



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년06월14일
(11) 등록번호 10-1041691
(24) 등록일자 2011년06월08일

(51) Int. Cl.

C12N 15/863 (2006.01) A61K 31/70 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-7018165

(22) 출원일자(국제출원일자) 2003년05월14일

심사청구일자 2008년03월24일

(85) 번역문제출일자 2004년11월10일

(65) 공개번호 10-2004-0108798

(43) 공개일자 2004년12월24일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2003/005045

(87) 국제공개번호 WO 2003/097845

국제공개일자 2003년11월27일

(30) 우선권주장

PA200200752 2002년05월16일 덴마크(DK)

PA200200753 2002년05월16일 덴마크(DK)

(56) 선행기술조사문헌

WO1998013500 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 41 항

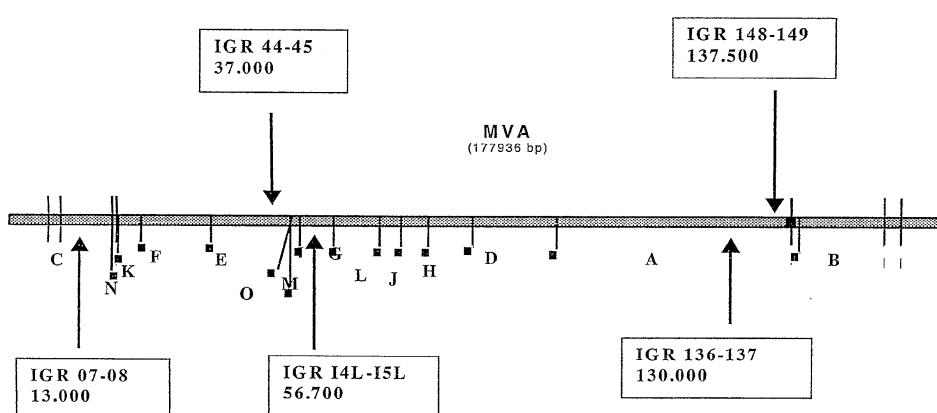
심사관 : 문동현

(54) 변형 백시니아 바이러스 안카라(MVA)의 계놈내삽입부위로서의 유전자내 영역

(57) 요 약

본 발명은 외인성 서열을 MVA 바이러스 계놈내로 통합하는데 유용한 신규한 삽입부위에 관한 것이다. 본 발명은 외인성 DNA를 계놈내로 삽입하기 위한 플라스미드 벡터를 또한 제공하는 것이다. 또한, 본 발명은 상기 신규한 삽입부위내로 삽입되는 외인성 DNA 서열을 포함하는 재조합 MVA를 의약 또는 백신으로서 제공한다.

대 표 도 - 도6



특허청구의 범위

청구항 1

변형된 백시니아 안카라 바이러스(Modified Vccinia viurs Ankara, MVA) 계놈의 유전자내 영역(IGR)내에 삽입된 이종성(heterologous) DNA 서열을 포함하는 재조합 MVA.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 이종성 DNA 서열이 007R-008L, 018L-019L, 044L-045L, 064L-065L, 136L-137L, 148R-149L을 포함하는 그룹으로부터 선택된 2개의 인접한 오픈 리딩 프레임(ORF) 사이의 IGR내로 삽입된 MVA.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 이종성 DNA 서열이 하나 이상의 코딩 서열을 포함하는 MVA.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 이종성 DNA 서열이 하나 이상의 단백질, 폴리펩티드, 웨티드, 외래항원 또는 항원성 항원 결정기를 암호화하는 MVA.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 이종성 DNA 서열이 뎅기 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 면역 결핍 바이러스 또는 이들의 조합으로부터 유래된 MVA.

청구항 6

제 5항에 있어서, 뎅기 바이러스로부터 유래된 상기 이종성 DNA 서열이 NS1 및 PrM을 포함하는 그룹으로부터 선택된 MVA.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 NS1 유전자가 ORF 064L-065L 사이의 IGR내로 삽입된 MVA.

청구항 8

제 6항 또는 제 7항에 있어서, 상기 PrM 유전자가 4개의 뎅기 바이러스 혈청형중 하나 이상의 혈청형으로부터 유래된 MVA.

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 PrM 유전자가 007R-008L, 044L-045L, 136L-137L, 148R-149L을 포함하는 그룹으로부터 선택된 ORF 사이의 IGR내로 삽입된 MVA.

청구항 10

제 5항에 있어서, 상기 면역결핍 바이러스에서 유래된 상기 이종성 DNA 서열이 HIV env를 암호화하는 MVA.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 HIV env 유전자가 ORF 007R-008L 사이의 IGR내로 삽입된 MVA.

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 MVA가 ECACC에 기탁번호 V00083008로 기탁된 MVA.

청구항 13

제 1항에 있어서, 의약, 백신 또는 둘 모두로 사용하기 위한 MVA.

청구항 14

제 1항에 기재된 MVA를 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합함을 포함하여 의약, 백신 또는 둘 모두를 제조하는 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 의약, 백신 또는 둘 모두가 감염성 질환 또는 중식성 질환의 치료, 예방 또는 둘 모두를 위해 제조되는 방법.

청구항 16

제 1항에 기재된 MVA를 포함하는 백신.

청구항 17

제 1항에 기재된 MVA 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 보조제, 첨가제 또는 이들의 조합물을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 18

제 1항에 기재된 MVA, 제 16항에 기재된 백신, 제 17항에 기재된 조성물 또는 이들의 조합물을 사람을 제외한 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 사람을 제외한 동물의 생체에서 면역반응에 영향을 미치는 방법.

청구항 19

- 제 1항에 기재된 재조합 MVA로 숙주세포를 감염시키는 단계,
- 상기 감염된 숙주세포를 적절한 조건하에서 배양시키는 단계,
- 상기 배양된 숙주세포에 의해 생성된 폴리펩티드, 단백질, 웨프티드, 항원, 항원성 결정기, 바이러스 또는 이들의 조합물을 분리, 농축, 또는 분리 및 농축시키는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드, 항원 또는 항원성 결정기를 제조하기 위한 방법.

청구항 20

시험관 내에서 DNA 서열을 세포내로 도입하는 방법으로서,

상기 DNA 서열이 상기 세포의 게놈에 동종, 이종 또는 둘 모두이며,

상기 세포가 제 1항에 기재된 MVA에 의해 감염된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 20항에 있어서, 상기 감염된 세포가 후속적으로 사람을 제외한 동물 생체에 투여되는 방법.

청구항 22

DNA 서열을 사람을 제외한 동물의 생체에 도입하는 방법으로서,

상기 DNA 서열이 상기 동물의 게놈에 동종, 이종 또는 둘 모두이며, 제 1항에 기재된 MVA, 제 16항에 기재된 백신, 제 17항에 기재된 조성물 또는 이들의 조합물을 사람을 제외한 동물에게 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 1항에 기재된 MVA를 포함하는 세포.

청구항 24

- a) IGR 서열을 포함하는 DNA 서열로서, 상기 IGR 서열이 MVA 게놈의 2개의 인접한 ORF 사이에 위치하는, DNA 서열;

- b) MVA 게놈의 2개의 인접한 ORF의 IGR 측면 서열을 포함하는, DNA 서열; 및
- c) 상동성 재조합을 통하여 MVA 게놈의 IGR 내로 MVA 바이러스의 게놈에 이종성인 DNA 서열("이종성 서열")의 삽입을 유도하는, DNA 서열:을 포함하는 군에서 선택된 DNA 서열, 및
- 이종성 서열을 포함하는, MVA에서 유래된 플라스미드 벡터.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

제 24항에 있어서, 상기 IGR 서열이 007R-008L, 018L-019L, 044L-045L, 064L-065L, 136L-137L, 148R-149L을 포함하는 그룹으로부터 선택된 ORF 사이의 IGR로부터 유래된 플라스미드 벡터.

청구항 28

제 24항 또는 제 27항에 있어서, 상기 IGR 서열이 하기의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하는 플라스미드 벡터:

- 서열번호 32의 527-608;
- 서열번호 33의 299-883;
- 서열번호 34의 339-852;
- 서열번호 35의 376-647;
- 서열번호 36의 597-855; 및
- 서열번호 37의 400-607.

청구항 29

제 24항에 있어서, 상기 2개의 인접한 ORF의 IGR 측면 서열이 007R-008L, 018L-019L, 044L-045L, 064L-065L, 136L-137L, 148R-149L을 포함하는 그룹으로부터 선택된 플라스미드 벡터.

청구항 30

제 24항에 있어서, 상기 2개의 인접한 ORF의 IGR 측면 서열이 하기 뉴클레오티드 서열을 포함하는 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하는 플라스미드 벡터:

- 서열번호 32의 1-526 및 609-1190;
- 서열번호 33의 101-298 및 884-1198;
- 서열번호 34의 1-338 및 853-1200;
- 서열번호 35의 1-375 및 648-1200;
- 서열번호 36의 1-596 및 856-1200; 및
- 서열번호 37의 1-399 및 608-1081.

청구항 31

제 24항에 있어서, 상기 DNA 서열이 ECACC에 기탁번호 V00083008로 기탁된 MVA 게놈의 IGR내로 상기 이종성 서열의 삽입을 유도하는 플라스미드 벡터.

청구항 32

- 제 24항에 기재된 플라스미드 벡터로 세포를 형질감염시키는 단계;
- 형질감염된 세포를 MVA로 감염시키는 단계;
- 제 1항에 기재된 MVA를 확인 및 분리하는 단계를 포함하는 제 1항에 기재된 MVA의 제조방법.

청구항 33

제 32항에 있어서, 상기 세포가 ECACC에 기탁번호 V00083008로 기탁된 MVA로 감염되는 제조방법.

청구항 34

- MVA 바이러스의 계놈에 이종성인 DNA 서열(“이종성 서열”)을 상동성 재조합(homologous recombination)을 통하여 MVA 계놈의 2개의 인접한 ORF 사이에 위치한 IGR내로 삽입을 유도하는 DNA 서열, 및
- 이종성 서열을 포함하는 DNA.

청구항 35

제 34항에 있어서, 상동성 재조합을 통하여 MVA 계놈의 IGR내로 이종성 서열의 삽입을 유도하는 상기 DNA 서열이 상기 MVA 계놈의 상기 IGR 서열에 상동인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, DNA.

청구항 36

제 34항 또는 제 35항에 있어서, MVA 계놈의 IGR내로 이종성 서열의 삽입을 유도하는 상기 DNA 서열이 2개의 인접한 ORF의 IGR 측면 서열을 포함하는, DNA.

청구항 37

제 34항에 있어서, 상기 IGR 서열이 007R-008L, 018L-019L, 044L-045L, 064L-065L, 136L-137L, 148R-149L을 포함하는 그룹으로부터 선택된 ORF 사이의 IGR로부터 유래된 것인, DNA.

청구항 38

제 34항에 있어서, 상기 IGR 서열이 하기 뉴클레오티드 서열을 포함하는 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하는, DNA:

- 서열번호 32의 527-608;
- 서열번호 33의 299-883;
- 서열번호 34의 339-852;
- 서열번호 35의 376-647;
- 서열번호 36의 597-855; 및
- 서열번호 37의 400-607.

청구항 39

제 34항에 있어서, 상기 2개의 인접한 ORF 사이의 IGR 측면 서열이 007R-008L, 018L-019L, 044L-045L, 064L-065L, 136L-137L, 148R-149L을 포함하는 그룹으로부터 선택된 것인, DNA.

청구항 40

제 34항에 있어서, 상기 2개의 인접한 ORF 사이의 IGR 측면 서열이 하기 뉴클레오티드 서열을 포함하는 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하는, DNA:

- 서열번호 32의 1-526 및 609-1190;
- 서열번호 33의 101-298 및 884-1198;
- 서열번호 34의 1-338 및 853-1200;

- 서열번호 35의 1-375 및 648-1200;
- 서열번호 36의 1-596 및 856-1200; 및
- 서열번호 37의 1-399 및 608-1081.

청구항 41

제 34항에 있어서, MVA 계놈의 IGR내로 이종성 서열의 삽입을 유도하는 상기 DNA 서열이 ECACC에 기탁번호 V00083008로 기탁된 것인, DNA.

청구항 42

숙주 세포를 제 1항에 기재된 재조합 MVA로 감염시키고,
적합한 조건에서 상기 감염된 숙주 세포를 배양한 다음,
상기 숙주 세포에 의해 생산된 바이러스를 수집하는 단계를 포함하는 제 1항에 기재된 재조합 MVA를 생산하는 방법.

청구항 43

제 24항에 기재된 플라스미드 벡터를 생산하는 방법으로서, 제34항에 기재된 DNA를 벡터내로 클로닝(cloning)시키는 방법.

