-T7-IC-F, pCITE-IC-N, pCITE-IC-PΔC, pCITEko-9301B-L)를 이용하여, BHK-T7/9 세포에 유전자 도입하였다. 2일 후에 세포를 접시에서 회수하고, Vero/SLAM/F 세포 상에 과종하고, 2일 후에 거대세포를 채취하고, 홍역 바이러스 백터를 회수하였다. 회수한 홍역 바이러스 백터를 새로운 Vero/SLAM/F 세포에 감염시켜 증폭 후 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 DMEM에 재현탁시키고, 동결 용해를 반복하는 것에 의해, 세포 내로부터 배양액으로 홍역 바이러스 백터(MVV)를 방출시켰다. 그 후, 원심분리에 의해서 상청액만을 바이러스액으로서 회수하고, 분주 후 -80°C에서 보존하였다. 역가는 Vero/SLAM 세포에 해당 바이러스액을 첨가하고, 2일 후에, 유동세포계수법으로 GFP 양성세포의 비율을 해석하고 결정하였다.

[0097] (실시예 2: 비전파형 유전자변형 홍역 바이러스 백터의 평가)

[0098] 실시예 1에서 작제한 MVV를 활성화 T 세포 혹은 BJ 세포를 이용하여 평가하였다. 활성화 T 세포는 건강인 유래 말초혈을 KBM502 배양액 중에서 Dynabeads(등록상표) Human T-Activator Cd3/CD28(라이프 테크놀로지즈사 제품)을 이용하여 5일간 자극시킴으로써 작제하였다. 보다 상세하게는 5×10^4 개의 각 세포를 12웰 플레이트에 과종하고, 역가에 따른 양의 바이러스액을 첨가하였다. 그 다음에 원심법(실온, 1,200×g, 45분)으로 유전자 도입 후, PBS로 한번 세정하고 배양액을 교환하였다.

[0099] 2일 후 유동세포계수법으로 활성화 T 세포의 GFP 양성세포에 있어서의 5개의 유전자(OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC 및 PIN1)의 발현을 해석하였다. 또한, BD Cytofix/Cytoperm(상표) Fixation/Permeabilization Kit(BD사 제품)를 이용해서 외래유전자 유래의 단백질의 발현을 해석하였다. 사용한 항체는 항OCT3/4 항체, 항SOX2항체, 항KLF4 항체(이상 모두 산타크루즈(Santa cruz)사 제품), 항MYC 항체 및 항PIN1 항체(이상 모두 R&D사 제품)이다.

[0100] (결과)

- [0101] 도 3은 BJ 세포 및 활성화 T 세포의 형광 화상을 나타낸다. 양 세포 모두 형광이 확인되었다. 따라서 MVV는 BJ 세포 및 활성화 T 세포에 유전자를 도입하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0102] 도 4는 활성화 T 세포의 GFP 발현을 해석한 결과를 나타낸다. MVV를 이용하여 활성화 T 세포에 유전자 도입하고, 도입 후 3일째에서의 GFP 양성세포에 있어서의 상기 5개의 유전자의 발현을 해석하였다. 이 결과로부터 EGFP 유전자에 더하여 5개의 유전자 모두가 동시에 발현되고 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [0103] (실시예 3: 비전파형 유전자변형 홍역 바이러스 벡터에 의한 유전자 도입과 그 해석)
- [0104] 동의를 얻은 건강인으로부터 말초혈 또는 제대혈을 10ml정도 채취하고, 립프구 분리액(나카라이테스크사 제품)을 이용해서 단핵구를 분리하였다. 동시에, NH₄Cl, KHCO₃ 및 EDTA(모두 나카라이테스크사 제품)로 조제한 용혈제로 1ml 정도의 말초혈 또는 제대혈을 용혈시켰다. 이들 방법으로 회수한 혈액 세포에, 원심법(실온, 1,200×g, 45분)으로 MVV를 이용하여 유전자 도입을 행하였다(MOI=5). 유전자 도입 후, PBS(-)(PBS 태블릿(타카라 바이오사(Takara Bio Inc.) 제품)을 순수로 용해시키고, 오토클레이브 멸균을 실시하여 조제)로 세정 후 배양액을 교환하였다. 2일 후 세포를 회수하여 유동세포계수법으로 GFP의 발현을 지표로 각 혈구계보의 유전자도입률 및 각 세포계보에 있어서의 홍역 바이러스 수용체의 발현을 해석하였다.
- [0105] 비교대조군으로서, GFP 유전자를 탑재한 센다이 바이러스 벡터(SeV) (PlasmEx(등록상표)-AG: 의학생물학연구소에서 입수)에 대하여, MVV와 마찬가지의 방법으로 유전자 도입을 행하였다. 각 혈구계보의 해석에 사용한 항체는 단구계:APC-Cy7표지 항CD14 항체(바이오레전드사(BioLegend, Inc.) 제품), PE표지 항CD11b 항체(BD사제), 호중구계:PerCP-Cy 5.5표지 항Cd15 항체(바이오레전드사 제품), B 세포계:APC-Cy7표지 항CD19 항체(바이오레전드사 제품), T 세포계:APC표지 항CD3 항체(바이오레전드사 제품), APC-Cy7표지 항CD4 항체(바이오레전드사 제품), PE-Cy7표지 항CD8 항체(바이오레전드사 제품), APC표지 항CD45RA(바이오레전드사 제품), PE표지 항CD197 항체(바이오레전드사 제품), NK 세포:PE-Cy7표지 항CD56 항체(바이오레전드사 제품)이다. 사용한 바이러스 수용체에 대한 항체는 PE표지 항CD46 항체(e바이오센스(ebioscience)사 제품), PE표지 항CD150 항체(바이오레전드사 제품) 및 PE표지 항Nectin4 항체(R&D사 제품)이다. 그리고, 단구는 CD14⁺ 또한 CD11b⁺로 정의하였다. B 세포는 CD19⁺ 또한 CD3⁺로 정의하였다. T 세포는 CD3⁺ 또한 CD19⁻로 정의하였다. 호중구는 CD15⁺로 정의하였다. NK 세포는 CD3⁻ 또한 CD19⁻ 또한 CD56⁺로 정의하였다.
- [0106] (결과)
- [0107] 도 5는 말초혈 유래의 각 혈구계 세포의 GFP 양성을 나타낸다. 단구에 있어서는 양 벡터 모두 높은 유전자 도입률이 확인되었으나, B 세포, T 세포 및 호중구에 있어서 MVV는 SeV와 비교하여 높은 유전자 도입 효율이 확인되었다.
- [0108] 도 6은 제대혈 유래의 활성화되어 있지 않은 T 세포의 GFP 양성을 나타낸다. SeV는 MOI=10에서도 유전자가 도입되지 않았음에 비하여, MVV는 MOI=5로 높은 유전자 도입 효율을 나타내었다.
- [0109] T 세포를 CD45RA와 CCR7(CD197)로 분획화시키고, 각 분획에 있어서의 유전자 도입 효율을 검토하였다. 도 7에 나타내는 바와 같이, 항원에 폭로되기 전의 나이브 T 세포 및 줄기세포양 기억 T 세포 분획(CD45RA high 그리고 CD197 high) 및 항원의 재폭로에 의해서 증식하는 중앙 기억 T 세포분획(CD45RA low 동시에 CD197 high) 및 이 벡터 기억 T 세포 분획(CD45RA low 그리고 CD197 low)에 있어서 MVV에 의한 고효율의 유전자 도입을 확인할 수 있었다. 한편 CD8+세포의 결과로부터 이벡터 T 세포분획(CD45RA high 그리고 CD197 low)에서는 MVV에 의한 유전자 도입의 효율화는 확인되지 않았다.
- [0110] 상기 결과에 의해 센다이 바이러스 벡터를 포함하는 종래법에서는 유전자 도입이 곤란했던 나이브 T 세포 및 줄기세포양 기억 T 세포에 대해서, MVV에 의한 고효율의 유전자 도입이 가능함을 나타내고 있다. 따라서, 본 실시예에 따른 MVV는 유전자변형T 세포를 이용하는 유전자 치료, 특히 유전자 변형 T 세포 요법에 있어서 혁신적인 치료용 벡터가 될 가능성을 강하게 시사하였다. 또한, MVV는 초대배양B 세포에 대해서도 고효율로 유전자를 도입할 수 있었다.
- [0111] (실시예 4: 비전파형 유전자변형 홍역 바이러스 벡터를 이용한 iPS 세포의 수립)
- [0112] BJ 세포에 MVV를 이용하여 원심법(실온, 1,200×g, 45분)으로 유전자 도입을 행하고(MOI=5), PBS로 세정 후 배양액 교환을 행하였다. 유전자 도입 후 7일째에 BJ 세포를 MEF 세포 상에 파종하고, 37°C, 5% CO₂인큐베이터 내

에서 1일 배양하고, 다음날 배지를 인간 ES 세포유지 배양액으로 교환하였다. 그 후 하루걸러 배양액을 교환하면서 37°C, 5% CO₂인큐베이터 내에서 배양하고, 유전자 도입 후 27일째에 인간 ES 세포양의 콜로니를 분취하였다(도 8 참조).

[0113] 또한, 건강인의 말초혈 유래 단핵구를 KBM502 배양액 중에 있어서 Dynabeads(등록상표) Human T-Activator Cd3/CD28을 이용하여 자극하고, 37°C, 5% CO₂인큐베이터 내에서 배양하였다. 배양 후 5일째에 세포를 회수하고, MVV를 이용하여 리프로그래밍 인자를 원심법(실온, 1,200×g, 45분)으로 유전자 도입하고, 세포를 다음날 MEF 세포 상에 파종하고 37°C, 5% CO₂인큐베이터 내에서 배양하였다. 배양 시작 후 20일째에 ES 세포양의 콜로니(도 9 참조)를 회수하고, 신선한 MEF 세포 상에 파종하였다.