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 외인성 DNA 서열을 MVA 계놈내로 통합하는데 유용한 새로운 삽입부위에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

변형 백시니아 바이러스 안카라(MVA)는 오르쏘폭스바이러스 속(*Orthopoxvirus*)의 하나이며 백시니아 바이러스의 안카라 균주(CVA)의 닦 배아 섬유아세포상에서 약 570회의 연속적인 계대배양과정에 의해 생성되어져 왔다 (Mayr, A., 등. [1975], *Infection* 3, 6-14 참조). 이러한 과정의 결과로, 생성 MVA 바이러스는 CVA와 비교할 때 31 킬로베이스가 채 안되는 계놈 정보를 함유하고 있으며 숙주세포가 제한된다(Meyer, H. 등 J. Gen. Virol. 72, 1031-1038[1991]). MVA는 극도의 약화, 즉 감소된 독성 또는 감염성을 갖지만 여전히 뛰어난 면역원성을 갖는 것을 특징으로 한다. 다양한 동물 모델에서 시험될 때, MVA는 면역-억제된 개체에서도 독성이 없는 것으로 입증되었다. 더 중요하게는, MVA 균주의 우수한 특성은 광범위한 임상실험으로 입증되었다(Mayr 등., Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Org. B 167, 375-390[1987]). 고위험 환자를 포함한 120,000명의 사람에 대한 이들 연구 도중에, 어떠한 부작용도 나타나지 않았다(Stickl 등., Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392[1974]).

[0003]

포유류의 세포에서 바이러스 복제주기의 후기 단계에서 MVA가 폐쇄된다는 것이 또한 발견되었다(Sutter, G. and Moss, B. [1992] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10847-10851). 따라서, MVA는 그 DNA 및 유전자를 충분히 복제하고, 초기, 중기 및 후기 유전자 산물을 합성하지만, 감염된 세포로부터 방출될 수 있는 성숙 감염성 비리온을 합성할 수는 없다. 이러한 이유로 즉, 복제 제한됨으로 인하여 MVA는 유전자 발현 벡터로 작용하도록 제안되어 있다.

[0004]

최근에는, MVA는 티미딘-키나아제(tk) 유전자(US 5,185,146)의 부위 또는 MVA 계놈내의 천연산출 결실 부위 (PCT/EP96/02926)에 삽입되는 항원성 서열을 발현하는 재조합 백신을 생성하는데 사용되었다.

[0005]

tk 삽입 유전자 좌가 재조합 수두바이러스, 특히 재조합 백시니아 바이러스를 생성하는데 널리 사용되어지나 (Mackett, 등. [1982] P.N.A.S.USA 79, 7415-7419), 이 기술은 MVA에 대해서는 적용할 수 없다. MVA가 재조합 수두 바이러스의 생성에 사용될 수 있는 다른 수두 바이러스와 비교할 때, 계놈의 변형에 더욱더 민감하다는 것이 Scheiflinger 등에 의해 밝혀졌다. Scheiflinger 등은 특히 이종성 DNA를 수두 바이러스 계놈내로 통합하기 위해 가장 흔하게 사용되는 부위 중 즉, 티미딘 키나아제(tk) 유전자 좌는 재조합 MVA를 생성하는데 사용될 수 없다는 것을 보여주었다. 임의의 생성된 tk(-) 재조합 MVA는 매우 불안정하며 정제시에 MVA의 계놈 DNA의 일부화 함께 삽입 DNA를 즉시 결실시킨다(Scheiflinger 등. [1996], Arch Virol 141 : pp 663-669).

[0006]

계놈 재조합 불안정성 및 그에 따른 높은 가능성은 수두 바이러스학에서 공지된 문제이다. 실제로, MVA는 조직 배양 세포에서 시험관에서 증식될 때 CVA의 바이러스 계놈은 불안정하다는 사실을 이용하는 장기간의 계대배양 과정 중에 확립되었다. 수천개의 뉴클레오티드(31kb)가 MVA 계놈으로부터 결실되어지므로, 원래 CVA 계놈과 비교할 때, 6개의 주요 결실 및 수많은 작은 결실을 특징으로 한다.

[0007]

MVA 계놈의 계놈 구성은 최근에 개시되어졌다(Antoine 등. [1998], *Virology* 244, 365-396). MVA의 178kb 계놈은 조밀하게 팩킹되어져 있으며 63개 이상 아미노산 길이의 단백질을 암호화하는 193개의 개별적인 오픈 리딩

프레임(ORF)을 포함한다. 감염성이 매우 높은 바리올라(Variola) 바이러스 및 백시니아 바이러스의 원형 즉, 코펜하겐(Copenhagen) 균주와 비교할 때, MVA의 ORF 대부분은 단편화되거나 또는 끝이 잘리게 된다(An내지ine 등. [1998], *Virology* 244, 365-396). 그러나, 극히 드문 예를 제외하고 단편화되거나 끝이 잘린 ORF를 포함한 모든 ORF는 전사되어 단백질로 번역된다. 하기에서는 Antoine 등의 명명법이 사용되며 적절하게는 Hind III 제한 효소 분해물을 기본으로 하는 상기 명명법 또한 표시되어 있다.

[0008] 지금까지, 외인성 DNA를 MVA 게놈의 천연산출 결실부위내로 삽입하는 것만이 안정한 재조합 MVA를 유도할 수 있었다(PCT/EP96/02926). 불행하게도 MVA 게놈내에는 제한된 수의 천연산출 결실부위만이 있다. 추가적으로, 예를 들면, tk 유전자 좌와 같은 다른 삽입부위는 재조합 MVA의 발생에 전혀 유용하지 않는 것으로 나타났다 (Scheiflinger 등. [1996], *Arch Virol* 141 : pp 663-669).

발명의 상세한 설명

발명의 목적

[0010] 본 발명의 목적은 MVA 게놈의 추가 삽입부위를 확인하고 상기 새롭게 확인된 MVA 게놈의 삽입부위내로 외인성 DNA 서열의 삽입을 유도(direction)하는 삽입벡터를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 목적은 또한 MVA 게놈의 신규한 삽입부위내로 안정하게 통합되는 외인성 DNA 서열을 포함하는 재조합 MVA를 제공하는 것이다.

발명의 상세한 설명

[0013] 본 발명의 발명자들은 외인성 DNA 서열을 변형 백시니아 안카라(MVA) 바이러스의 게놈내로 삽입하기 위한 신규한 부위를 확인하였다. 이 신규한 삽입부위는 바이러스 게놈의 유전자내 영역(IGR)에 위치하고 있으며, 상기 IGR은 차례로 MVA 게놈의 두개의 인접한 오픈 리딩 프레임(ORF) 사이에 위치해 있거나 또는 두개의 인접한 오픈 리딩 프레임(ORF)의 측면에 위치되어 있다.

[0014] 따라서, 본 발명은 바이러스 게놈의 IGR내로 삽입되는 이종성 DNA 서열을 포함하는 재조합 MVA에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 하나 이상의 외인성 DNA 서열은 하나 이상의 IGR내로 삽입될 수 있다.

[0015] MVA 게놈의 IGR내로 삽입되는 외인성 DNA 서열은 실제로 안정하다는 것이 놀랍게도 발견되었다: 상기에서 이미 언급한 바와 같이, MVA의 게놈은 매우 불안정한 것으로 간주되어졌다. 바이러스의 증식에 비필수적인 유전자 또는 DNA 서열은 결실되거나 단편화되는 것처럼 보인다. 안정한 재조합 MVA는, 이종성 DNA 서열이 MVA 게놈의 천연산출 결실부위내로 삽입될 때 얻어진다는 것이 놀랍게도 발견되었지만(PCT/EP96/02926), 반면에 다른 수두 재조합 바이러스의 발생에 널리 사용되는 예를 들면, tk-유전자 좌와 같은 숙주 범위 유전자는 MVA내에 적절한 삽입부위가 없다는 것이 밝혀졌다. Vero-MVA가 한개의 여분의 게놈 결실을 갖고 있다는 사실(PCT/EP01/02703)은 증식에 필요하지 않는 유전자를 즉시 결실시키는 의미에서 게놈이 역동적이라는 것을 또한 시사한다. 따라서, 바이러스의 증식에 비필수적인 이종성 DNA 서열을 ORF의 공간내로 삽입하는 것은 마찬가지로 바이러스에 의해 결실되어진다는 결론에 이를 수 있다.

[0016] ORF의 뉴클레오티드 서열이 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을 형성하는 아미노산 서열을 암화화하는 반면, 두 개의 ORF간의 IGR은 코딩 능력이 없으나 바이러스 유전자 발현의 전사적 조절에 필수적이거나 또는 관여하는 조절요소, 결합부위, 프로모터 및/또는 인핸서 서열을 포함할 수 있다. 따라서, IGR은 바이러스 생활환의 조절에 관여한다. 그러나, 본 발명의 발명자들은 신규한 삽입부위가 MVA의 전형적인 특징 및 유전자 발현에 영향을 주거나 변화시키지 않고 외인성 DNA 서열이 MVA 게놈내로 안정적으로 삽입될 수 있다는 예기치 못한 이점을 갖고 있음을 또한 보여주었다. ORF 또는 MVA의 코딩 서열이 변경되지 않기 때문에, 신규한 삽입부위는 특히 유용하다.

[0017] 또한, IGR내로 삽입된 외래 유전자의 발현 양은 MVA 게놈의 결실부위내로 삽입된 외래 유전자의 발현 양보다 더 높다는 것이 놀랍게도 발견되었다(실시예 1 참조).

[0018] ORF의 뉴클레오티드 서열은 규칙적으로 개시코돈으로 시작하여 정지코돈으로 끝난다. 두개의 인접한 ORF의 방향에 따라 이들 ORF간의 영역인 IGR은 두개의 인접한 ORF의 두개의 정지코돈 사이에 또는 2개의 인접한 ORF의 2개의 개시코돈 사이에, 또는 첫번째 ORF의 정지코돈과 두번째 ORF의 개시코돈 사이에, 또는 첫번째 ORF의 개시코돈과 두번째 ORF의 정지코돈 사이에 위치된다.

[0019] 따라서, 외인성 DNA 서열의 IGR내 삽입부위는 첫번째 ORF의 정지코돈의 하류 또는 3'일 수 있다. 두번째 ORF로

또한 불리는 인접한 ORF가 첫번째 ORF와 같은 방향을 갖는 경우, 첫번째 ORF의 정지코돈의 삽입부위 하류는 두 번째 ORF의 개시코돈의 상류 또는 5'에 위치한다.

[0020] 두번째 ORF가 두개의 인접한 ORF의 방향이 서로를 향하는 것을 의미하는 첫번째 ORF와 반대 방향을 갖는 경우, 삽입부위는 양쪽 ORF의 정지코돈의 하류에 위치한다.

[0021] 3번째 대안으로, 두개의 인접한 ORF가 반대 방향을 나타내지만 두개 ORF의 개시코돈이 서로에 대해 인접해 있는 것을 특징으로 하는 위치와 동의어인 두개의 인접한 ORF의 방향이 서로로부터 떨어져 있는 경우, 외인성 DNA는 관련된 양쪽 개시코돈에 대하여 상류에 삽입된다.

[0022] MVA게놈내의 ORF는 두개의 코딩 방향에서 발생한다. 그 결과, 폴리미라아제 활성은 왼쪽으로부터 오른쪽으로 즉, 정방향으로 생기며, 대응해서 오른쪽으로부터 왼쪽으로(역방향) 생긴다. 이는 수두 바이러스학에서 일반적이며 게놈의 상이한 HindIII 제한 분해 단편상의 이들의 방향 및 위치에 의해 ORF를 확인하는 백시니아 바이러스에 대한 표준 분류가 되었다. 명명법에 있어서, 상이한 HindIII 단편은 이들의 하향하는 크기에 대응하는 하향하는 대문자에 의해 명명된다. ORF는 각 HindIII 단편상에서 왼쪽으로부터 오른쪽으로 번호가 매겨지며 ORF의 방향은 대문자 L(오른쪽으로부터 왼쪽으로의 전사를 의미함) 또는 R(왼쪽으로부터 오른쪽으로의 전사를 의미함)에 의해 표시되어 진다. 부가적으로, 상이한 명명법을 이용하는 MVA 게놈 구조가 최근에 공개되었는데, 게놈의 왼쪽으로부터 오른쪽 말단으로 단순하게 ORF 번호를 매기고 대문자 L 또는 R을 사용하여 이들의 방향을 나타낸다(Antoine 등. [1998], Virology 244, 365-396). 일례로서, 구 명명법에 따른 I4L ORF는 Antoine 등에 따른 064L ORF에 대응한다. 다르게 표시되지 않는 한, 본 발명은 Antoine 등에 따른 명명법을 사용한다.

[0023] 본 발명에 따르면, 이종성 DNA 서열은 하기를 포함하는 그룹으로부터 선택된 두개의 인접한 ORF 사이의 하나 이상의 IGR내로 삽입되어 질 수 있다:

[0024] 001L-002L, 002L-003L, 005R-006R, 006L-007R, 007R-008L,

[0025] 008L-009L, 017L-018L, 018L-019L, 019L-020L, 020L-021L,

[0026] 023L-024L, 024L-025L, 025L-026L, 028L-029L, 030L-031L,

[0027] 031L-032L, 032L-033L, 035L-036L, 036L-037L, 037L-038L,

[0028] 039L-040L, 043L-044L, 044L-045L, 046L-047R, 049L-050L,

[0029] 050L-051L, 051L-052R, 052R-053R, 053R-054R, 054R-055R,

[0030] 055R-056L, 061L-062L, 064L-065L, 065L-066L, 066L-067L,

[0031] 077L-078R, 078R-079R, 080R-081R, 081R-082L, 082L-083R,

[0032] 085R-086R, 086R-087R, 088R-089L, 089L-090R, 092R-093L,

[0033] 094L-095R, 096R-097R, 097R-098R, 101R-102R, 103R-104R,

[0034] 105L-106R, 107R-108L, 108L-109L, 109L-110L, 110L-111L,

[0035] 113L-114L, 114L-115L, 115L-116R, 117L-118L, 118L-119R,

[0036] 122R-123L, 123L-124L, 124L-125L, 125L-126L, 133R-134R,

[0037] 134R-135R, 136L-137L, 137L-138L, 141L-142R, 143L-144R,

[0038] 144R-145R, 145R-146R, 146R-147R, 147R-148R, 148R-149L,

[0039] 152R-153L, 153L-154R, 154R-155R, 156R-157L, 157L-158R,

[0040] 159R-160L, 160L-161R, 162R-163R, 163R-164R, 164R-165R,

[0041] 165R-166R, 166R-167R, 167R-168R, 170R-171R, 173R-174R,

[0042] 175R-176R, 176R-177R, 178R-179R, 179R-180R, 180R-181R,

[0043] 183R-184R, 184R-185L, 185L-186R, 186R-187R, 187R-188R,

[0044] 188R-189R, 189R-190R, 192R-193R.

- [0045] 구 명명법에 따르면, ORF 006L은 C10L에 대응하며, 019L은 C6L에 대응하며, 020L은 N1L에 대응하며, 021L은 N2L에 대응되며, 023L은 K2L에 대응되며, 028R은 K7R에 대응되며, 029L은 F1L에 대응되며, 037L은 F8L에 대응되며, 045L은 F15L에 대응되며, 050L은 E3L에 대응되며, 052R은 E5R에 대응되며, 054R은 E7R에 대응되며 055R은 E8R에 대응되며, 056L은 E9L에 대응되며, 062L은 I1L에 대응되며, 064L은 I4L에 대응되며, 065L은 I5L에 대응되며, 081R은 L2R에 대응되며, 082L은 L3L에 대응되며, 086R은 J2R에 대응되며, 088R은 J4R에 대응되며, 089L은 J5L에 대응되며, 092R은 H2R에 대응되며, 095R은 H5R에 대응되며, 107R은 D10R에 대응되며, 108L은 DHL에 대응되며, 122R은 A11R에 대응되며, 123L은 A12L에 대응되며, 125L은 A14L에 대응되며, 126L은 A15L에 대응되며, 135R은 A24R에 대응되며, 136L은 A25L에 대응되며, 137L은 A26L에 대응되며, 141L은 A30L에 대응되며, 148R은 A37R에 대응되며, 149L은 A38L에 대응되며, 152R은 A40R에 대응되며, 153L은 A41L에 대응되며, 154R은 A42R에 대응되며, 157L은 A44L에 대응되며, 159R은 A46R에 대응되며, 160L은 A47L에 대응되며, 165R은 A56R에 대응되며, 166R은 A57R에 대응되며, 167R은 B1R에 대응되며, 170R은 B3R에 대응되며, 176R은 B8R에 대응되며, 180R은 B12R에 대응되며, 184R은 B16R에 대응되며, 185L은 B17L에 대응되며, 및 187R은 B19R에 대응된다.
- [0046] 바람직하게는, 이종성 서열은 007R-008L, 018L-019L, 044L-045L, 064-065L, 136L-137L, 148R-149L을 포함하는 그룹으로부터 선택된 두개의 인접한 ORF에 의해 측면위치된 IGR내로 삽입되어 진다.
- [0047] 이종성 또는 외인성 DNA 서열은 본 발명에 따라 사용된 바와 같이 수두 바이러스와 관련되어 일반적으로 발견되지 않는 서열이다. 본 발명의 다른 구체예에 다르면, 외인성 DNA 서열은 하나 이상의 코딩 서열을 포함한다. 상기 코딩 서열은 전사 조절 요소, 더 바람직하게는 수두 바이러스 전사 조절 요소에 작용가능하게 연결되어 있다. 부가적으로, 수두 바이러스 전사 조절 요소간의 조합 및, 예를 들면, IRES(internal ribosomal entry site) 또한 사용될 수 있다.
- [0048] 다른 구체예에 따르면, 외인성 DNA 서열은 하나 또는 수개의 전사 조절 요소에 연결된 2개 이상의 코딩 서열을 또한 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 코딩 서열은 하나 이상의 단백질, 폴리펩티드, 웨티드, 외래 항원 또는 항원성 항원 결정기, 특히 치료에 관련된 유전자에 관한 상술한 것들을 암호화한다.
- [0049] 본 발명에 따른 치료에 관련된 유전자는 질병을 유발하는 병원성 유전자에 또는 감염성 미생물로부터 유래되거나 그와 상동인 유전자일 수 있다. 따라서, 본발명에서 이러한 치료에 관련된 유전자는 특이적 면역반응에 영향을 주기위해, 바람직하게는 면역반응을 유도하기 위해 생물의 면역계에 제공됨으로써 그 생물을 상기 미생물에 의한 감염으로부터 백신접종하거나 또는 예방적으로 보호한다. 본 발명의 다른 바람직한 구체예에 있어서, 상기 치료에 관련된 유전자는 감염성 바이러스, 예를 들면, 뎅기(Dengue) 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, B형 또는 C형 간염 바이러스 또는 HIV와 같은 면역결핍 바이러스로부터 선택되지만 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] 뎅기(Dengue) 바이러스로부터 유래된 유전자는 바람직하게는 NS1 및 PrM 유전자이며, 이를 유전자는 4개 뎅기(Dengue) 바이러스 혈청형의 하나, 두개, 세개 또는 모두로부터 유도될 수 있다. NS1 유전자는 바람직하게는 뎅기(Dengue) 바이러스 혈청형 2로부터 유래되어 바람직하게는 ORF 064L-065L(I4L-I5L)사이의 IGR내로 삽입된다. 바람직하게는 4개 뎅기(Dengue) 바이러스 혈청형의 모두로부터 유래된 PrM 유전자는 바람직하게는 007R-008L, 044L-045L, 136L-137L, 148R-149L로부터 선택된 ORF 사이의 IGR내로 삽입된다. 더 바람직하게는, 뎅기(Dengue) 바이러스 혈청형 1(PrM1)로부터 유래된 PrM 유전자는 148R-149L의 IGR내로 삽입되고, PrM2는 IGR 007R-008L내로 삽입되며, PrM3은 ORF 007R-008L의 IGR 내로 삽입되고, 및 PrM4는 IGR 136R-137L내로 삽입된다.
- [0051] 본 발명의 더 바람직한 구체예에 따르면, 이종성 DNA서열은 HIV로부터 유래되어 HIV env를 암호화하며, 상기 HIV env 유전자는 ORF 007R-008L 사이의 IGR내로 바람직하게 삽입된다.
- [0052] 또한, 본 발명에 따른 치료에 관련된 유전자는 변식 장애, 암 또한 대사성 질환에 대해 치료적 효과가 있는 질환 관련 유전자를 또한 포함한다. 예를 들면, 암과 관련하여 치료에 관련된 유전자는 특이적 항암 면역 반응을 유도하는 능력이 있는 암 항원일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 코딩 서열은 하나 이상의 마커 유전자 또는 선별 유전자를 포함한다.
- [0054] 선별 유전자는 세포에 특이적 내성을 형질도입하는데, 그에 따라 특정 선별방법이 가능하게 된다. 유능한 전문의는 수두 바이러스 시스템에 사용될 수 있는 다양한 선별 유전자를 잘 알고 있다. 예를 들면, 네오마이신 내성 유전자(NPT) 또는 포스포리보실 트랜스페리아제 유전자(gpt)가 이러한 유전자들이다.
- [0055] 표지 유전자는 형질도입된 세포를 확인하는데 사용될 수 있는 형질도입된 세포에서 색채 반응을 유도한다. 유능

한 전문의는 수두 바이러스 시스템에 사용될 수 있는 다양한 표지 유전자를 잘 알고 있다. 이들 중에서, 예를 들면, β -갈락토시다아제(β -gal), β -글루코시다아제(β -glu), 녹색 형광 단백질(EGFP) 또는 청색 형광 단백질이 유전자 암호화 유전자이다.

- [0056] 본 발명에 따른 또 다른 구체예에 따르면, 외인성 DNA 서열은 외인성 DNA내의 수두 바이러스 전사 조절 요소 및/또는 코딩 서열을 인접한 ORF의 정지코돈 및/또는 개시코돈으로부터 분리시키는 스페이싱 서열을 포함한다. 인접한 ORF의 정지/개시코돈과 외인성 DNA내의 삽입된 코딩 서열 사이에 있는 상기 스페이서 서열은 삽입된 외인성 DNA 및 임의의 생성 재조합 바이러스를 안정화시키는 이점을 갖는다. 스페이서 서열의 크기는 상기 서열이 코딩 또는 조절 기능을 갖지 않는 한 다양할 수 있다.
- [0057] 다른 구체예에 따르면, 외인성 DNA내의 수두 바이러스 전사 조절 요소 및/또는 코딩 서열을 인접한 ORF의 정지 코돈으로부터 분리시키는 상기 스페이서 서열은 하나 이상의 뉴클레오티드 길이이다.
- [0058] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면, 외인성 DNA내의 수두 바이러스 전사 조절 요소 및/또는 코딩 서열을 인접한 ORF의 개시코돈으로부터 분리시키는 스페이싱 서열은 30개 이상의 뉴클레오티드이다. 특히 전형적인 백시니아 바이러스 프로모터 요소가 개시코돈의 상류를 확인하는 경우, 외인성 DNA의 삽입은 인접한 ORF의 개시코돈으로부터 상기 프로모터 요소를 분리하지 않을 수 있다. 전형적인 백시니아 프로모터 요소는, 예를 들면, 후기 프로모터에 대한 서열 “TAAAT” (Davision & Moss, J. Mol. Biol. 1989; 210: 771-784) 및 전기 프로모터에 대한 A/T 풍부 영역을 스캐닝함으로써 확인되어 질 수 있다. 대략 30개 뉴클레오티드의 스페이싱 서열은 ORF의 개시코돈의 상류에 위치한 수두 바이러스가 영향을 받지 않게 보장하는 바람직한 거리이다. 부가적으로, 다른 바람직한 구체예에 따르면, 삽입된 외인성 DNA 및 인접한 ORF의 개시코돈간의 거리는 대략 50개 뉴클레오티드이며, 더 바람직하게는 대략 100개 뉴클레오티드이다.
- [0059] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에 따르면, 스페이싱 서열은 인접한 ORF의 전사를 조절할 수 있는 추가 수두 바이러스 전사 조절 요소를 포함한다.
- [0060] 재조합 MVA를 생성하기 위해 본 발명에 따라 사용될 수 있는 전형적인 MVA 균주는 European Collection of Animal Cell Culture (ECACC)에 기탁번호 V00120707로 기탁된 MVA-575이다.
- [0061] 다른 바람직한 MVA 균주는 MVA-Vero 또는 이의 유도체이다. MVA-Vero 균주는 European Collection of Animal Cell Culture (ECACC)에 기탁번호 V99101431 및 01021411로 기탁되어 있다. MVA-Vero의 안전성은 국제 특허출원 PCT/EP01/02703에 개시된 바와 같이 생물학적, 화학적 및 물리적 특성에 의해 반영된다. 다른 MVA 균주와 비교할 때, MVA-Vero는 한개의 추가적인 계놈 결실을 포함한다.
- [0062] 또 다른, 더 바람직한 MVA 균주는 MVA-BN이다. MVA-BN은 European Collection of Animal Cell Culture (ECAC C)에 기탁번호 V00083008로 기탁되어 있다. MVA-BN 바이러스는 MVA로부터 또한 유래된 극도의 약화된 바이러스이다(PCT/EP01/13628 참조).
- [0063] 본 발명에 따른 바이러스의 “유도체”는 부모 바이러스와 동일한 특징적인 특성을 나타내지만 바이러스 계놈의 하나 이상의 일부에서 차이를 나타내는 후대 바이러스에 관한 것이다. “MVA의 유도체”는 MVA와 비교할 때 동일한 기능적 특징을 갖는 바이러스를 기술한다. 예를 들면, MVA-BN의 유도체는 MVA-BN의 특징적인 특성을 갖는다. MVA-BN 또는 이의 유도체의 이러한 특징 중 하나는 사람 HaCat 세포에서 복제의 약화와 결여이다.
- [0064] 본 발명에 따른 재조합 MVA는 의약 또는 백신으로도 유용하다. 다른 구체예에 따르면, 재조합 MVA는 외인성 코딩 서열을 표적 세포내로 도입하는데 사용될 수 있는 바, 상기 서열은 표적 세포의 계놈에 동종이거나 또는 이종이다.
- [0065] 외인성 코딩 서열의 표적세포내로의 도입은 시험관에서 실시되어 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 항원 또는 항원성 항원 결정기를 생성한다. 이 방법은 본 발명에 따른 재조합 MVA를 사용하여 숙주세포를 감염시키고, 감염된 숙주세포를 적절한 조건하에서 배양하며 또 상기 숙주세포에 의해 생성된 폴리펩티드, 펩티드, 단백질, 항원, 항원 결정기 및/또는 바이러스를 분리 및/또는 농축하는 것을 포함한다.
- [0066] 또한, 하나 이상의 동종 또는 하나 이상의 이종성 서열을 세포내로 도입하기 위한 상기 방법은 시험관내 및 생체내 치료에 적용될 수 있다. 시험관 치료에 있어서, 본 발명에 따른 재조합 MVA에 의해 이전(생체외)에 감염된 분리 세포는 면역반응에 영향을 주기위해, 바람직하게는 면역반응을 유도하기 위해 살아있는 동물의 몸에 투여되었다. 생체내 치료에 있어서, 본 발명에 따른 재조합 수두 바이러스는 면역반응에 영향을 주기위해, 더 바람직하게는 면역반응을 유도하기 위해 살아있는 동물의 몸에 직접적으로 투여되었다. 이 경우, 접종 부위를 둘러싸