[0114] BJ 세포로부터 수립한 상기 iPS 세포에 대해서 면역항체염색법 및 RT-PCR법을 실시하고, 미분화 마커의 발현을 확인하였다. 면역항체염색법은 인간 iPS 세포를 4% 파라폼알데하이드-인산완충용액(나카라이테스크사 제품)을 이용해서 4°C에서 30분간 고정하고, 0.1% Triton X-100(나카라이테스크사 제품)으로 처리 후, 5% 탈지유(나카라이테스크사 제품)로 블로킹하였다. 일차 항체로서 항NANOG 항체(R&D사 제품), 항OCT3/4 항체, 항SSEA-4 항체, 항Tra-1-60 항체 및 항Tra-1-81 항체(모두 산타크루즈사 제품)를 이용해서 4°C에서 하룻밤, 이차 항체(anti-goat IgG(라이프 테크놀로지즈사 제품))로, 실온 30분간 염색을 행하였다. 알칼리 포스파타제 염색에는, Alkaline Phosphatase Detection kit(머크 밀리포어(Merck Millipore)사 제품)를 이용하였다.

[0115] RT-PCR법에서는 BJ 세포로부터 수립한 상기 iPS 세포로부터 RNA를 RNeasy mini kit(큐아젠(Quiagen)사 제품)를 이용해서 추출하고, 상보쇄 DNA(cDNA)를 SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR(라이프 테크놀로지즈사 제품)을 이용해서 합성하였다. 그 후, Takara ExTaq polymerase(다카라 바이오사 제품)를 이용해서 증폭 반응을 행하고, 1.5% 아가로스 겔(나카라이테스크사 제품)을 이용해서 전기영동을 행하였다. RT-PCR법에서 이용한 프라이머의 염기서열은, Endo OCT3/4에 대하여 서열번호 3 및 서열번호 4; Endo SOX2에 대하여 서열번호 5 및 서열번호 6; Endo KLF4에 대하여 서열번호 7 및 서열번호 8; EndoMYC에 대하여 서열번호 9 및 서열번호 10; NANOG에 대하여 서열번호 11 및 서열번호 12; TERT에 대하여 서열번호 13 및 서열번호 14; DNMT3B에 대하여 서열번호 15 및 서열번호 16; MV-N 단백질에 대하여 서열번호 17 및 서열번호 18; MV-L 단백질에 대하여 서열번호 19 및 서열번호 20; 그리고 β-ACTIN에 대하여 서열번호 21 및 서열번호 22이다.

[0116] 시험관내 배양체 형성법에 의한 3배엽계 분화유도를 검토하였다. BJ 세포로부터 수립한 상기 iPS 세포를 MEF로부터 ES 세포해리액(Collagenase IV(라이프 테크놀로지즈사 제품), 0.25% 트립신(라이프 테크놀로지즈사 제품) 및 KSR의 혼합액)을 이용하여 해리시키고, 인간 ES 세포유지 배양액 중에 재현탁시키고, 비접착성의 6웰 플레이트에 파종하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 다음날 부유 세포를 회수하고, basic FGF를 첨가하지 않은 인간 ES 세포유지 배양액 중에 재현탁시키고, 37°C, 5% CO₂인큐베이터 내에서 배양하였다.

[0117] 배양 개시 14일째에 세포를 회수하고, 0.25% 트립신/EDTA 혼합액(나카라이테스크사 제품)을 이용해서 세포를 해리시키고, 0.1% 젤라틴 용액(나카라이테스크사 제품)을 이용해서 코팅한 접시에 파종하고, 7일간 37°C에서 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다.

[0118] 면역항체염색법을 이용해서 BJ 세포로부터 수립한 상기 iPS 세포의 3배엽계 분화를 확인하였다. 사용한 항체는 항alpha-fetoprotein 항체(R&D사제), 항vimentin 항체(산타크루즈사 제품) 및 항nestin 항체(산타크루즈사 제품)를 이용하였다.

[0119] BJ 세포로부터 수립한 상기 iPS 세포에 관해서 기형종 형성시험을 행하였다. 1×10⁶개의 iPS 세포를 면역부전마우스(실험동물중앙연구소에서 입수)의 정소 내에 주입하고, 9 내지 13주 후 기형종을 쥐출하였다. 그 후, 20% 포르말린(와코줄야쿠코교사(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 제품)으로 기형종 조직을 고정시키고, 해마 totsilin-애오신 염색을 행하였다. 또한, BJ 세포로부터 수립한 상기 iPS 세포의 핵형 해석을 행하였다(크로모센터사(Chromocenter Inc.) 제품).

[0120] (결과)

[0121] 도 10에 나타내는 바와 같이, 미분화의 세포에서 발현되는 알칼리 포스파타제, NANOG, OCT3/4, SSEA-4, TRA-1-60 및 TRA-1-81의 발현을 iPS 세포에서 확인하였다. RT-PCR법의 결과를 도 11에 나타낸다. iPS 세포의 각 샘플에서는, 유전자 도입한 OCT3/4, SOX2, KLF4 및 L-MYC의 발현이 확인되었다. 또한, 미분화 마커인 NANOG, TERT 및 DNMT3B의 발현도 확인되었다. 한편, 홍역 바이러스 유래의 N 단백질 및 L 단백질의 발현은 보이지 않았다.

또, 상기 iPS 세포의 3배엽계 분화를 확인하였다(도 12 참조).

[0122] 기형종 형성시험 결과, 도 13에 나타내는 바와 같이 3배엽계 분화능이 확인되었다. 이로부터 BJ 세포로부터 수립한 상기 iPS 세포의 다분화능이 나타났다. 해당 iPS 세포는 도 14에 나타낸 바와 같이, 46개의 염색체를 지니고 핵형이 정상이었다.

[0123] (실시예 5: 기저상태의 iPS 세포의 수립과 분화 유도 및 해석)

[0124] 이화학연구소에서 입수한 제대혈 유래 CD34 양성세포를 해동하고, Stemspan에 SCF, TPO, Flt3L을 첨가한 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 다음날, MVV를 이용하여 원심법(실온, 1,200×g, 45분)으로 유전자 도입을 행하고, 상기 배양액에서 2일간 배양하였다. 3일째에 있어서 MEF 세포 상에 파종하고, 4일째에 배양액을 인간 ES 세포유지 배양액으로 교환하였다. 그 후 하루 걸러 배양액을 교환하면서 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양을 계속하였다. 유전자 도입 후 14일째에 있어서 출현한 콜로니(도 15 참조)를 채취하고, 0.25% 트립신/EDTA 혼합용액으로 단세포로 해리시키고, MEF 세포 상에 파종하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다.

[0125] (결과)

[0126] 도 15에 나타내는 바와 같이 기저상태의 iPS 세포를 수립할 수 있었다. 기저상태의 iPS 세포는, 4일 간격으로 0.25% 트립신/EDTA 혼합 용액을 이용해서 단세포까지 해리시켜 계대한 바, Y-27632를 사용하지 않고 10계대 이상에서도 콜로니 형태를 유지할 수 있었다. 또한, 배양액을 인간 ES 세포 유지 배양액으로 교환하고, MEF 세포의 파종 농도를 둑게 함으로써 인간 ES 세포양 콜로니의 출현도 확인할 수 있었다.

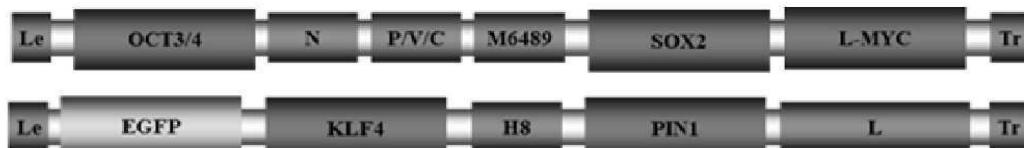
[0127] 본 발명은, 본 발명의 광의의 정신과 범위를 일탈하지 않고서, 다양한 실시형태 및 변형이 가능하게 이루어진 것이다. 또한, 전술한 실시형태는 본 발명을 설명하기 위한 것이며, 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다. 즉, 본 발명의 범위는 실시형태가 아니라 청구범위에 의해 나타난다. 그리고, 청구범위 내 및 그것과 동등한 발명의 의의의 범위 내에서 실시되는 다양한 변형이 본 발명의 범위 내인 것으로 간주된다.

산업상 이용가능성

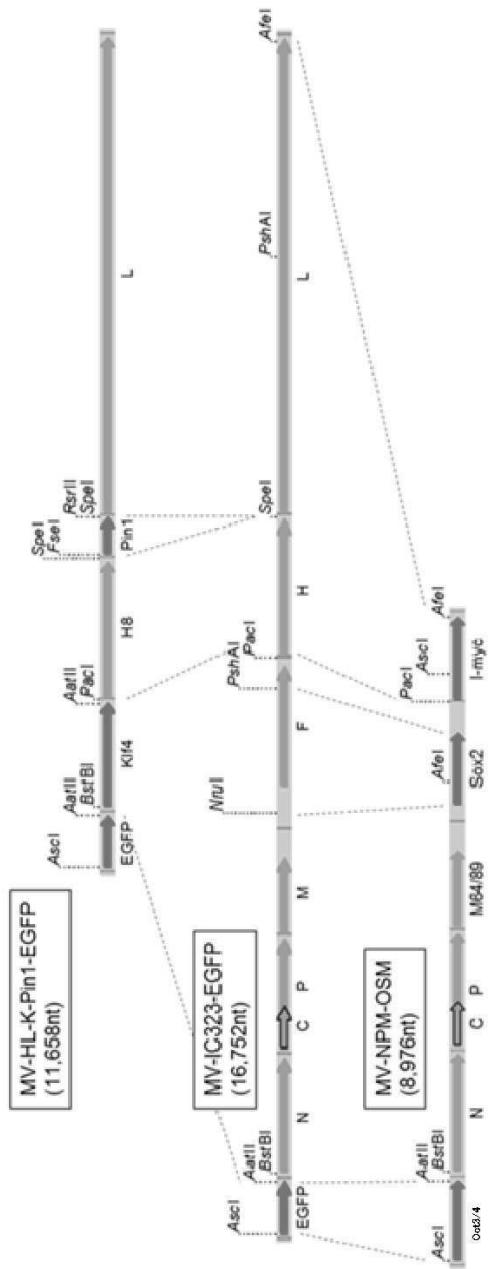
[0128] 본 발명은 혈액 세포에의 유전자 도입을 위한 바이러스 벡터 및 작제물에 적합하다. 이 때문에 본 발명은 면역 요법, 특히 T 세포요법에의 응용이 기대된다. 또한, 본 발명은 다능성 줄기세포의 작제에도 적합하기 때문에, 분화 유도에 의해 얻어지는 조직 세포를 이용한 재생 의료에 더하여, 난치질환 환자 유래의 세포로부터 수립한 iPS 세포를 이용한 질환해석 및 약품개발연구 등에 응용할 수 있다. 또한 혈액 세포를 대상으로 한 게놈편집기술에의 응용도 가능하다.

도면

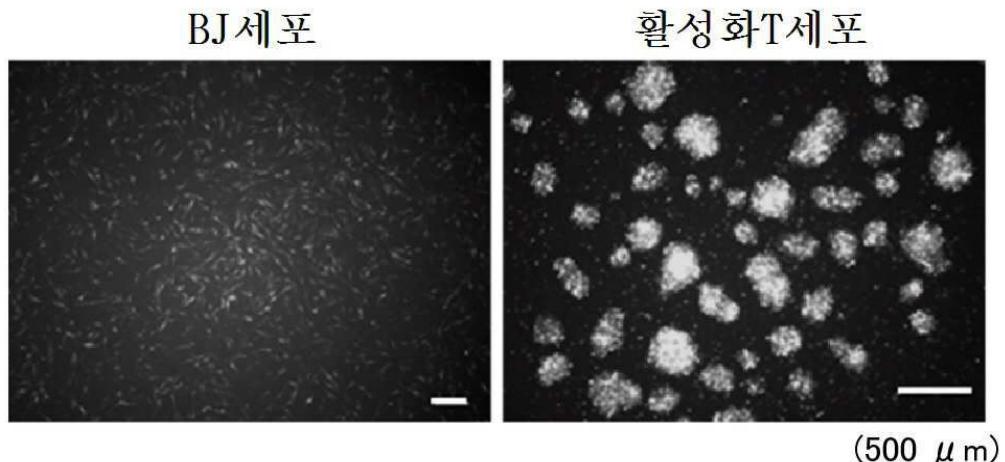
도면1



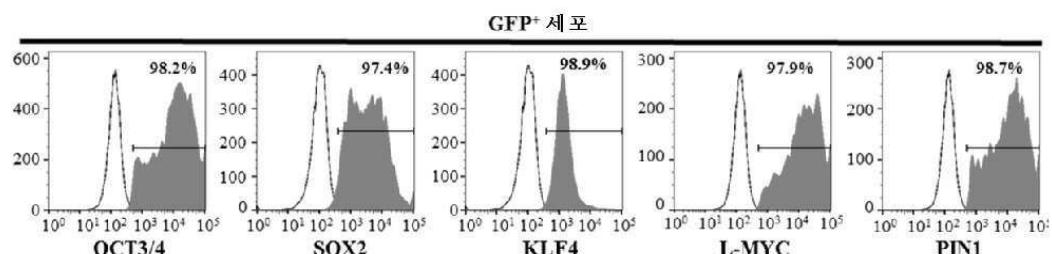
도면2



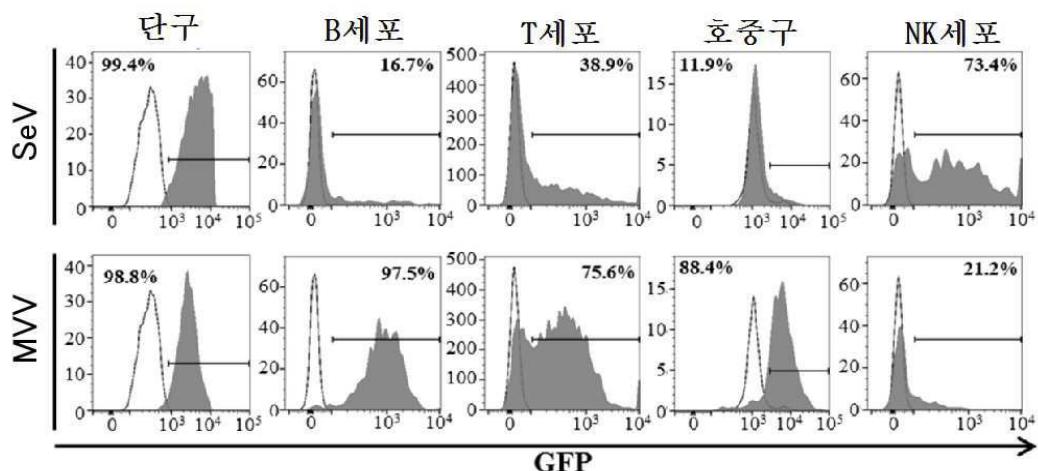
도면3



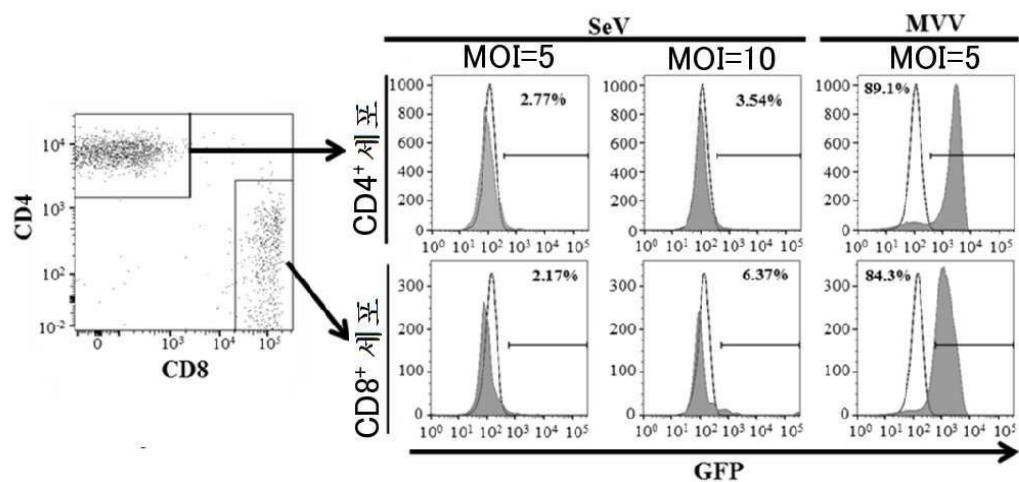
도면4



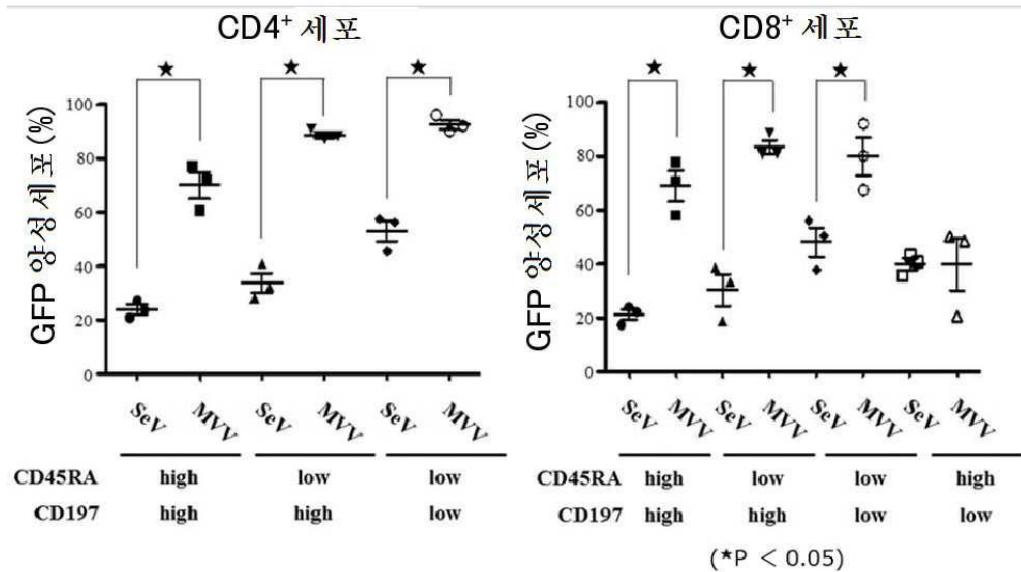
도면5



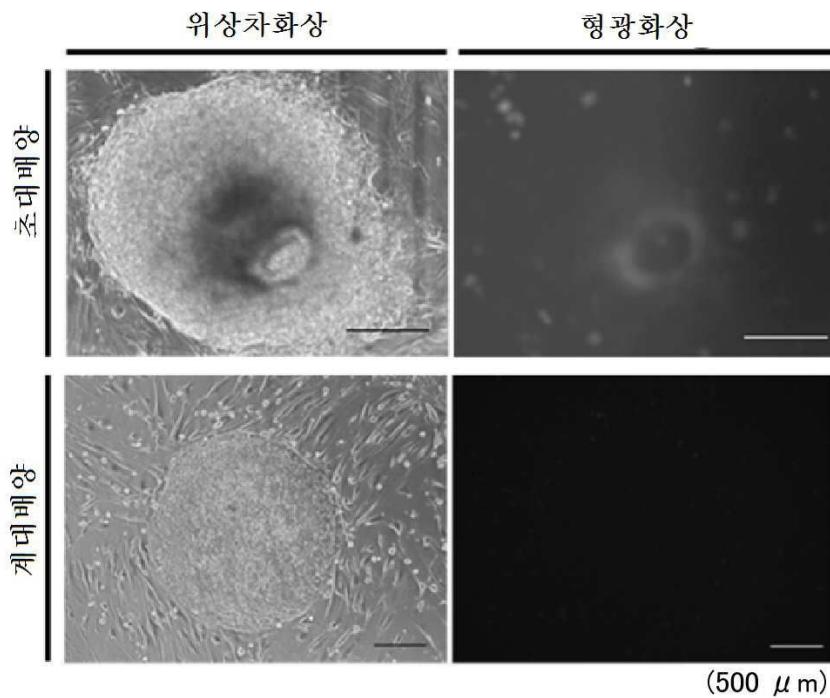
도면6



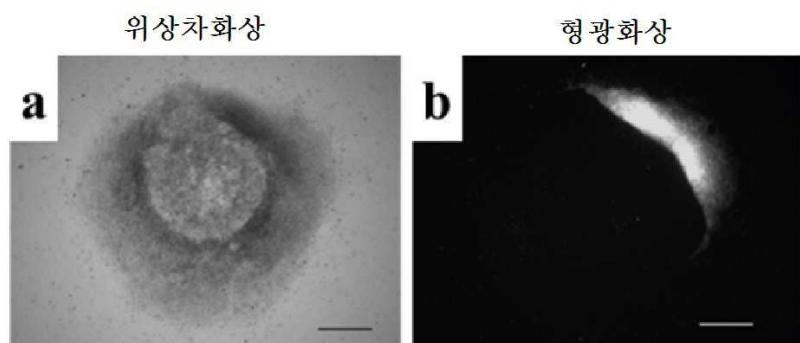
도면7



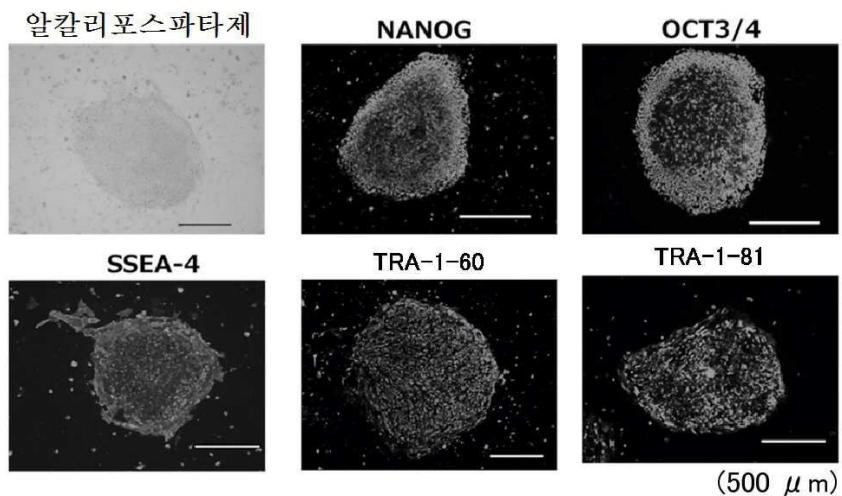
도면8



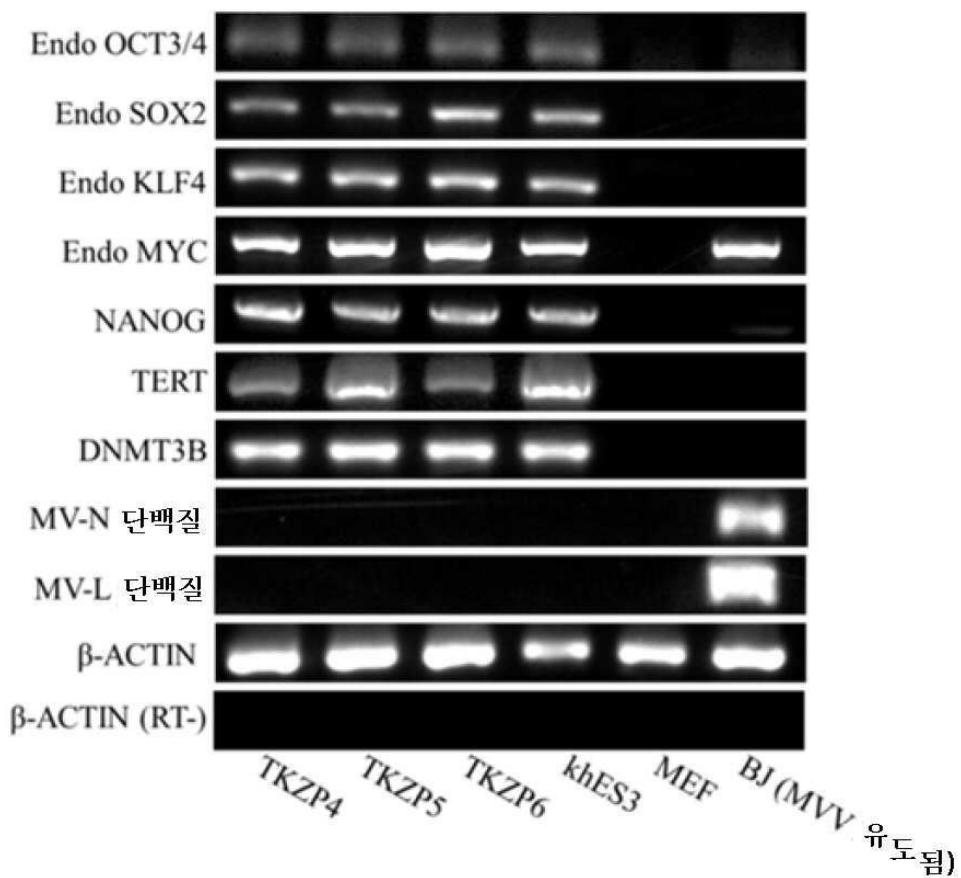
도면9



도면10



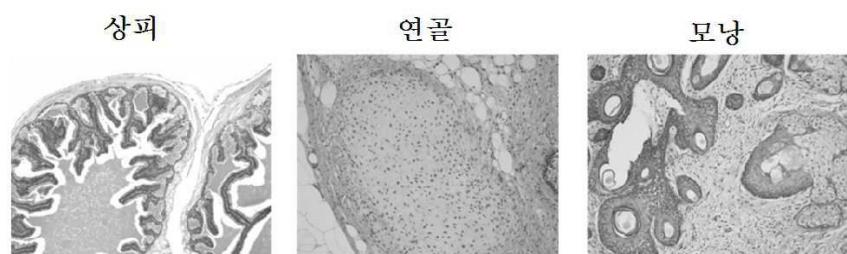
도면11