고 있는 세포뿐만 아니라, 바이러스가 혈류를 통하여 운반되는 세포는 본 발명에 따른 재조합 MVA에 의해 생체 내에서 직접적으로 감염된다. 감염 후, 이들 세포는 외인성 코딩 서열에 의해 암호화되는 치료 유전자의 단백질, 웹티드 또는 항원성 항원 결정기를 합성하며, 따라서 세포 표면상에 이들 또는 이들의 일부를 제공한다. 면역계의 특수화된 세포는 이러한 이종 단백질, 웹티드 또는 항원 결정기의 표시를 인식하여 특이적 면역반응을 개시한다

[0067] MVA는 성장이 매우 제한적이어서 매우 약화되므로, 면역이 손상된 동물 또는 사람을 포함하여 사람을 비롯한 광범위한 포유류의 치료에 유용하다. 본 발명은 사람을 비롯한 살아있는 동물의 몸에서 면역반응을 유도하기 위한 약제학적 조성물 또는 백신을 또한 제공한다.

[0068] 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 및/또는 승인된 담체, 첨가제, 항생제, 방부제, 보조제, 희석제 및/또는 안정화제를 일반적으로 포함할 수 있다. 이러한 보조물질은 물, 식염수, 글리세롤, 에탄올, 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질 등일 수 있다. 적절한 담체는 단백질, 다당류, 폴리락트 산, 폴리글리콜산, 중합체 아미노산, 아미노산 공중합체, 지질 응집물 등과 같이 일반적으로 크고, 느리게 대사되는 분자이다.

[0069] 백신의 제조를 위해, 본 발명에 따른 재조합 수두 바이러스는 생리학적으로 허용가능한 형태로 변환된다. 이는 천연두에 대한 백신접종에 사용된 수두 바이러스 백신의 제조에 있어서 경험을 토대로 하여 실시될 수 있다 (Stickl, H. 등에 의해 개시됨. [1974] Dt sch. med. Wschr. 99, 2386-2392). 예를 들면, 약 10mM 트리스, pH 7.4의 NaCl 140mM에서 조제되고 5x10E8 TCID₅₀/ml의 역가를 갖는 정제된 바이러스를 -80°C에서 저장한다. 백신 주사의 제조를 위해 예를 들면, 바이러스의 10E2-10E8 입자는 앰플내, 바람직하게는 유리 앰플에서 1% 사람 알부민 및 2% 웨튼존재하의 100ml의 인산-완충 식염수(PBS)에서 동결건조된다. 다르게는, 백신 주사는 제제에서 바이러스의 순차적 동결-건조에 의해 생성될 수 있다. 이 제제는 만니톨, 텍스트란, 당, 글리신, 락토오스 또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 추가 첨가제 또는 산화 방지제 또는 비활성 가스, 안정화제 또는 생체내 투여에 적합한 재조합 단백질(예를 들면, 사람 혈청 알부민)과 같은 다른 보조제를 함유할 수 있다. 이어 유리 앰플을 밀봉하고 4°C 및 실온 사이에서 몇개월동안 저장할 수 있다. 그러나, 다른 요구사항이 없는 한, 상기 앰플은 바람직하게는 -20°C 미만에서 저장될 수 있다.

[0070] 예방접종 또는 치료를 위해, 동결건조물은 0.1 내지 0.5ml의 수용액, 바람직하게는 생리 식염수 또는 트리스 완충액에 용해되며 전신적으로 또는 국소적으로, 즉 비경구, 피하, 근육내 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 투여경로에 의해 투여될 수 있다. 투여 형태, 복용량 및 투여횟수는 공지된 방식으로 당업자에 의해 최적화될 수 있다. 그러나 가장 일반적으로, 환자는 첫번째 백신접종을 한지 약 한달 내지 6주 후에 두번째 백신접종을 받는다.

[0071] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 재조합 MVA를 생성하는데 사용될 수 있는 플라스미드 벡터 및 특정 DNA 서열에 관한 것이다.

[0072] 규칙적으로, 두개의 인접한 ORF가 측면에 위치하거나 이들 사이에 위치한 IGR은 외인성 DNA 서열이 삽입될 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 따라서, 본 발명에 따른 플라스미드 벡터는 MVA의 게놈에 동종이거나 또는 MVA의 게놈으로부터 유도된 DNA 서열을 포함하는데, 상기 DNA 서열은 바이러스 게놈의 두개의 인접한 ORF가 측면에 위치하거나 이들 사이에 위치한 IGR 서열의 완전하거나 또는 부분적인 단편을 포함한다. 바람직하게, 상기 플라스미드 벡터는 관심을 갖고 있는 외인성 DNA 서열의 삽입, 바람직하게는, 상기 이종성 DNA 서열에 기능적으로 연결된 수두 바이러스 전사 조절 요소를 삽입하기 위한 상기 IGR- 유도 서열내로 삽입된 하나 이상의 클로닝 부위를 포함한다. 경우에 따라, 상기 플라스미드 벡터는 리포터 및/또는 선별 유전자 카세트를 포함한다. 상기 플라스미드 벡터는 바람직하게는 IGR 서열의 완전하거나 또는 부분적인 단편의 측면에 있는 2개의 인접한 ORF 서열을 또한 포함한다.

[0073] 일부 IGR은 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는 것으로 확인되어 졌다. 이러한 경우, 상기 플라스미드 벡터는 IGR 측면 서열의 DNA 서열 즉, 두개의 인접한 ORF의 DNA 서열을 포함한다. 바람직하게는, 이종성 DNA 서열 삽입 용 클로닝 부위는 IGR내로 삽입된다. IGR 측면 서열의 DNA는 외인성 DNA 서열이 MVA 게놈내의 대응하는 IGR내로 삽입되도록 지시한다. 이러한 플라스미드 벡터는 이종성 DNA 서열 및 경우에 따라서는 리포터 및/또는 선별 유전자 카세트 삽입용 클로닝 부위를 포함하는 IGR 서열의 완전하거나 또는 부분적인 단편을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0074] 두개의 인접한 ORF의 IGR 측면 서열뿐만 아니라 IGR-DNA 서열은 바람직하게는 001L-002L, 002L-003L, 005R-006R, 006L-007R, 007R-008L, 008L-009L, 017L-018L, 018L-019L, 019L-020L, 020L-021L, 023L-024L, 024L-

025L, 025L-026L, 028R-029L, 030L-031L, 031L-032L, 032L-033L, 035L-036L, 036L-037L, 037L-038L, 039L-040L, 043L-044L, 044L-045L, 046L-047R, 049L-050L, 050L-051L, 051L-052R, 052R-053R, 053R-054R, 054R-055R, 055R-056L, 061L-062L, 064L-065L, 065L-066L, 066L-067L, 077L-078R, 078R-079R, 080R-081R, 081R-082L, 082L-083R, 085R-086R, 086R-087R, 088R-089L, 089L-090R, 092R-093L, 094L-095R, 096R-097R, 097R-098R, 101R-102R, 103R-104R, 105L-106R, 107R-108L, 108L-109L, 109L-110L, 110L-111L, 113L-114L, 114L-115L, 115L-116R, 117L-118L, 118L-119R, 122R-123L, 123L-124L, 124L-125L, 125L-126L, 133R-134R, 134R-135R, 136L-137L, 137L-138L, 141L-142R, 143L-144R, 144R-145R, 145R-146R, 146R-147R, 147R-148R, 148R-149L, 152R-153L, 153L-154R, 154R-155R, 156R-157L, 157L-158R, 159R-160L, 160L-161R, 162R-163R, 163R-164R, 164R-165R, 165R-166R, 166R-167R, 167R-168R, 170R-171R, 173R-174R, 175R-176R, 176R-177R, 178R-179R, 179R-180R, 180R-181R, 183R-184R, 184R-185L, 185L-186R, 186R-187R, 187R-188R, 188R-189R, 189R-190R, 192R-193R를 포함하는 그룹으로부터 각각 선택된 IGR과 ORF로부터 선택된다.

[0075] 상기 서열은, 더 바람직하게는 007R-008L, 018L-019L, 044L-045L, 064L-065L, 136L-137L, 148L-149L를 포함하는 그룹으로부터 각각 선택된 IGR과 ORF로부터 선택된다. IGR 유래 서열은 바람직하게는 하기 뉴클레오티드 서열

[0076] - 서열번호 32의 527-608;

[0077] - 서열번호 33의 299-883;

[0078] - 서열번호 34의 339-852;

[0079] - 서열번호 35의 376-647;

[0080] - 서열번호 36의 597-855;

[0081] - 서열번호 37의 400-607을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.

[0082] 두개의 인접한 ORF의 IGR 측면 서열은 바람직하게는 하기 뉴클레오티드 서열

[0083] - 서열번호 32의 1-525 및 609-1190;

[0084] - 서열번호 33의 101-298 및 884-1198;

[0085] - 서열번호 34의 1-338 및 853-1200;

[0086] - 서열번호 35의 1-375 및 648-1200;

[0087] - 서열번호 36의 1-596 및 856-1200;

[0088] - 서열번호 37의 1-399 및 608-1081을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.

[0089] 상기 DNA 서열은 바람직하게는 ECACC에 기탁번호 V00083008로 기탁된 MVA의 게놈에 동종이거나 또는 MVA의 게놈으로부터 유도된다.

[0090] 본 발명에 따른 플라스미드 벡터를 생성하기 위해, MVA 게놈내로 삽입시킬 외인성 DNA와 측면을 접하고 있는 서열을 분리하여 pBluescript(Stratagene)과 같은 표준 클로닝 벡터내로 클로닝시켰다. 이러한 플라스미드 벡터는, 경우에 따라, 카세트내로 포함된 반복서열로 인하여 최종 재조합 바이러스로부터 결실될 수 있는 선별- 또는 리포터 유전자 카세트를 포함한다.

[0091] 플라스미드 벡터에 의해 외인성 DNA 서열을 MVA 게놈내로 도입하기 위한 방법 및 재조합 MVA를 수득하기 위한 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 추가적으로 하기의 참고문헌으로부터 추론될 수 있다:

[0092] - Molecular Cloning, A laboratory Manual. Second Edition. By J. Sambrook, E.f. Fritsch and T. Maniatis.

[0093] Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989 : DNA의 클로닝, RNA 분리, 웨스턴 블랏 분석, RT-PCR 및 PCR 증폭수법과 같은 표준 분자생물학 수법의 여러 기술 및 노하우를 개시함;

[0094] - Virology Methods Manual. Edited by Brian WJ Mahy and Hillar O Kangro. Academic Press. 1996: 바이러스의 취급 및 조작수법 개시;

[0095] - Molecular Virology: A Practical Approach. Edited by AJ Davison and RM Elliott. The Practical

Approach Series. IRL Press at Oxford University Press. Oxford 1993. Chapter 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectors;

[0096] - Current Protocols in Molecular Biology. Publisher: John Wiley and Son Inc. 1998. Chapter 16, section IV: Expression of proteins in mammalian cells using Vaccinia viral vector: MVA의 취급, 조작 및 유전자 조작 수법과 노하우 기재.

[0097] 본 발명에 따른 MVA, 바람직하게는 ECACC에 기탁번호 V00083008로 기탁된 MVA는, 본 발명에 따른 플라스미드 벡터에 의해 세포를 형질감염시키고, 형질감염된 세포를 MVA에 의해 감염시킨 다음 본 발명에 따른 MVA를 확인, 분리 및 경우에 따라 정제시킴으로써 제조될 수 있다.

[0098] 본 발명에 따른 DNA 서열은 본 발명에 따른 MVA 또는 그 유도체 및 본 발명에 따른 MVA에 감염된 세포 또는 개체를 확인 또는 분리하는데 사용될 수 있다. 상기 DNA 서열은, 예를 들면, PCR-프라이머, 교잡반응 탐침(prob e)을 생성하는데 사용되거나 또는 어레이 기술에 사용된다.

실시예

[0115] 하기의 실시예는 본 발명을 더 설명할 것이다. 제공된 실시예는 어떠한 의미로든 본 발명을 제한하는 방식으로 이해되어서는 않됨을 당업자는 잘 이해할 것이다. 본 발명의 범위는 부가된 청구항의 전체 범위에 의해서만 제한될 것이다.

실시예 1

삽입벡터 pBNX39, pBNX70 및 pBN84

[0118] 외인성 서열을 MVA의 065L ORF에 인접한 유전자내 영역(삽입부위는 게놈 위치 56760)내로 삽입하기 위해, 삽입부위에 인접한 측면 서열 약 1200bp를 포함하는 벡터를 제작하였다. 이를 측면 서열은 065L ORF의 약 610bp를 포함하는 1개 플랑크(다른 명명법: I4L ORF) 및 인접 ORF 부분뿐만 아니라 065L ORF의 뒤쪽 유전자내 영역 약 580bp를 포함하는 플랑크로 이루어진 두개의 플랑크로 분리시켰다. 이를 측면 서열간에 있어서, Ecogpt 유전자(gpt는 대장균으로부터 분리된 포스포리보실트랜스퍼라아제 유전자을 나타낸다) 및 BFP(청색 형광 단백질)은 각각 수두 바이러스 프로모터의 전사 조절하에 위치되어 있다. 부가적으로, I4L ORF 뒤쪽 유전자내 영역내로 삽입될 추가 유전자 또는 서열 삽입용의 하나 이상의 클로닝 부위가 있다. 본 발명에 따른 예시적인 벡터 제작물은 도 1a 및 1b(pBNX39, pBNX70)에 개시되어 있다. 벡터 pBN84(도 1c)에서 뎅기 바이러스 NS1의 코딩 영역은 pBNX70(도 1b)의 클로닝 부위로 삽입된다.

상동성 재조합을 통한 재조합 MVA의 생성

[0120] 외래 유전자는 동종 재조합에 의해 MVA 게놈내로 삽입될 수 있다. 이를 위해, 관심을 두고 있는 외래 유전자를 상술한 바와 같이 플라스미드 벡터내로 클론화하였다. 이 벡터를 MVA 감염 세포에서 형질감염시켰다. 재조합은 감염 및 형질감염된 세포의 세포질에서 일어난다. 삽입 벡터에 또한 함유되는 선별 및/또는 리포터 카세트를 이용하여 재조합 바이러스를 포함하는 세포를 확인하고 분리시켰다.

[0121] 상동성 재조합을 위해, 혈청없는 재조과정에 있어서 BHK(베이비 햄스터 신장) 세포 또는 CEF(1차 닭 배아 섬유아세포)는 DMEM(Dulbecco 변형 이글 배지, Gibco BRL) + 10% 우태 혈청(FCS) 또는 VP-SFM(Gibco BRL) + 4mmol/1 L-글루타민을 사용한 6 웰 플레이트에서 살포시켰다.

[0122] 세포는 성장 상에 있도록 요구되므로 형질감염 당일에 60-80% 콘플루언스에 도달해야 한다. 감염에 대한 감염 다양성(moi)의 측정용으로 공지된 세포의 수로서, 살포하기 전에 세포수를 세었다.

[0123] 감염을 위해, MVA 균주는 DMEM/FCS 또는 VP-SFM/L-글루타민에서 희석시켜 500 μ l 희석물이 0.1-1.0의 moi를 나타내는 바이러스의 적절한 양을 함유하게 한다. 세포는 살포후에 한번 나눠진 것으로 추정된다. 배지를 세포로부터 제거시키고 세포는 500 μ l의 희석된 바이러스를 사용하여 실온에서 1시간동안 흔들어서 감염시켰다. 접종원을 제거하고 세포를 DMEM/VP-SFM으로 세척시켰다. 감염된 세포를 1.6ml DMEM/FCS 및 VP-SFM/L-글루타민에 각각 방치한 동안, 형질감염 반응 장비를 설치하였다(Qiagen Effectene Kit).

[0124] 형질감염을 위해, “Effectene” 형질감염 키트(Qiagen)을 사용하였다. 형질감염 혼합물은 최종 부피가 100 μ l 가 되도록 완충액 EC를 사용하여 1-2 μ g의 선형화된 삽입 벡터(다양한 형질감염을 위한 총 양)로 조제하였다. 3.2 μ l 인핸서, 와류 및 배양기를 실온에서 5분간 부가하였다. 이어, 스톡튜브를 볼텍스처리후에 10 μ l의 Effectene을 부가하고 용액을 볼텍스처리에 의해 충분하게 혼합시켜고 실온에서 10분간 배양하였다. 600 μ l의 DMEM/FCS 및

VP-SFM/L-글루타민을 각각 부가하고 혼합한 후에, 전체 형질감염 혼합물을 이미 배지로 덮여있는 세포에 부가하였다. 배지를 천천히 흔들어 형질감염 반응을 혼합시켰다. 배양은 37°C에서 5% CO₂를 사용하여 밤새도록 실시하였다. 다음날, 배지를 제거하고 신선한 DMEM/FCS 또는 VP-SFM/L-글루타민으로 대체하였다. 배양은 3일동안 계속되었다.

[0125] 생성물을 얻기 위해, 세포를 배지내로 빼내고, 세포 혼탁액을 적절한 튜브로 옮겨 단기간 저장을 위해서는 -20°C에서 또는 장기간의 저장을 위해서는 -80°C에서 냉동시켰다.

MVA의 I4L 삽입부위에 Ecogpt의 삽입

[0127] 첫번째로, 상술한 프로토콜에 따라 MVA에 의해 세포를 감염시키고 리포터 유전자로서 Ecogpt 유전자(Ecogpt 또는 간략화해서 gpt는 포스포리보실트랜스퍼라아제 유전자를 의미한다)를 함유하는 삽입 벡터 pBNX39에 의해 추가적으로 형질감염시켰다. 생성된 재조합 바이러스를 마이코페놀산, 크산틴 및 하이포크산틴의 부가에 의한 포스포리보실트랜스퍼라아제 대사 선택하에서 3회의 플라크 정제에 의해 정제시켰다. 마이코페놀 산(MPA)은 이노신 모노포스페이트 탈수소효소를 억제하여 대부분의 세포주에서 퓨린 합성의 방해 및 바이러스 복제의 억제를 초래한다. 이러한 방해는 구성적 프로모터로부터 Ecogpt를 발현하여 크산틴 및 하이포 크산틴 기질을 제공함으로써 극복될 수 있다.

[0128] 생성된 재조합 바이러스는 예상되는 삽입부위를 선택적으로 증폭시키는 프라이머 쌍을 사용하는 표준 PCR 예세이에 의해 확인하였다. I4L 삽입 측면을 증폭시키기 위해, 프라이머 쌍 BN499(CAA CTC TCT TCT TGA TTA CC; 서열번호 1) 및 BN500(CGA TCA AAG TCA ATC TAT G; 서열번호 2)를 사용하였다. 엠프티 벡터 바이러스 MVA의 DNA가 증폭되는 경우, 예상되는 PCR 단편은 328 뉴클레오티드(nt) 길이이며, I4L 삽입부위에 통합된 외인성 DNA를 갖는 재조합 MVA가 증폭되는 경우, 단편은 대응적으로 확대된다.

MVA의 IGR064L-065L(I4L-I5L) 삽입부위에 NS1의 삽입

[0130] 첫번째로, 상술한 프로토콜에 따라 MVA에 의해 세포를 감염시키고 리포터 유전자로서 선별용 Ecogpt 유전자 및 BFP(블루 형광 단백질)을 함유하는 삽입 벡터 pBN84에 의해 추가적으로 형질감염시켰다. 생성된 재조합 바이러스를 마이코페놀 산, 크산틴 및 하이포크산틴의 부가에 의한 포스포리보실트랜스퍼라아제 대사 선택하에서 7회의 플라크 정제에 의해 정제시켰다. 마이코페놀 산(MPA)은 이노신 모노포스페이트 탈수소효소를 억제하여 대부분의 세포주에서 퓨린 합성의 방해 및 바이러스 복제의 억제를 초래한다. 이러한 방해는 구성적 프로모터로부터 Ecogpt를 발현하여 크산틴 및 하이포 크산틴 기질을 제공함으로써 극복될 수 있다.

[0131] 생성된 재조합 바이러스는 예상되는 삽입부위를 선택적으로 증폭시키는 프라이머 쌍을 사용하는 표준 PCR 예세이에 의해 확인하였다. I4L 삽입을 증폭시키기 위해, 측면 프라이머 쌍 BN499(CAA CTC TCT TCT TGA TTA CC; 서열번호 1) 및 BN500(CGA TCA AAG TCA ATC TAT G; 서열번호 2)를 사용하였다. 엠프티 벡터 바이러스 MVA의 DNA가 증폭되는 경우, 예상되는 PCR 단편은 328 뉴클레오티드(nt) 길이이며, I4L 삽입부위에 통합된 텅기바이러스 NS1 코딩 영역을 갖는 NS1에 대한 재조합 MVA가 증폭되는 경우, 단편은 1683bp일 것으로 예상된다. 도 7에서 PCR 결과는 17회의 바이러스 증폭 후, I4L 삽입부위에서 NS1의 삽입이 안정하다는 것을 명확하게 보여준다.

시험관내에서 NS1(MVA-BN22)를 포함하는 재조합 MVA의 실험

[0133] BHK 세포의 약 80% 콘플루언트 단층을 갖는 T25 플라스크를 1% FCS를 사용하여 MEM a에서 1x10⁷으로 희석된 100 μl의 바이러스 스톡으로 접종시키고 실온에서 30분간 흔들었다. 3% FCS를 갖는 5ml의 MEM a를 각 플라스크에 부가하고 CO₂ 배양기중 30°C에서 배양시켰다. 상기 플라스크는 48시간 후에 채취하였다. 플라스크로부터 상청액을 제거하고 10분동안 4°C에서 260g으로 희전시켰다. 상기 상청액을 동분량으로 나눠서 -80°C에서 저장시켰다. 상기 펠릿을 5ml의 1xPBS로 두번 세척한 다음, 1% TX100를 사용한 1ml의 저장성(hypotonic) 다운성 완충액에 다시 현탁시켰다. 세포 용해물을 수집하여 5분동안 16,000g에서 희전시키고 상청액은 마이크로 원심분리기에서 -80°C로 저장시켰다.

[0134] GEP를 포함한 MVA, 결실 부위(MVA-BN07)에서 NS1 유전자를 포함한 MVA로 접종된 플라스크 및 감염되지 않은 (mock infected) 플라스크를 상술한 바와 같이 동일한 방법으로 처리시켰다.

[0135] 세포/바이러스 용해물을 및 상청액을 비-가열/가열 조건하의 비-환원/환원 샘플 완충액에서 처리시켰다. 단백질은 10%SDS PAGE상에서 분리시켜 니트로셀룰로오스 막으로 운반시켰다. 블릿은 울혈 환자의 혈청을 1:500희석하여 철야로 탐침으로 검사하였다. 1X PBS를 사용하여 3회 세척한 후, 블릿은 항-인간 IGR-HRP(DAKO)를 사용하여 실

온에서 2시간동안 배양시켰다. 상술한 바와 같이 블렛을 세척시킨 후, 4-클로로-1-나프톨을 사용하여 발색시켰다.