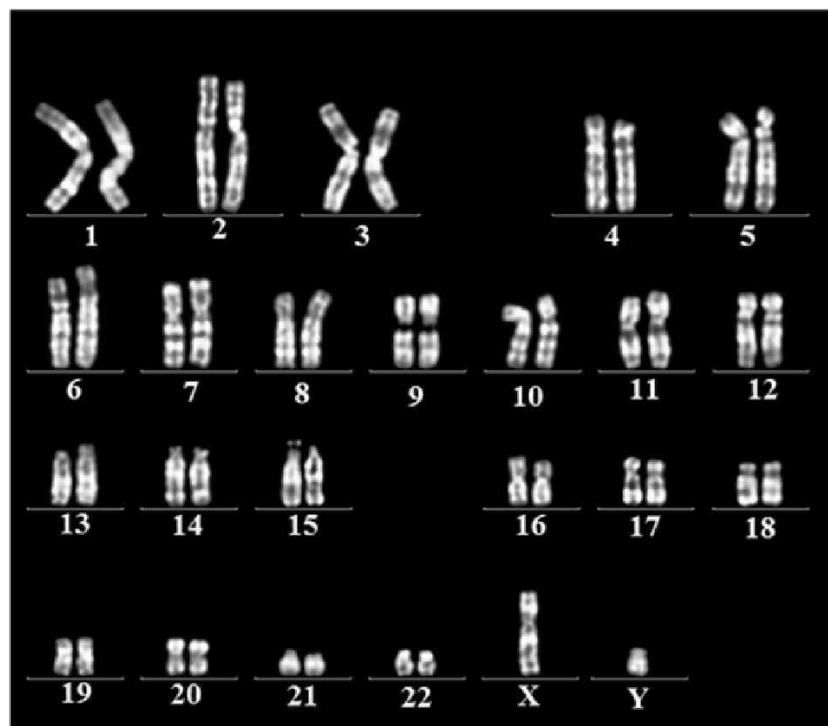
도면12



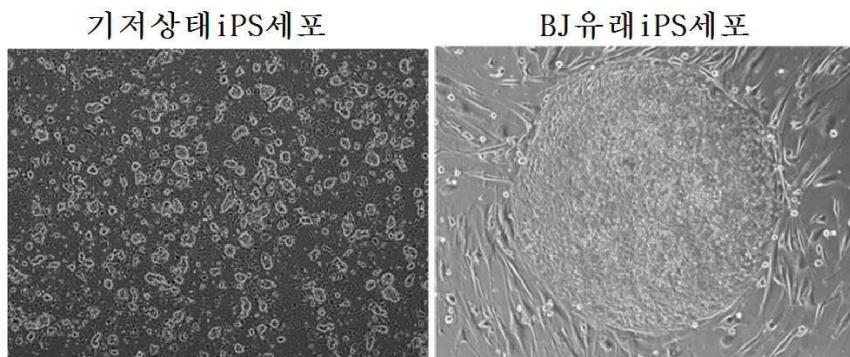
도면13



도면14



도면15



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Kyushu University, National University Corporation

<120> Virus vector, cell, and construct

<130> WO2016/072446

<140> PCT/JP2015/081145

<141> 2015-11-05

<150> JP 2014-225642

<151> 2014-11-05

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8975

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Segment 1 of modified measles virus genome