- [0136] 웨스턴 블렛 결과는 MVA-BN22중의 NS1이 다량으로 발현됨을 나타냈다. NS1은 비-가열 조건하에서 2분자체로서, 또 가열 조건하에서는 단량체로서 정방향으로 발현시켰다.
- [0137] NS1 발현을 MVA-BN22 및 MVA-BN07 모두에서 비교하였다. BHK 세포는 동일한 pfu를 사용하여 접종시키고 48시간 후에 수집하였다. NS1의 발현은 BN07에서 보다 BN22에서 훨씬 더 높은 것으로 결과가 나타났다. 웨스턴 블렛 결과는 BN07과 비교할 때 BN22 작제물을 사용한 상청액에서 분비된 NS1이 더 많다는 것을 또한 나타냈다.
- [0138] 상기 결과는 BN22로 감염된 세포에서 발현된 NS1은 항원성이며 율혈 환자의 혈청에 의해 인식되어 진다는 것을 또한 나타냈다.

[0139] 결론적으로, NS1은 다량으로 발현되며 BHK 세포에서 정방향으로 BN22에 의해 감염된다. 2분자체 및 단량체 모두 항원성이며 율혈 환자의 혈청에 의해 인식되어 진다

실시예 2

삽입 벡터 pBNX67 및 pBN27

[0142] ORF 136L 및 137L사이에 있는 신규한 삽입부위(계놈 위치 129940)에 인접한 MVA 서열을 하기 프라이머를 사용하여 관심을 갖고 있는 서열에 대한 표준 PCR 증폭에 의해 분리시켰다:

[0143] 플랑크 1을 분리시키기 위한 oBN543(TCCCCGCGGAGAGGCGTAAAGTTAAATTAGAT; 서열번호 3) 및 OBN544 (TGATCTAGAATCGCTCGTAAAAACTGCGGAGGT; 서열번호 4); 플랑크 2를 분리시키기 위한 oBN578(CCGCTCGAGTTCACGTTCAGCCTTCATGC; 서열번호 5) 및 oBN579(CGGGGGCCCTATTTGTATAATATCTGGTAAG; 서열번호 6).

[0144] 플랑크 1을 포함하는 PCR 단편은 제한 효소 SacII 및 XbaI를 사용하여 처리시켰으며 pBluescript(Stratagene)와 같은 SacII/XbaI 분해되고 인산기 제거된 염기성 벡터에 결찰시켰다.

[0145] 생성 플라스미드를 XhoI/ApaI 분해시키고, 인산기 제거시킨 다음 플랑크 2를 포함하는 XhoI/ApaI 분해된 PCR 단편에 결찰시켰다.

[0146] 경우에 따라, 프라이머 oBN545(CGGCTGCAGGGTACCTCACGTTCAGCCTTCATGC; 서열번호 7) 및 OBN546(CGGAAGCTTATATGGTTAGGGATATTCTGTTTT; 서열번호 8)을 사용한 PCR에 의해 분리되며 HindIII/PstI 분해되는 플랑크 2의 반복 서열은, 생성되는 벡터의 HindIII/PstI 부위내로 삽입시켰다. 도 2a는 벡터(pBNX51)을 나타낸다.

[0147] 합성 프로모터, NPTII 유전자(네오마이신 내성), 폴리-A-영역, IRES, EGFP 유전자(Ps-NPTII-polyA-IRES-EGFP)를 포함하는 리포터 카세트를 Ec1136II/XhoI 분해시켰으며 삽입 벡터의 HindIII/XhoI 부위내로 삽입시키며, 이때, 상기 HindIII부위는 T4 DNA 폴리머라아제(Roche)에 의해 무딘 말단으로 된다. 이 실시예에 따른 벡터 작제물 예에 대한 제한 지도는 도 2b(pBNX67)에 개시되어 있다.

[0148] pBN27(도 2c)의 작제를 위해, 혈청형 4의 뎅기 바이러스 PrM을 pBNX67의 단일 PacI내에 삽입시켰다.

상동성 재조합을 통한 재조합 MVA의 생성

[0150] 벡터 pBNX67(도 2b)는 상기에 언급된 프로토콜을 이용하여, 예를 들면, 상동성 재조합용 pBN27(도 2c)를 사용하여 재조합 MVA를 생성하는데 사용되어 두개의 인접한 ORF간의 유전자내 영역에서 뎅기 바이러스 PrM4를 운반하는 재조합 MVA를 생성한다.

MVA의 IGR136-137 삽입부위에 PrM4의 삽입

[0152] 첫째로, 상술한 프로토콜에 따라 MVA에 의해 세포를 감염시키고 리포터 유전자로서 선별을 위한 NPT 유전자 및 EGFP(향상된 그린 형광 단백질)을 함유하는 삽입벡터 pBN27(도 2c)에 의해 부가적으로 형질감염시켰다. 생성된 재조합 바이러스는 G418 선별하에서 4회의 플라크 정제에 의해 정제시켰다.

[0153] 생성된 재조합 바이러스는 예상되는 삽입부위를 선택적으로 증폭시키는 프라이머 쌍을 사용한 표준 PCR 에세이에 의해 확인하였다. IGR136-137 삽입부위를 증폭시키기 위해, 프라이머 쌍 BN900(cgttcgcatgggttacctcc; 서열 번호 9) 및 BN901(gacgcatgaaggctgaac; 서열번호 10)를 사용하였다. 엠프티 벡터 바이러스 MVA의 DNA가 증폭되

는 경우, 예상되는 PCR 단편은 88 뉴클레오티드(nt) 길이이며, IGR136-137 삽입부위에 있는 통합된 뎅기 바이러스 PrM4 코딩 영역을 갖는 PrM4에 대한 재조합 MVA가 증폭되는 경우, 단편은 880bp일 것으로 예상된다. 도 8a에서 PCR 결과는 22회 바이러스 증폭 후, IGR136-137 삽입부위에서 PrM4의 안정한 삽입을 명확하게 보여주었다. 재조합 MVA는 MVA-BN과 동일한 성장특성을 나타낸다. 이는 닭 배아섬유아세포(CEF 세포)에서 복제되며 포유류 세포에서 약하게 성장한다(도 8b).

[0154] 실시예 3

[0155] 삽입 벡터 pBNX79, pBNX86, pBNX88, pBN34 및 pBN56

[0156] ORF 007R 및 008L사이에 있는 신규한 삽입 부위(제놈 위치 12800)에 인접한 MVA 서열은 하기의 프라이머를 사용하여 관심을 갖고 있는 서열의 표준 PCR 증폭에 의해 분리시켰다:

[0157] 플랑크 1을 분리시키기 위한 IGR 07/08 F1up(CGCGAGCTCAATAAAAAAGTTTAC; 서열번호 11) 및 IGR 07/08 F1end(AGGCCGCGGATGCATGTTATGCAAAAT; 서열번호 12); 플랑크 2를 분리시키기 위한 IGR 07/08 F2up(CCGCTCGAGCGCGGATCCAATATGGCATAGAAC; 서열번호 13) 및 IGR 07/08 F2end(CAGGGCCCTCTCATCGCTTCATG; 서열번호 14).

[0158] 플랑크 1을 포함하는 PCR 단편은 제한 효소 SacII 및 SacI를 사용하여 처리시켰으며 pBluescript(Stratagene)와 같은 SacII/XbaI 분해되고 인산기 제거된 염기성 벡터에 결찰시켰다.

[0159] 생성 플라스미드를 XhoI/ApaI 분해시키고, 인산기 제거시킨 다음 플랑크 2를 포함하는 XhoI/ApaI 분해된 PCR 단편에 결찰시켰다.

[0160] 경우에 따라, IGR 07/08 F2up(CCGCTCGAGCGCGGATCCAATATGGCATAGAAC; 서열번호 13) 및 IGR 07/08 F2mid(TTTCTGCAGTGATATTATCCAATACTA; 서열번호 15)을 사용한 PCR에 의해 분리되며 BamHI/PstI 분해되는 플랑크 2의 반복 서열은, 생성되는 벡터의 BamHI/PstI 부위내로 삽입시켰다.

[0161] 수두 바이러스, 표지 유전자, 폴리-A-영역 및 경우에 따라 IRES 요소, 치료적으로 활성인 물질 또는 유전자 생성물과 같은 다른 유전자를 갖는 카세트를 포함하는 임의의 리포터 또는 치료적 유전자는 제한 분해 후 T4 DNA 폴리미라아제(Roche)에 의해 무딘 말단으로 되며 플라스미드 벡터의 적절한 클로닝 부위내로 삽입될 수 있다. 이 실시예에 따른 벡터 작제물의 예에 대한 제한 지도는 도 3a(pBNX79)에 개시되어 있다. NPT/EGFP 선별 카세트의 삽입은 pBNX86(도 3b)을 초래하고, gpt/BFP 선별 카세트의 삽입은 pBNX889(도 3c)를 초래한다. 치료적 유전자 및 작용 가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 치료적 유전자에 대한 발현 단위를 고려할 때, 이 발현 단위는 PacI 부위내로 삽입되어 진다. pBN34의 발현을 위해(도 3d), 뎅기 바이러스 PrM2를 pBNX88(도 3c)에서 클론화시켰으며 pBN56(도 3e)의 합성을 위해, HIV env 코딩 영역을 pBNX86(도 3b)에 PacI 클론화시켰다.

[0162] 상동성 재조합을 통한 재조합 MVA의 생성

[0163] 벡터 pBNX86(도 3b) 및 pBNX889(도 3c)는 각각 상술한 프로토콜을 이용하여 재조합 MVA를 생성하는데 사용될 수 있다. 상동성 재조합을 위해 pBN34(도 3d)의 사용은 두개의 인접한 ORF간의 유전자내 영역에 뎅기 바이러스 PrM2를 갖는 재조합 바이러스를 초래한다. MVA-BN 제놈을 사용한 pBN56(도 3e)의 재조합은 대응하는 IGR에서 HIV env 유전자를 함유하는 재조합 MVA를 초래한다.

[0164] MVA의 IGR07-08 삽입부위에 PrM2의 삽입

[0165] 첫번째로, 상술한 프로토콜에 따라 MVA에 의해 세포를 감염시키고 리포터 유전자로서 선별을 위한 gpt 유전자 및 BFP를 함유하는 삽입 벡터 pBN34(도 3d)에 의해 부가적으로 형질감염시켰다. 생성된 재조합 바이러스를 실시예 1에 개시된 바와 같이 마이코페놀 산에 의한 선별하에서 3회 플라크 정제에 의해 정제시켰다.

[0166] 생성된 재조합 바이러스는 예상되는 삽입부위를 선택적으로 증폭시키는 프라이머 쌍을 사용한 표준 PCR 에세이에 의해 확인하였다. IGR07-08 삽입부위를 증폭시키기 위해, 프라이머 쌍 BN902(ctggataatacgaggacgtg; 서열번호 16) 및 BN903(gacaattatccgacgcaccg; 서열번호 17)를 사용하였다. 엠프티 벡터 바이러스 MVA의 DNA가 증폭되는 경우, 예상되는 PCR 단편은 190 뉴클레오티드(nt) 길이이며, IGR07-08 삽입부위에 통합된 뎅기 바이러스 PrM2 코딩 영역을 갖는 PrM4에 대한 재조합 MVA가 증폭되는 경우, 단편은 950bp일 것으로 예상된다. 상기 PCR 결과는 도 9a에서 20회의 바이러스 증폭 후, IGR07-08 삽입부위에 PrM2의 안정된 삽입을 명확하게 보여주었다. 재조합 MVA는 MVA-BN과 동일한 성장 특성을 보여준다. 이는 닭 배아 섬유아세포(CEF 세포)에서 복제되며 포유류 세포에서 약하게 성장한다(도 9b).

[0167] MVA의 IGR07-08 삽입부위에 HIV env의 삽입

첫번째로, 상술한 프로토콜에 따라 MVA에 의해 세포를 감염시키고 리포터 유전자로서 선별을 위한 NPT 유전자 및 EGFP를 함유하는 삽입 벡터 pBN56(도 3e)에 의해 부가적으로 형질감염시켰다. 생성된 재조합 바이러스를 G418 선별하에서 6회 플라크 정제에 의해 정제시켰다.

[0169] 생성된 재조합 바이러스는 예상되는 삽입부위를 선택적으로 증폭시키는 프라이머 쌍을 사용한 표준 PCR 에세이에 의해 확인하였다. IGR07-08 삽입부위를 증폭시키기 위해, 프라이머 쌍 BN902(ctggataatacgaggacgtg; 서열번호 16) 및 BN903 (gacaattatccgacgcaccg, 서열번호 17)를 사용하였다. 엠프티 벡터 바이러스 MVA의 DNA가 증폭되는 경우, 예상되는 PCR 단편은 190 뉴클레오티드(nt) 길이이며, IGR07-08 삽입부위에 통합된 템기 바이러스 PrM2 코딩 영역을 갖는 PrM4에 대한 재조합 MVA가 증폭되는 경우, 단편은 2.6kb일 것으로 예상된다. 상기 PCR은 도 10에서 20회의 바이러스 증폭 후, IGR07-08 삽입부위에서 env의 안정된 삽입을 명확하게 보여주었다. 재조합 MVA는 MVA-BN과 동일한 성장 특성을 보여준다. 이는 닦 배아 섬유아세포(CEF 세포)에서 복제되며 포유류 세포에서 약하게 성장한다(도 9b).