<400> 1

accaaacaaa gttggtaag gatagatcaa tcaatgatca tattctagta cacttaggt 60

tcaagatcct attatcaggg acaagagcag gattaggat atccgagggc ggcgcattggc 120

gggacacctg gttcgatt tcgccttctc gccccctcca ggtggtgag gtgatggcc 180

agggggccg gagccggct gggttgatcc tcggacctgg ctaagcttcc aaggccctcc 240

tggagggcca ggaatcgggc cgggggttgg gccaggcttct gaggtgtggg ggattcccc 300

atgccccccgg ccgtatgagt tctgtgggg gatggcgta cttggccccc agttggagt 360

ggggctagtg ccccaaggcg gcttggagac ctctcagcct gagggcgaag caggagtgg	420
ggtggagagc aactccgatg gggcctcccc ggagccctgc accgtcaccc ctggtgcgt	480
gaagctggag aaggagaagc tggagcaaaa cccggaggag tcccaggaca tcaaagctct	540
gcagaaaagaa ctgcgacat ttgccaagct cctgaagcag aagaggatca ccctggata	600
tacacaggcc gatgtgggac tcaccctggg ggttctattt gggaaaggat tcaagccaaac	660
gaccatctgc cgcttgagg ctctgcagct tagctcaag aacatgtgt a gctgcggcc	720
cttgctgcag aagtgggtgg aggaagctga caacaatgaa aatcttcagg agatatgca	780
agcagaaacc ctcgtgcagg cccgaaagag aaagcgaacc agtacgaga accgagtgg	840
aggcaacctg gagaatttgt tcctgcagtg cccgaaaccc acactgcagc agatcagcca	900
cattgcccg cagctgggc tcgagaagga tgggtccga gtgtgggtct gtaaccggcg	960
ccagaaggc aagcgatcaa gcagcgacta tgcacaacga gaggatttg aggctgctgg	1020
gtctcccttc tcagggggac cagtgccct tcctctggcc ccagggccccc attttggat	1080
cccaggctat gggagccctc acttcaactgc actgtactcc tgggtccct tccctgaggg	1140
ggaagcctt cccctgtct ctgtcaccac tctgggtct cccatgcatt caaactgata	1200
agacgtcgag aggecgagga ccagaacaac atccgctac cttccatcat ttttataaaa	1260
aacttaggaa ccaggtccac acagccgeca gccaaccaac catccactcc cacgactgga	1320
gttcgaacga gatggccaca cttttggagaa gcttagcatt gttcaaaaga aacaaggaca	1380
aaccacccat tacatcagga tccgggtggag ccatcagagg aatcaaacac attattatag	1440
taccaattcc tggagattcc tcaattacca ctcgatccag actactggac cggtggta	1500
ggtaattgg aaacccggat gtgagcgggc ccaaactaac aggggcacta ataggtat	1560
tatccttatt tggagatctt ccaggtcaat tgattcagag gatcaccat gaccctgacg	1620
ttagcatcag gctgttagag gttgttcaga gtgaccagtc acaatctggc cttacctcg	1680
catcaagagg taccaacatg gaggatgagg cggaccaata ctttcacat gatgatcaa	1740
gcagtagtgta tcaatccagg tccggatggt tcgagaacaa ggaaatctca gatattgaag	1800
tgcaagaccc tgagggattc aacatgattc tgggtaccat tctagcccg atctgggtct	1860
tgctcgaaa ggcgggtacg gccccagaca cggcagctga ttccggacta agaaggtgg	1920
taaagtacac ccaacaaaga agggtagttg gtgaatttag attggagaga aatggttgg	1980
atgtggtagt gaaacaggatt gccgaggacc tctcttacg ccgattcatg gtggctaa	2040
tcctggatata caagaggaca cccgggaaca aacctaggat tgctgaaatg atatgtgaca	2100

ttgatacata tatcgtagag gcaggattag ccagtttat cctgactatt aagttggga	2160
tagaaactat gtatcctgct cttggactgc atgaattgc tggtagtta tccacacttg	2220
agtccctgtat gaatcttac cagcaaatgg gagaaactgc accctacatg gtaatcctag	2280
agaactcaat tcagaacaag ttcaactgcag gatcatacc tctgctctgg agctatgcca	2340
tgggagtagg agtggactt gaaaactcca tgggaggtt gaacttggt cgatctact	2400
ttgatccagc atatttaga ttagggcaag agatggtgag gaggtcagct ggaaaggta	2460
gttccacatt ggcattcgaa ctggtatca ctggcggg tgcaaggctt gttcagaga	2520
ttgcaatgca tactactgag gacaggatca gtagagcggt cgaccacaga caagcccaag	2580
tgtcattct acacggtgat caaagtgaga atgagctacc aggattgggg ggcaaggaag	2640
ataggagggt caaacagggt cggggagaag ccagggagag ctacagagaa accgggtcca	2700
gcagagcaag ttagtgcgaga gctgcccattt ctccaaaccag catgccccta gacattgaca	2760
ctgcattcgaa gtcaggccaa gatccgcagg acagtgcgaa gtcagctgac gcccgtca	2820
ggctgcaagc catggcagga atcttggaa aacaaggctc agacacggac acccctaggg	2880
tatacaatga cagagatctt ctagacttagg tgcgagaggc cgaggaccag aacaacatcc	2940
gcctaccctc catcattgtt ataaaaaact taggaaccag gtccacacag cgccagcca	3000
accaaccatc cactcccacg actggagccg atggcagaag agcaggcacg ccatgtcaaa	3060
aacggactgg aatgcattcg ggctctcaag gcccggccca tggctcact gcccgtcgag	3120
gaagccatgg cagcatggtc agaaatatca gacaacccag gacaggaccg agccacctgc	3180
aaggaagagg aggcaggcag ttgggtctc agcaaaaccat gctctcagc aattggatca	3240
actgaaggcg gtgcacctcg catccgcgtt cagggatctg gagaaagcga tgacgacgct	3300
gaaactttgg gaatcccctc aagaaatctc caggcatcaa gcactgggtt acagtgttat	3360
catgttatg atcacagcgg tgaagcggtt aaggaaatcc aagatgctga ctctatcatg	3420
gttcaatcag gccttgcgtt tgatagcacc ctctcaggag gagacgtatga atctgaaaac	3480
agcgatgtgg atattggcga acctgatacc gagggatatg ctatcactga cggggatct	3540
gctccatct ctatgggtt cagggcttct gatgtgaaa ctgcagaagg agggagatc	3600
cacgagctcc tgaaactcca atccagaggc aacaacttc cgaagctgg gaaaactctc	3660
aatgttcctc cggccggaa ccccgatggc gccagcactt ccgagacacc cattaaaaag	3720
ggcacagacg cgagatggc ctcatttggc acggagatcg cgtcttatt gacaggtgg	3780
gcaacccaaat gtgctcgaaa gtcaccctcg gaaccatcag ggccaggtgc acctgcgggg	3840

aatgtccccg agtgtgtgag caatgccgca ctgatacagg agtggacacc cgaatctggt	3900
accacaatct ccccgagatc ccagaataat gaagaagggg gagactatta ttagtgcgtgag	3960
ctgttctccg atgtccaaga catcaaaaca gccttggcca aaatacacga ggataatcag	4020
aagataatct ccaagctaga atcatgtg ttagtgcagg gagaaggta gtcaattaag	4080
aagcagatca acaggcaaaa tatcagcata tccaccctgg aaggacacct ctcaagcatc	4140
atgattgcca ttccctggact tgggaaggat cccaaacgacc ccactgcaga tgtcgaactc	4200
aatcccgacc tggaaacccat cataggcaga gattcaggcc gagcactggc cgaagttctc	4260
aagaagcccg ttgccagccg acaactccag ggaatgacta atggacggac cagttccaga	4320
ggacagctgc tgaaggaatt tcaactaaag ccgatcgga aaaaggtagt gtcagccgtc	4380
gggtttgttc ctgacaccgg ccctgcatca cgcatgtaa tccgctccat tataaaatcc	4440
agccggctag aggaggatcg gaagcggtac ctgatgactc tccttgatga tatcaaagga	4500
gccaacgatc ttgccaagtt ccaccagatg ctgatgaaga taataatgaa gtagctacag	4560
ctcaacttac ctgccaaccc catgccagtc gacctaatta gtacaaccta aatccattat	4620
aaaaaaactta ggagcaaagt gattgcctcc taagttccac aatgacagag atctacgatt	4680
tcgacaagtc ggcacatggac atcaaagggt cgatcgctcc gatacaacctt accacccata	4740
gtgtatggcag gctgggtgccc caggtcagag tcatagatcc tggtcttaggt gataggaagg	4800
atgaatgctt tatgtacatg tttctgctgg gggttggtaa ggacagcgat cccctaggc	4860
ctccaaatcg gcgagcatc gggccctgc ccttaggtt tggtagatcc acagcaaaac	4920
ccgaggaact cctcaaaagag gccactgagc ttgacatagt tggtagacgt acagcaggc	4980
tcaatgaaaa actgggttca tacaacaaca ccccaactaac cctcctcaca ccttggagaa	5040
aggtcctaacc aacagggagt gtctcaatg caaacaatgt gtcaatgcg gttatctaa	5100
taccgctgga caccccgca aggttccgtt ttgtttat gggcatcacc cgtcttcgg	5160
ataacgggta ttacaccgtt cccagaagaa tgctggatt cagatcggtc aatgcagtgg	5220
ccttcacccct gcttagtgacc ctttaggattt acaaggcgat tggccctggg aagatcatcg	5280
acaatgcaga gcaacttcctt gaggcaacat ttatggtcca catcggaac ttccaggagaa	5340
agaagagtga agtctactct gccgattttt gcaaaatgaa aatcgaaaag atggccctgg	5400
tttttgcaact tggggata gggggcacca gtcttcacat tagaagcaca ggcaaaatga	5460
gcaagactctt ccatgcacaa ctgggttca agaagacccat atgttacccat ctgatggata	5520
tcaatgaaga ccttaatcggtt tttactctggg ggagcagatg caagatgtt agaatccagg	5580
cagttttgca gccatcgatc cctcaagaat tccgcatttta cgacgacgtt atcataatgtt	5640
atgaccaagg actattcaaa gttctgtttaga ccgcagtgcc cagcaatacc cgaaaacgac	5700