[0170] 실시예 4

[0171] 삽입 벡터 pBNX79, pBNX86, pBNX88, pBN34 및 pBN56

[0172] ORF 044L 및 045L간의 신규한 삽입 부위(제놈 위치 37330)에 인접한 MVA 서열을 하기의 프라이머를 사용하여 관심을 가지고 있는 서열의 표준 PCR 증폭에 의해 분리하였다:

[0173] 플랑크 1을 분리시키기 위한 IGR44/45FLup(CGCGAGCTCATTTCTTAGCTAGAGTGATA; 서열번호 18) 및 IGR44/45F1end(AGGCCGCGGAGTGAAAGCTAGAGAGGG; 서열번호 19); 플랑크 2를 분리시키기 위한 IGR44/45F2up(CCGCTCGAGCGCGGATCCTAAACTGTATCGATTATT ; 서열번호 20) 및 IGR44/45F2end(CAGGGCCCTAAATGCGCTTCTCAAT; 서열번호 21).

[0174] 플랑크 1을 포함하는 PCR 단편은 제한 효소 SacII 및 SacI를 사용하여 처리시켰으며 pBluescript (Stratagene)와 같은 SacII/SacI 분해되고 인산기 제거된 염기성 벡터에 결찰시켰다.

[0175] 생성 플라스미드를 XhoI/ApaI 분해시키고, 인산기 제거시켜 플랑크 2를 포함하는 XhoI/ApaI 분해된 PCR 단편에 결찰시켰다.

[0176] 경우에 따라, IGR44/45F2up(CCGCTCGAGCGCGGATCCTAAACTGTATCGATTATT; 서열번호 20) 및 IGR44/45F2mid(TTTCTGCAGCCTCCTGGGTTGTATTAACG; 서열번호 22)을 사용한 PCR에 의해 분리되며 BamHI/PstI 분해되는 플랑크 2의 반복 서열을 생성되는 벡터의 BamHI/PstI 부위내로 삽입시켰다.

[0177] 수두 바이러스, 마커 유전자, 폴리-A-영역 및 경우에 따라 IRES 요소, 치료적으로 활성인 물질 또는 유전자 생성물과 같은 다른 유전자를 갖는 카세트를 포함하는 임의의 리포터 또는 치료적 유전자는 제한 분해 후 T4 DNA 폴리머라아제(Roche)에 의해 무단 말단으로 될 수 있으며 플라스미드 벡터의 적절한 클로닝 부위내로 삽입될 수 있다. 리포터 유전자 카세트를 고려하여, 플랑크 2 및 플랑크-2-반복간의 PstI, EcoRI, EcoRV, HindIII, AvaI 또는 XhoI 제한 효소 부위는 클로닝 부위로서 바람직하다. pBNX87(도 4b)의 작제를 위해, NPT/EGFP 선별 카세트를 pBNX80(도 4a)내에 삽입시켰다. 치료적 유전자 및 실시 가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 치료적 유전자에 대한 발현 단위를 고려할 때, 이 발현 단위는 PacI 부위내로 삽입되어 진다.

[0178] 이 실시예에 따른 벡터 작제물의 예에 대한 제한 지도는 도 4a 및 b(pBNX80, pBNX87)에 개시되어 있다.

[0179] 상기 벡터는 두개의 인접한 ORF간의 유전자내 영역에 외인성 서열을 갖는 상술한 프로토콜에 따른 재조합 MVA를 생성하는데 사용될 수 있다. pBN47(도 4c)의 작제를 위해, 템기바이러스 혈청형 3의 PrM은 pBNX87(도 4b)내로 클론화시켰다.

[0180] MVA의 IGR44-45 삽입부위에 PrM3의 삽입

[0181] 첫번째로, 상술한 프로토콜에 따른 MVA에 의해 세포를 감염시키고 리포터 유전자로서 선별을 위한 NPT 유전자 및 EGFP를 함유하는 삽입 벡터 pBN47(도 3d)에 의해 부가적으로 형질감염시켰다. 생성된 재조합 바이러스를 G418 선별하에서 3회 플라크 정제에 의해 정제시켰다.

[0182] 생성된 재조합 바이러스는 예상되는 삽입부위를 선택적으로 증폭시키는 프라이머 쌍을 사용한 표준 PCR 에세이에 의해 확인하였다. IGR44-45 삽입부위를 증폭시키기 위해, 프라이머 쌍 BN904(cgttagacaacacaccgacgtgg; 서

열번호 23) 및 BN905(cggataaaaattttggaaag; 서열번호 24)를 사용하였다. 엠프티 벡터 바이러스 MVA의 DNA가 증폭되는 경우, 예상되는 PCR 단편은 185 뉴클레오티드(nt) 길이이며, IGR44-45 삽입부위에 통합된 뎅기 바이러스 PrM3 코딩 영역을 갖는 PrM3에 대한 재조합 MVA가 증폭되는 경우, 단편은 850bp일 것으로 예상된다. 상기 PCR 결과는 도 11a에서 19회의 바이러스 증폭 후, IGR44-45 삽입부위에서 PrM3의 안정된 삽입을 명확하게 보여주었다. 재조합 MVA는 MVA-BN과 동일한 성장 특성을 보여준다. 이는 닭 배아 섬유아세포(CEF 세포)에서 복제되며 포유류 세포에서 약하게 성장한다(도 11b).

[0183] 실시예 5

[0184] 삽입 벡터 pBNX90, pBNX92, pBNX88 및 pBN54

[0185] ORF 148R 및 149L간의 신규한 삽입 부위(개놈 위치 137496)에 인접한 MVA 서열은 하기의 프라이머를 사용하여 관심을 갖는 서열의 표준 PCR 증폭에 의해 분리하였다:

[0186] 플랑크 1을 분리시키기 위한 IGR148/149F1up(TCCCCGCGGGGACTCATAGATTATCGACG; 서열번호 25) 및 IGR148/149F1end(CTAGTCTAGACTAGTCTATTAATCCACAGAAATAC; 서열번호 26); 플랑크 2를 분리시키기 위한 IGR148/149F2up(CCCAAGCTGGCGGGATCCCGTTCTAGTATGGGATC; 서열번호 27) 및 IGR148/149F2end(TAGGGCCCGTTATTGCCATGATAGAG; 서열번호 28).

[0187] 플랑크 1을 포함하는 PCR 단편은 제한 효소 SacII 및 XbaI를 사용하여 처리시켰으며 pBluescript(Stratagene)와 같은 SacII/XbaI 분해되고 인산기 제거된 염기성 벡터에 결찰시켰다.

[0188] 생성 플라스미드를 HindIII/ApaI 분해시키고, 인산기 제거시켜 플랑크 2를 포함하는 HindIII/ApaI 분해된 PCR 단편에 결찰시켰다.

[0189] 경우에 따라, IGR148/149F2up(CCCAAGCTGGCGGGATCCCGTTCTAGTATGGGATC; 서열번호 27) 및 IGR148/149F2mid(TTTCTGCAGTGTATAATACCACGAGC; 서열번호 29)을 사용한 PCR에 의해 분리되며 BamHI/PstI 중해되는 플랑크 2의 반복 서열을 생성되는 벡터의 BamHI/PstI 부위내로 삽입시켰다.

[0190] 수두 바이러스, 마커 유전자, 폴리-A-영역 및 경우에 따라 IRES 요소, 치료적으로 활성인 물질 또는 유전자 생성물과 같은 다른 유전자를 갖는 카세트를 포함하는 임의의 리포터 또는 치료적 유전자는 제한 분해 후 T4 DNA 폴리미라아제(Roche)에 의해 무단 말단으로 될 수 있으며 플라스미드 벡터의 적절한 클로닝 부위내로 삽입될 수 있다. pBNX92(도 5b)의 작제를 위해, gpt/BFP 발현 카세트를 이 클로닝 부위에 삽입시켰다. 리포터 유전자 카세트를 고려하여, 플랑크 2 및 플랑크-2-반복간의 PstI, EcoRI, EcoRV, HindIII, AvaI 또는 XhoI 제한 효소 부위는 클로닝 부위로서 바람직하다. 치료적 유전자 및 작용 가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 치료적 유전자에 대한 발현 단위를 고려할 때, 이 발현 단위는 PacI 부위내로 삽입되어 진다. pBN56(도 5c)의 작제를 위해, 뎅기 바이러스 PrM1을 PacI 부위내로 삽입시켰다.

[0191] 이 실시예에 따른 벡터 작제물의 예에 대한 제한 맵은 도 5a 및 b(pBNX90, pBNX92)에 개시되어 있다.

[0192] 상기 벡터는 두개의 인접한 ORF간의 유전자내 영역에 외인성 서열을 갖는 상술한 프로토콜에 따른 재조합 MVA를 생성하는데 사용될 수 있다. 뎅기 바이러스 PrM1을 발현하는 MVA의 생성을 위해, pBN54(도 5c)를 상동성 재조합에 사용하였다.

[0193] MVA의 IGR148-149 삽입부위에 PrM1의 삽입

[0194] 첫번째로, 상술한 프로토콜에 따라 MVA에 의해 세포를 감염시키고 리포터 유전자로서 선별을 위한 gpt 유전자 및 BFP를 함유하는 삽입 벡터 pBN54(도 5c)에 의해 부가적으로 형질감염시켰다. 생성된 재조합 바이러스를 마이코페놀 산을 사용한 선별하에서 3회 플라크 정제에 의해 정제시켰다.

[0195] 생성된 재조합 바이러스는 예상되는 삽입부위를 선택적으로 증폭시키는 프라이머 쌍을 사용한 표준 PCR 에세이에 의해 확인하였다. IGR148-149 삽입부위를 증폭시키기 위해, 프라이머 쌍 BN960 (ctgtataggtatgtcccttgcc, 서열번호 30) 및 BN961 (gcttagtagacgttggaa, 서열번호 31)를 사용하였다. 엠프티 벡터 바이러스 MVA의 DNA가 증폭되는 경우, 예상되는 PCR 단편은 450 뉴클레오티드(nt) 길이이며, IGR148-149 삽입부위에 통합된 뎅기 바이러스 PrM1 코딩 영역을 갖는 PrM1에 대한 재조합 MVA가 증폭되는 경우, 단편은 1200bp일 것으로 예상된다. 상기 PCR 결과는 도 12a에서 23회의 바이러스 증폭 후, IGR148-149 삽입부위에서 PrM1의 안정된 삽입을 명확하게 보여주었다. 재조합 MVA는 MVA-BN과 동일한 성장 특성을 보여준다. 이는 닭 배아 섬유아세포(CEF 세포)에서 복제되며 포유류 세포에서 약하게 성장한다(도 12b).

도면의 간단한 설명

[0099]

도 1: I4L ORF 뒤의 삽입부위와 측면을 접하는 약 600bp의 MVA 서열을 포함하는 벡터 작제물 pBNX39(도 1a), pBNX70(도 1b) 및 pBN84(도 1c)의 제한 지도. 플라스미드는 측면 서열즉, 플랑크 1(F1 I4L-I5L)과 플랑크 2(F2 I4L-I5L)사이에 있는 수두 바이러스 프로모터 P의 전사 조절에 있는 외인성 DNA(각각 Ecogpt 및 hBFP)를 추가적으로 포함한다. F1rpt는 생성된 재조합 바이러스로부터 리포터 카세트의 결실을 허용하는 플랑크 1의 반복 서열을 나타낸다. pBNX84(도 1c)는 뎅기 바이러스 NS1 단백질(NS1 DEN)을 부가적으로 암호화한다. 다른 약어의 의미는 다음과 같다: AmpR+ 암피실린 내성 유전자; bps=염기 쌍.

[0100]

도 2: ORF 137L 뒤의 삽입부위의 측면에 위치하는 약 600bp의 MVA 서열을 포함하는 벡터 작제물 pBNX51(도 2a), pBNX67(도 2b), pBN27(도 2c)의 제한 지도(플랑크 1: F1136-137은 MVA 게놈의 위치 129340-129930에 대응한다; 플랑크 2: F2136-137은 MVA 게놈의 위치 129931-130540에 대응한다). 부가적으로 벡터 pBNX67(도 2b)는 측면 서열사이에 있는 수두 바이러스 프로모터 P의 전사 조절하에 있는 외인성 DNA(NPT II 유전자=네오마이신 내성)를 포함한다. F2rpt는 생성된 재조합 바이러스로부터 리포터 카세트의 결실을 허용하는 플랑크 2의 반복 서열을 나타낸다. pBN27(도 2c)는 수두 바이러스의 조절하에 있는 뎅기 바이러스 PrM4를 부가적으로 암호화한다. 다른 약어의 의미는 다음과 같다: AmpR+ = 암피실린 내성 유전자; bps = 염기 쌍; IRES = 내부 리보솜 진입 부위; EGFP = 향상된 녹색 형광 단백질에 대한 유전자.