ccccctata atgacagcca gaaggcccg aaaaaaaagc cccctccaga agactccacg	5760
gaccaagcga gaggccagcc agcagccgac agcaagtgt gacaccaggc ggccaagca	5820
cagaacagcc ccgacacaag gccaccacca gccatccaa tctgcgtct cctcggtgg	5880
cccccgagga ccaaccccgaa aggtcgctcc gaacacagac caccaaccgc atccccacag	5940
ctcccgaa aggaaccccc agcaactgga aggcccctcc cccctcccc caacgcaaga	6000
accccaacaac cgaaccgcac aagcgaccga ggtgacccaa ccgcaggcat ccgactcctt	6060
agacagatcc tctcccccgg gcatactaaa caaaacttag ggccaaggaa cacacacact	6120
cgacagaacc cagaccccg cccgcggcac cgccggccca ccccccggaaa accagaggaa	6180
cccccaacc aaacccgccc gccccccgg tgcccacagg taggcacacc aaccccgac	6240
cagacccagc acccagccac cgacaatcca agacgggggg ccccccggaaa aaaaaggccc	6300
ccagggcccg acagccagca tcgatgtaca acatgatgga gacggagctg aagccgcgg	6360
ccccgcagca aacttcgggg ggccggccgc gcaactccac cgccggccgc gcccggca	6420
accagaaaaa cagccggac cgcgtcaagc ggccatgaa tgccttcatg gtgtggtccc	6480
gcggcagcg ggcgaagatg gcccaggaga accccaagat gcacaactcg gagatcagca	6540
agcgcctggg cggcggatgg aaactttgtt cggagacgga gaagccggcg ttcatcgacg	6600
aggctaagcg gtcgcgagcg ctgcacatga aggagcaccc ggattataaa taccggcccc	6660
ggcggaaaac caagacgctc atgaagaagg ataagtacac gctgccggc gggctgctgg	6720
ccccggccgg caatagcatg gcgagccggg tcgggtgg cgccggctg ggcgcggcg	6780
tgaaccagcg catggacagt tacgcgcaca tgaacggctg gagcaacggc agctacagca	6840
tgtatgcagga ccagctggc taccgcagc accccggcct caatgcgcac ggccgcgc	6900
agatgcagcc catgcaccgc tacgacgtga gcccctgca gtacaactcc atgaccagct	6960
cgcagaccta catgaacggc tcgcccacct acagcatgtc ctactcgacg cagggcaccc	7020
ctggcatggc tcttggctcc atgggttcgg tggtaagtc cgaggccgc tccagcccc	7080
ctgtggttac ctcttcctcc cactccaggc cgccctgcca ggccggggac ctccggacata	7140
tgtatcagcat gtatctcccc ggccgcggagg tgccggaaacc cgccggccccc agcagacttc	7200
acatgtccca gcactaccag agccggccgg tgccggcac ggccattaac ggcacactgc	7260
ccctctcaca catgtgataa cggctctccc atatcatgg agaggttgaa cgttagggaca	7320
aatctgggaa atgcaattgc taagttggag gatgccaagg aattgttgaa gtcatcgac	7380
cagatattga ggatgtgaa aggttatcg agcactagca tagttacat cctgattgca	7440
gtgtgtctt gagggttgat agggatcccc gcttaatat gttgctgcag gggcgctgt	7500
aacaaaaagg gagaacaagt tggtatgtca agaccaggcc taaagcctga tcttacaggg	7560

acatcaaata cctatgtaa gtcgctctga tcctctacaa ctcttgaac acagattcc	7620
--	------

cacaagtctc ctcttcgtca tcaagcaacc accgcatcca gcatcaagcc cacctgaaat	7680
---	------

tgtctccggc ttccctctgg ccgaacgata tcggtagtta attaaaactt agggtgcaag	7740
---	------

atcatccaca atggactacg actcgatcca gcactattc tacgactatg actgcgggga	7800
--	------

ggattttctac cgctccacgg cgcccagcga ggacatctgg aagaaattcg agctgggtgcc	7860
---	------

atcgcccccc acgtcgccgc cctggggctt gggtccggc gcaggggacc cggccccgg	7920
---	------

gattggtccc ccggagccgt ggcccgagg gtgcaccgga gacgaagcgg aatcccgaaa	7980
--	------

ccactcgaaa ggctgggca ggaactacgc ctccatcata cgccgtgact gcatgtggag	8040
--	------

cggcttctcg gccgggaac ggctggagag agctgtgagc gaccggctcg ctccctggcgc	8100
---	------

gccccggggg aacccggcca aggctccgc cgcccccggac tgcaactccca gcctcgaagc	8160
--	------

cggcaacccg gcgcggcccg cccctgtcg ctggcgaac ccaagaccca ggcctgctcc	8220
---	------

gggtccgaga gcccaagcga ctggagaat gaagaattt atgttgcgat agtagagaag	8280
---	------

aggcagtctc tggatttcg gaagccggc accatcacgg tgccggcaga cccctggat	8340
--	------

ccctgcatga agcattcca catctccatc catcagaac agcacaacta tgctggcg	8400
---	------

tttcctccag aaagctgctc ccaagaagag gcttcagaga ggggtcccca agaagaggtt	8460
---	------

ctggagagag atgctgcagg ggaaaaggaa gatgaggagg atgaagagat tgtgagtccc	8520
---	------

ccacctgttag aaagtggggc tgcccagtc tgccacccca aacctgtcgt ttctgatact	8580
---	------

gaggatgtga ccaagaggaa gaatcacaac ttccctggagc gcaagaggcg gaatgac	8640
---	------

cgttcgcgt tcttggcgt gaggaccag gtgccaccc tggccagctg ctccaaaggcc	8700
--	------

cccaaagtat tgatcctaag caaggccttg gaatacttgc aagccctggat gggggctgag	8760
--	------

aagaggatgg ctacagagaa aagacagctc cgatgccggc agcagcagt gcagaaaaga	8820
--	------

attgcatacc tcaactggcta ctaatagcgc tctgatataa gattaattgg ttgaactccg	8880
--	------

gaaccctaatt cctgccctag gtagtttaggc attatttgcataatattaaa gaaaactttg	8940
--	------

aaaatacgaa gtttctattt ccagctttgt ctgg	8975
---------------------------------------	------

<210> 2

<211> 11658

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Segment 2 of modified measles virus genome

<400> 2

accaaacaaa gttggtaag gatagatcaa tcaatgatca tattctagta cacttagat	60
tcaagatcct attatcaggg acaagagcag gattaggat atccgagggc ggcgcattgt	120
gagcaaggc gaggagctgt tcaccgggt ggtgccatc ctggtcgagc tggacggcga	180
cgtaaacggc cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgcattcca cctacggcaa	240
gctgaccctg aagttcatct gcaccacgg caagctgccc gtgcctggc ccaccctcg	300
gaccaccctg acctacggcg tgcagtgtt cagccgtac cccgaccaca tgaagcagca	360
cgacttcttc aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca tcttcttcaa	420
ggacgacggc aactacaaga cccgcgcga ggtgaagtgc gagggcgaca ccctggtaa	480
ccgcattcgag ctgaaggcga tcgacttcaa ggaggacggc aacatctgg ggcacaagct	540
ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaaggcaga agaacggcat	600
caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgcgcacca	660
ctaccagcag aacacccca tcggcgacgg cccctgtctg ctgcgcacca accactaccc	720
gagcaccctg tccgcctga gcaaagaccc caacgagaag cgcgatcaca tggcctgct	780
ggagttcggt accggcccg ggtactactt cggcatggac gagctgtaca agtaagacgt	840
cgagaggccg aggaccagaa caacatccgc ctaccctcca tcattttat aaaaaactta	900
ggaaccaggc ccacacagcc gccagccaaac caaccatcca ctccacgcac tggagttcga	960
agcagatggc tgcagcgcac ggcgtgtcc catctttctc cacgttcgac tctggcccg	1020
cgggaaggga gaagacactg cgtcaagcag gtgcggaa taaccgtgg cgggaggagc	1080
tctccacat gaagcgactt ccccgactgc ttcccgccg cccctatgac ctggcgccgg	1140
cgaccgtggc cacagacctg gagagcggcg gagccgggtgc ggcttgcggc ggtagcaacc	1200
tggcgccctt acctcgaga gagaccgagg agttcaacga tctctggac ctggacttta	1260
ttctctccaa ttgcgtgacc catcctccgg agtcagtggc cgccaccgtg tcctcgtag	1320
cgtcagcctc ctcttcgtcg tcggcgatcg gcagcggccc tgccagcgcg ccctccaccc	1380
gcagcttcac ctatccgatc cggccggga acgaccggg cgtggcgccg ggcggcacgg	1440
gcggaggcct cctctatggc agggagtcgg ctccctcc gacggctccc ttcaacctgg	1500
cgacatcaa cgacgtgagc ccctcgccg gcttcgtggc cgagctctg cggcagaat	1560
tggacccgggt gtacattccg ccgcagcgc cgcagccgc aggtggcggt ctgtatggca	1620
agttcgtgtcgtc gaaggcgtcg ctgagcggcc ctggcagcga gtacggcagc cggcgggtca	1680
tcagcgtcag caaaggcagc cctgacggca gccaccgggt ggtggcgcc ccctacaacg	1740
gcggccgcgc ggcacgtgc ccaagatca agcaggagc ggtctttcg tgcacccact	1800

tggcgctgg acccccttc agcaatggcc accggccggc tgcacacgac ttccccctgg	1860
ggcggcagct ccccagcagg actacccga ccctgggtct tgaggaagtg ctgagcagca	1920
gggactgtca cccgtccctg ccgcttcctc cgggttcca tccccacccg gggcccaatt	1980
acccatectt cctgcccgt cagatgcagc cgcaagtccc gccgctccat taccagagc	2040
tcatgccacc cggttctgc atgccagagg agcccaagcc aaagagggga agacgatcgt	2100
ggccccggaa aaggaccgcc acccacactt gtgattacgc gggctgcggc aaaacctaca	2160
caaagagttc ccatctcaag gcacacctgc gaacccacac aggtgagaaa ccttaccact	2220
gtgactggga cggctgtgga tggaaattcg cccgctcaga tgaactgacc aggactacc	2280
gtaaacacac gggcaccgc cggttccagt gccaaaaatg cgaccgagca tttccaggt	2340
cgaccaccc cgccttacac atgaagaggc attttaata ggacgtcgag aggccgagga	2400
ccagaacaac atccgcctac gatatcgta gtttaattaa acttagggtg caagatcatc	2460
cacaatgtca ccacaacgag accgaataaa tgccttctac aaagacaacc cacatctaa	2520
gggaagttagg atagttatta acagagaaca tctttagatt gatagacctt atgtttgct	2580
ggctgttcta ttctgtatgt ttctgagtt gatcggttg ctagccattg caggcattag	2640
actccatcgt gcagccatct acaccgcaga gatccataag agcctcagca ccaatctaga	2700
tgtactaac tcgatcgagc atcaggtcaa ggacgtgctg acaccactt tcaagatcat	2760
tggtgatgaa gtggcctga ggacacctca gagattcact gacctagtga aattcatctc	2820
tgacaaaatt aaattcctta atccggatag ggagtacgac ttcagagatc tcacttggtg	2880
tatcaacccg ccagagagaa tcaaattgga ttatgtcaa tactgtgcag atgtggctgc	2940
tgaagaactc atgaatgcat tggtaactc aactctactg gaggccaggg caaccaatca	3000
gttcttagct gtctcaaagg gaaactgctc agggccact acaatcagag gtcaattctc	3060
aaacatgtcg ctgtccctgt tggacttcta tttaagtcta gtttacaatg tgtcatctat	3120
agtcaactatg acatcccagg gaatgtacgg gggacttac ctatgggaa agcctaattct	3180
gagcagtaaa gggcagagt tgtcacaact gagcatgcac cgagtgtttg aagttaggggt	3240
tatcagaaat cgggtttgg gggctccggt gttccatatg acaaactatt ttgagcaacc	3300
agtcaactatg acatcccagg gaatgtacgg gggacttac ctatgggaa agcctaattct	3360
ctgtcacagg gaagattcta tcacaattcc ctatcagggg tcaggaaag gtgtcagctt	3420
ccagctcgta aagcttaggtg tctggaaatc cccaaaccgac atgcgatctt gggccccct	3480
atcaacggat gatccagtga tagataggct ttatctctca tctcacagag gtgttatcgc	3540

tgacaatcaa gcaaaatggg ctgtccgac aacacggaca gatgacaagt tgcaatgga	3600
gacatgcttc cagcaggcgt gtaaggtaa aatacaagca ctctgcgaga atcccgagtg	3660
ggcaccattg aaggataaca ggattccttc atacgggtc ttgtctgtt acctgagtct	3720
gacagtttgc ctiaaaatca aaattgcttc aggattcggg ccattatca cacacggttc	3780
aggatggac ctatacaaaa ccaaccacaa caatgtgtat tggctgacta tcccgccat	3840
gaagaaccta gccttaggtg taatcaacac attggagttt ataccgagat tcaaggttag	3900
tccatatctc ttactgttc caatcaagga agcaggcggc gactgccatg ccccaacata	3960
cctacctgag gaggtggatg gtgatgtcaa actcagttcc aatctggtaa ttctacctgg	4020
tcaggatctc caatatgttt tggcaaccta cgatacttcc agggttgaac atgcgttgtt	4080
ttattatgtt tacagccaa ggcgctcatt ttcttacttt tataccttttta ggttgcctat	4140
aaagggggtc ccaatcaat tacaagtggaa atgcttcaca tgggacaaaaa aactctggtg	4200
ccgtcacttc tgggtgtttt cggactcaga atctgggttca catatcactc actctggat	4260
ggtgggcatg ggagttagtgc gcacagtcac tcggaaatgat ggaaccaatc gcagatagg	4320
ctgccatgtca accgatcaca tggatgttacc cagacatcag gcataccac tagtgtgaaa	4380
tagacatcag aattaagaaa aacgttaggtt ccaagtgggtt tcccggttggc cggccatggc	4440
ggacgaggag aagctgccgc cggctggga gaagcgcattt agccgcagct caggccgagt	4500
gtactacttc aaccacatca ctaacgcccag ccagtgggag cggcccgacg gcaacacgcag	4560
cagttgtggc aaaaacgggc agggggagcc tgccagggtc cgctgttc acctgttgtt	4620
gaagcacagc cagtacggc gcccctcgat ctggccggcag gagaagatca cccggaccaa	4680
ggaggaggcc ctggagactga tcaacggcta catccagaag atcaagtcgg gagaggagga	4740
ctttgagtct ctggcctcac agttcagcga ctgcagctca gccaaggcca ggggagacct	4800
gggtgccttc agcagaggc agatgcagaa gccatttggaa gacgcctcgat ttgcgtgcg	4860
gacggggggag atgagcgggc ccgtgttcac ggattccggc atccacatca tcctccgcac	4920
ttagtgcgg accgacccac tagtgtgaaa tagacatcag aattaagaaa aacgttaggtt	4980
ccaagtgggtt tcccggtatg gactcgctat ctgtcaacca gatcttatac cctgaagttc	5040
acctagatag cccgatagtt accaataaga tagtagctat cctggagttt gctcgagtcc	5100
ctcacgctta cagcctggag gaccctacac tggatgttcaatcatca gacgcctaaaaa	5160
acggattctc caaccaatg attataaaca atgtggaaatgatgcaatcataatc	5220
agcttaggat ttatccggcc cactctcata ttccatatacc aaattgtttt caggattttat	5280
ttaacataga agacaaagag tcaacaagga agatccgtga gtcctaaaaa aaggaaattt	5340
cgctgtactc caaagtcaatgataaggat tccaatgcctt gaggacact aactcacggc	5400

ttggcctagg ctccgaattt agggaggaca tcaaggagaa aattattaac ttgggagttt	5460
acatgcacag ctcccaatgg tttaggcct ttctgtttg gttacagt aagactgaga	5520
tgaggtcagt gattaatca caaaccata ctgccatag gaggagacac acacctgtat	5580
tcttcactgg tagttcagtt gagctgttia tctctcgta ccttgttgcataatcagta	5640
aggaatctca acatgtatat tacctgacgt ttgaacttgtt ttgtatgtat tttgtatgtca	5700
tagaggggag gttaatgaca gagaccgcta tgaccattga tgcttaggtat gcagaacttc	5760
taggaagagt cagatacatg tggaaactga tagatggttt ctccctgca ctcggaaatc	5820
caacttatca aattgttagcc atgctggagc cacttcact tgcttacctg caactgaggg	5880
atataaacgt agaactcaga ggtgcttcc ttaaccactg cttactgaa atacatgatg	5940
ttcttgacca aaacgggttt tctgtatgaag gtacttatca tgagttaattt gaagccctag	6000
attacattt cataactgat gacatacatc tgacagggaa gatttctca ttttcagaa	6060
gtttcgcca cccagactt gaagcagtaa cggctgctga aaatgtcagg aaatacatga	6120
atcagcctaa agtcattgtg tatgagactc tcatgaaagg tcatgccata ttttgtgaa	6180
tcataatcaa cggtatcgt gacaggcagc gaggcagttg gccaccctg accctcccc	6240
tgcattgtgc agacacaatc cgaaatgctc aagcttcagg tgaagggtta acacatgagc	6300
agtgcgttga taactggaaa tcattgtcg gagtgagatt tggctgtttt atgccttta	6360
gcctggacag tcatctgaca atgtacctaa aggacaaggc acttgctgct ctccaaaggg	6420
aatggattc agtttacccg aaagagttcc tgcgttacga tcctccaaag ggaaccgggt	6480
cacggaggct ttagatgtt ttccttaatg attcgagctt tgaccatata gatatgataa	6540
tgtatgtcgt aagtggagcc tacctccatg accctgagtt caacctgtct tacagcctga	6600
aagaaaagga gatcaaggaa acaggttagac ttttcgtttaa aatgacttac aaaatgaggg	6660
catgccaagt gatcgctgaa aatctaattct caaacggat tggcaagttat ttaaggaca	6720
atggatggc caaggatgag cacgatttga ctaaggactt ccacactctg gctgtctcag	6780
gagtccttcaaa agatctcaa gaaagtcaaa gggggggcc agtcttaaaa acctactccc	6840
gaagcccaagt ccacacaatg accaggaacg ttaaaggcaga aaaagggtttt gttagattcc	6900
ctcatgtat tcggcagaat caagacactg atcatccgaa gaatataagaa acctacgaga	6960
cagtcagcgc attatcactg actgatctca agaagtactg ctttaattgg agatatgaga	7020
ccatcagctt atttgcacag aggctaaatg agatttacgg attaccctca tttttcagtt	7080
ggctgcataa gaggcttggaa acctctgtcc tctatgttaa tgaccctcat tgcccccccg	7140
accttgacgc ccatgtcccg ttatgcaaag tcccaatga ccaaatttc atcaagtacc	7200
ctatgggagg tatagaaggg tattgtcaga agctgtggac catcagcacc attccctact	7260

tataacctggc tgcttatgag agccggtaa ggattgctc gtttagtgcaa ggggacaatc	7320
agaccatagc cgtaacaaaaa agggtaccca gcacatggca ttacaacctt aagaaacggg	7380
aagctgctag agtaactaga gattacttg taattcttag gcaaaggcta catgacattg	7440
gccatcacct caaggcaaat gagacaattt tttcatcaca tttttgtc tattcaaaag	7500
gaatatatta tcatggctt cttgttccc aatcactcaa gagcatcgca agatgtgtat	7560
tctggtcaga gactatagtt gatgaaacaa gggcggcatg cagtaatatt gctacaacaa	7620
tggccaaag cattgagaga gtttatgacc gttatctgc atattccctg aacgtcctaa	7680
aagtgataca gcaaattttt atctccctt gcttcacaat caattcaacc atgacccggg	7740
atgttagtcat acccctcctc acaaacaacg atctcttaat aaggatggca ctgtgcccc	7800
ctcctattgg gggatgaat tatctgaata tgagcaggct gttgtcaga aacatcggt	7860
atccagtaac atcatcaatt gctgatctca agagaatgtat tctcgcatca ctaatgcctg	7920
aagagacctt ccatcaagta atgacacaac aaccggggga ctcttcattt cttagactggg	7980
ctagcgaccc ttactcagca aatcttgtat gcgtccagag catcaactaga ctcctcaaga	8040
acataactgc aaggtttgc ctgatccaca gtccaaaccc aatgttaaaa gggttattcc	8100
atgatgacag caaagaagag gacgagagac tggcggcatt cctcatggac aggcattat	8160
tagtacctag ggtagctcat gaaatcctgg atcatagtgt cacagggca agagagtcta	8220
ttgcaggcat gctagataacc acaaaaggcc tgatcgagc cagcatgagg aaggggggt	8280
taacctctcg agtgataacc agattgtcca attatgacta tgaacaattt agagcaggaa	8340
tgggtctatt gacaggaaga aagagaaatg tcctcattga caaagagtca tggtcagtgc	8400
agctggctag agccctaaga agccatatgt gggcaagact agctcgagga cggcctattt	8460
acggccttga ggtccctgtat gtactagaat ctatgcgagg ccaccttatt cggcgtcatg	8520
agacatgtgt catctgcgag tgtggatcag tcaactacgg atggttttt gtccctcg	8580
gttgcact ggatgatatt gacaaggaaa catcatcctt gagagtccca tatattggtt	8640
ctaccactga tgagagaaca gacatgaagc tcgccttgcgt aagagccccca agtagatcct	8700
tgcgatctgc cgttagaata gcaacagtgt actcatggc ttacgggtat gatgatagct	8760
cttggaaacga agcctggttg ttggcaaggc aaaggccaa tgtgagctg gaggagctaa	8820
gggtgatcac tcccatctcg acttcgacta atttagcgcata taggttggagg gatcgtagca	8880
ctcaagtgaa atactcaggt acatcccttgc tccgagtggc aaggatatacc acaatctcca	8940
acgacaatct ctcatttgc atatcagata agaagggttga tactaacttt atataccaac	9000

aaggaatgct tctagggttg ggtgttttag aaacattgtt tcgactcgag aaagatactg	9060
gatcatctaa cacggatttta catcttcacg tcgaaacaga ttgttgcgtg atcccgatga	9120
tagatcatcc caggataccc agctccgcgca agcttagagct gagggcagag ctatgtacca	9180
acccatgtat atatgataat gcacccitaa ttgacagaga tgcacaagg ctatacaccc	9240
agagccatag gaggcacctt gtggatttg ttacatggc cacacccaa ctatatcaca	9300
ttctagctaa gtccacagca ctatctatga ttgacctggt aacaaaattt gagaaggacc	9360
atatgaatga aatttcagct ctcatagggg atgacgatataatagttc ataactgagt	9420
ttctgcttat agagccaaga ttattcacca tctacttggg ccagtgtgca gccatcaattt	9480
gggcatttga tgtacattat catagaccat cagggaaata tcagatgggt gagctgttgt	9540
cttcgttcct ttctagaatg agcaaaggag tggttaaggt gcttgcata gctctaagcc	9600
acccaaagat ctacaagaaa ttctggcatt gtggatttat agagcttacatc catggcctt	9660
cacttgc tcaaaacttg cacacaactg tgtgcaacat ggtttacaca tgctatatga	9720
cctacctcga cctgttggt aatgaagagt tagaagagtt cacatttctt ttgtgtgaaa	9780
gcgatgagga tgtgttaccg gacagattcg acaacatcca ggcaaaacac ttgtgtgttc	9840
tggcagattt gtactgtcaa ccagggaccc gcccaccat tcgaggctta aggccggtag	9900
agaaatgtgc agttctaaccc gatcatatca aggcagaggc taggttatctt ccagcaggat	9960
cttcgtggaa cataaatcca attattgttag accattactc atgtctctg acttatctcc	10020
gtcgaggatc tatcaaacag ataagattga gagttgatcc aggattcatt ttgacgccc	10080
tcgctgaggt aaatgtcagt cagccaaagg tcggcagcaa caacatctca aatatgagca	10140
tcaaggattt cagacctcca cacgatgtatc ttgcaaaattt gctcaaaatgt atcaacacaa	10200
gcaagcacaatcttccatt tcaggggtta gtctgcctaa ttatgaaatc catgcttcc	10260
gcagaatcggtttaactca tctgcttgct acaaagctgt tgagatatac acattaattt	10320
ggagatgcct tgaggccaggga aagacggct tggtttggg tgaggggtcg ggttctatgt	10380
tgtatctta taaggagata ctaaaactaa acaagtgcctt ctataatagt ggggttccg	10440
ccaattcttag atctggtcaa agggaaatttgc caccctatcc ctccgaagtt ggccttgc	10500
aacacagaat gggagtaggt aatattgtca aggtgtctt taacgggagg cccgaagtca	10560
cgtggtagg cagtagat tgcattcaatt tcatagtcag taatatccctt acctctatgt	10620
tgggtttat ccattcagat atagagaccc tacctaacaagataactata gagaagctag	10680
aggaattggc agccatctta tcgatggctc tactccttgg caaaatagga tcaatactgg	10740
tgatataagct tatgccttgc agcggggatt ttgttcaggatttataaagc tatgttaggt	10800
ctcattatag agaagtgaac cttgtctacc ctaggtacag caacttcata tctactgaat	10860

cttatttagt tatgacagat ctc当地gta accggctaa gaatcctgaa aagatcaagc	10920
agcagataat tgaatcatct gtacggactt cacctggact tataaggcac atcctatcca	10980
ttaagcaact aagctgcata caagcaattg tgggaggcgc gtttagtata ggtgatatca	11040
accctattct gaaaaaactt acacctatag agcagggtct gatcaggatgc gggttggcaa	11100

ttaacggacc taaactgtgc aaagaattaa tccaccatga tttgcctca gggcaagatg	11160
gattgcttaa ctctatactc atcctctaca gggagttggc aagattcaaa gacaacaaa	11220
gaagtcaaca agggatgttc cacgcttacc ccgtatttgt aagttagtgg caacgagaac	11280
ttgtatctag gatcactcgc aaattttggg ggcattttct tctttactcc gggacacaa	11340
agttgataaa tcggttatac cagaatctca agtccgtta tctgtacta gacttacacc	11400
agaatatctt cgttaagaat ctatccaagt cagagaaaca gattattatg acggggggtt	11460
taaaacgtga gtgggtttt aaggttaacag tcaaggagac caaagaatgg tacaagttag	11520

tcggatacag cgctctgatt aaggattaa tggttgaact ccggaaacctt aatcctgccc	11580
taggtatcta ggcatttattt gcaatatattt aaagaaaact ttgaaaatac gaagtttcta	11640
ttcccagctt tgtctgg	11658

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer for Endo OCT3/4, S1165

<400> 3

gacaggggga ggggaggagc tagg	24
----------------------------	----

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<

<223> PCR primer for Endo OCT3/4, AS1283

<400> 4

cttccctcca accagttgcc ccaaacc	26
-------------------------------	----

<210> 5

<211> 26

<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> PCR primer for Endo SOX2, S1430	
<400> 5	
gggaaatggg aggggtgcaa aagagg	26
<210> 6	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> PCR primer for Endo SOX2, AS1555	
<400> 6	
ttgcgtgagt gtggatggaa ttggtg	26
<210> 7	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> PCR primer for Endo KLF4, S1128	
<400> 7	
acgatcgtgg ccccgaaaa ggacc	25
<210> 8	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> PCR primer for Endo KLF4, AS1826	
<400> 8	
tgattgtgt gcttctggc tgggctcc	28
<210> 9	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	

<220>

<223> PCR primer for Endo MYC, S253

<400> 9

gcgtcctggg aaggagatc cggagc 26

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer for Endo MYC, AS555

<400> 10

ttgagggca tcgtcgccgg aggctg 26

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer for NANOG, 968S

<400> 11

cagccccgat tcttccacca gtccc 25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer for NANOG, 1334AS

<400> 12

cggaagattc ccagtcgggt tcacc 25

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer for TERT, S3234

<400> 13

cctgctcaag ctgactcgac accgtg

26

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer for TERT, AS3713

<400> 14

gaaaaagctg gccctgggtt ggagc

25

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer for DNMT3B, S2502

<400> 15

tgctgctcac agggccgat acttc

25

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer for DNMT3B, S2716

<400> 16

tccttcgag ctcagtgcac cacaaaac

28

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer for MV-N protein, FW

<400> 17	
gaactcggtatcactgcc	18
<210> 18	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> PCR primer for MV-N protein, RV	
<400> 18	
tcctggtagtcattctc	18
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> PCR primer for MV-L protein, FW	
<400> 19	
cacggattacatttcacg	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> PCR primer for MV-L protein, RV	
<400> 20	
gcatctctgtcaattaaagg	20
<210> 21	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> PCR primer for beta-actin, S756	
<400> 21	
gcaagagatggccacggctgc	21

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer for beta-actin, AS1033

<400> 22

tctccttctg catcctgtcg gc 22