[0101]

도 3: ORF 007R 및 008L 사이의 삽입부위의 측면에 위치하는 약 600bp의 MVA 서열을 포함하는 벡터 작제물 pBNX79(도 3a), pBNX86(도 3b), pBNX88(도 3c), pBN34(도 3d) 및 pBN56(도 3e)의 제한 지도(플랑크 1: F1 IGR 07-08은 MVA 게놈의 위치 12200에서 개시한다; 플랑크 2: F2 IGR 07-08은 MVA 게놈의 위치 13400에서 정지한다). F2rpt는 생성된 재조합 바이러스로부터 리포터 카세트의 결실을 허용하는 플랑크 2의 반복 서열을 나타낸다. 부가적으로 pBNX88(도 3c) 및 pBN34(도 3d)는 측면 서열사이에 있는 수두 바이러스 프로모터 P의 전사 조절하에 있는 외인성 DNA(각각 BEF + gpt 및 NPT II + EGFP)를 포함한다. F2rpt는 생성된 재조합 바이러스로부터 리포터 카세트의 결실을 허용하는 플랑크 2의 반복 서열을 나타낸다. pBN56(도 3e)는 HIV-1 env 단백질을 부가적으로 암호화하며 또 pBN34(도 3d)는 수두 바이러스의 조절하에 있는 뎅기 바이러스 PrM2 코딩 서열을 함유한다. 다른 약어의 의미는 다음과 같다: AmpR+ = 암피실린 내성 유전자; bps = 염기 쌍.

[0102]

도 4: ORF 044L 및 045L 사이의 삽입부위의 측면에 위치하는 약 600/640bp의 MVA 서열을 포함하는 벡터 작제물 pBNX80(도 4a), pBNX87(도 4b) 및 pBN47(도 4c)의 제한 지도(플랑크 1: F1 IGR 44-45는 MVA 게놈의 위치 36730에서 개시한다; 플랑크 2: F2 IGR 44-45는 MVA 게놈의 위치 37970에서 정지한다). 부가적으로 벡터 pBNX87(도 4b)는 측면 서열사이의 수두 바이러스 프로모터 P의 전사 조절하에 있는 외인성 DNA(NPT II + EGFP)를 포함한다. F2rpt는 생성된 재조합 바이러스로부터 리포터 카세트의 결실을 허용하는 플랑크 2의 반복 서열을 나타낸다. pBN47(도 4c)는 수두 바이러스의 조절하에 있는 뎅기 바이러스 PrM3를 부가적으로 암호화한다. 다른 약어의 의미는 다음과 같다: AmpR+ = 암피실린 내성 유전자; bps = 염기 쌍.

[0103]

도 5: ORF 148R 및 149L 사이의 삽입부위의 측면에 위치하는 약 596/604bp의 MVA 서열을 포함하는 벡터 작제물 pBNX90(도 5a), pBNX92(도 5b) 및 pBN54(도 5c)의 제한 지도(플랑크 1: F1 IGR 148-149는 MVA 게놈의 위치 136900에서 개시한다; 플랑크 2: F2 IGR 148-149는 MVA 게놈의 위치 138100에서 정지한다). 부가적으로 벡터 pBNX92(도 5b)는 측면 서열사이의 수두 바이러스 프로모터 P의 전사 조절하에 있는 외인성 DNA(gpt + BEF)를 포함한다. pBN54(도 5c)는 뎅기 바이러스 PrM1을 부가적으로 암호화한다. F2rpt는 생성된 재조합 바이러스로부터 리포터 카세트의 결실을 허용하는 플랑크 2의 반복 서열을 나타낸다. 다른 약어의 의미는 다음과 같다: AmpR+ = 암피실린 내성 유전자; bps = 염기 쌍.

[0104]

도 6: MVA의 유전자내 삽입부위의 개략도(Genebank 수탁번호. U94848).

[0105]

도 7: IGR I4L-I5L에 삽입된 뎅기 바이러스 NS1을 갖는 재조합 MVA에서 IGR I4L-I5L의 PCR 분석. 레인 “BN”은 MVA-BN 엔프티 벡터를 사용한 PCR 생성물을 나타낸다. NS1 재조합 MVA를 사용하면 더 큰 크기의 단편을 검출할 수 있다(1, 2, 3, 4: 상이한 농도의 DNA). M = 문자량 표지, H₂O = 물 음성 대조용

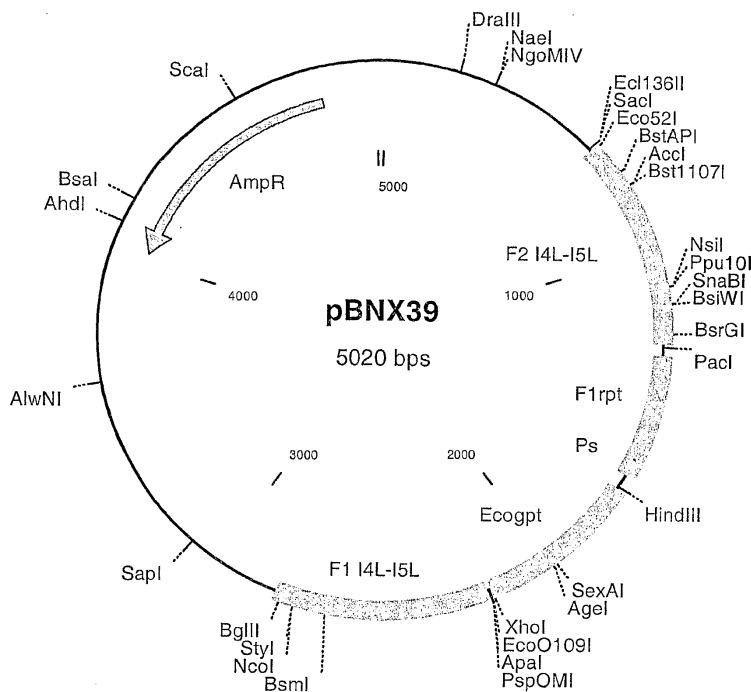
[0106]

도 8: 도 8a: IGR 136-137에 삽입된 뎅기 바이러스 PrM4를 갖는 재조합 MVA에서 IGR 136-137의 PCR 분석. 레인 “BN”은 MVA-BN 엔프티 벡터를 사용한 PCR 생성물을 나타낸다. PrM4 재조합 MVA를 사용하면 더 큰 크기의 단편이 검출가능하다(mBN23, 1/10, 1/100: DNA의 다른 농도). M = 문자량 표지, H₂O = 물 음성 대조용, pBN27 = 플라스미드 양성 대조용.

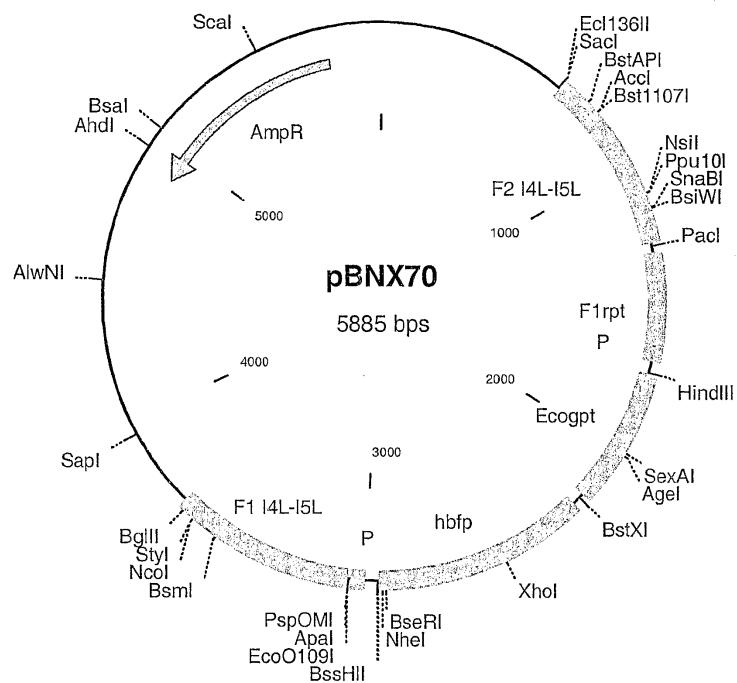
- [0107] 도 8b: MVA-BN 엠프티 벡터 및 IGR 136-137에 삽입된 PrM4를 갖는 재조합 MVA에 대한 다단계 성장 곡선(MVA-mBN23).
- [0108] 도 9: 도 9a: IGR 07-08에 삽입된 뎅기 바이러스 PrM2를 갖는 재조합 MVA에서 IGR 07-08의 PCR 분석. 레인 3은 MVA-BN 엠프티 벡터를 사용한 PCR 생성물을 나타낸다. PrM2 재조합 MVA를 사용하면 더 큰 크기의 단편을 검출할 수 있다(레인 2). M = 문자량 표지, 레인 1 = 물 음성 대조용.
- [0109] 도 9b: MVA-BN 엠프티 벡터 및 IGR 07-08에 삽입된 PrM2를 갖는 재조합 MVA에 대한 다단계 성장 곡선(MVA-mBN23).
- [0110] 도 10: IGR 07-08에 삽입된 HIV env를 갖는 재조합 MVA에서 IGR 07-08의 PCR 분석. 레인 “BN”은 MVA-BN 엠프티 벡터를 사용한 PCR 생성물을 나타낸다. PrM2 재조합 MVA를 사용하면 더 큰 크기의 단편이 검출 가능하다(레인 1, 2, 3). M = 문자량 표지, - = 물 음성 대조용, + = 플라스미드 양성 대조용.
- [0111] 도 11: 도 11a: IGR 44-45에 삽입된 뎅기 바이러스 PrM3를 갖는 재조합 MVA에서 IGR 44-45의 PCR 분석. 레인 “BN”은 MVA-BN 엠프티 벡터를 사용한 PCR 생성물을 나타낸다. PrM3 재조합 MVA를 사용하면 더 큰 크기의 단편을 검출할 수 있다(레인 1-4 DNA의 상이한 농도). M = 문자량 표지, - = 물 음성 대조용, + = 플라스미드 양성 대조용.
- [0112] 도 11b: MVA-BN 엠프티 벡터 및 IGR 44-45에 삽입된 PrM3를 갖는 재조합 MVA에 대한 다단계 성장 곡선(MVA-mBN28).
- [0113] 도 12: 도 12a: IGR 148-149에 삽입된 뎅기 바이러스 PrM1을 갖는 재조합 MVA에서 IGR 44-45의 PCR 분석. 레인 “BN”은 MVA-BN 엠프티 벡터를 사용한 PCR 생성물을 나타낸다. PrM1 재조합 MVA를 사용하면 더 큰 크기의 단편이 검출 가능하다(레인 1). M = 문자량 표지, - = 물 음성 대조용, + = 플라스미드 양성 대조용.
- [0114] 도 12b: MVA-BN 엠프티 벡터 및 IGR 44-45에 삽입된 PrM1을 갖는 재조합 MVA에 대한 다단계 성장 곡선(MVA-mBN33).

도면

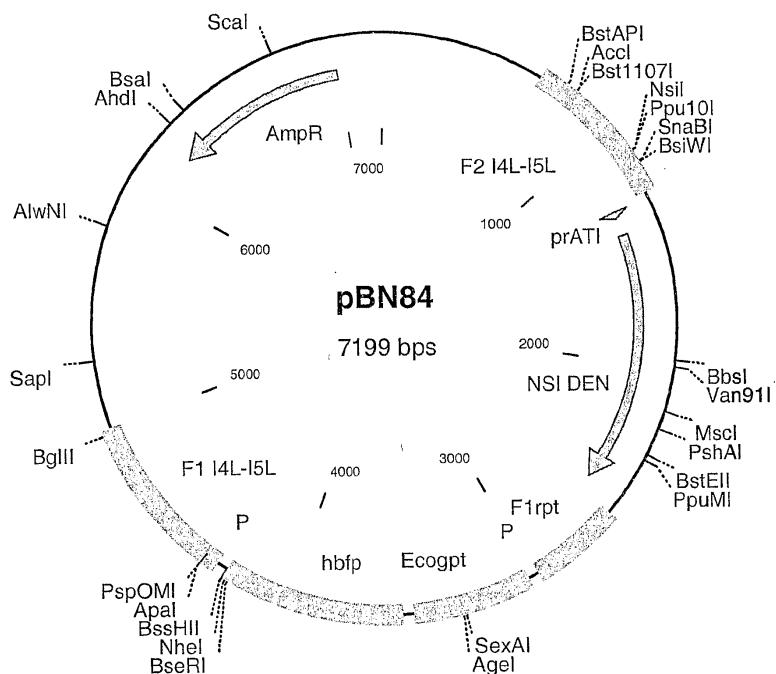
도면1a



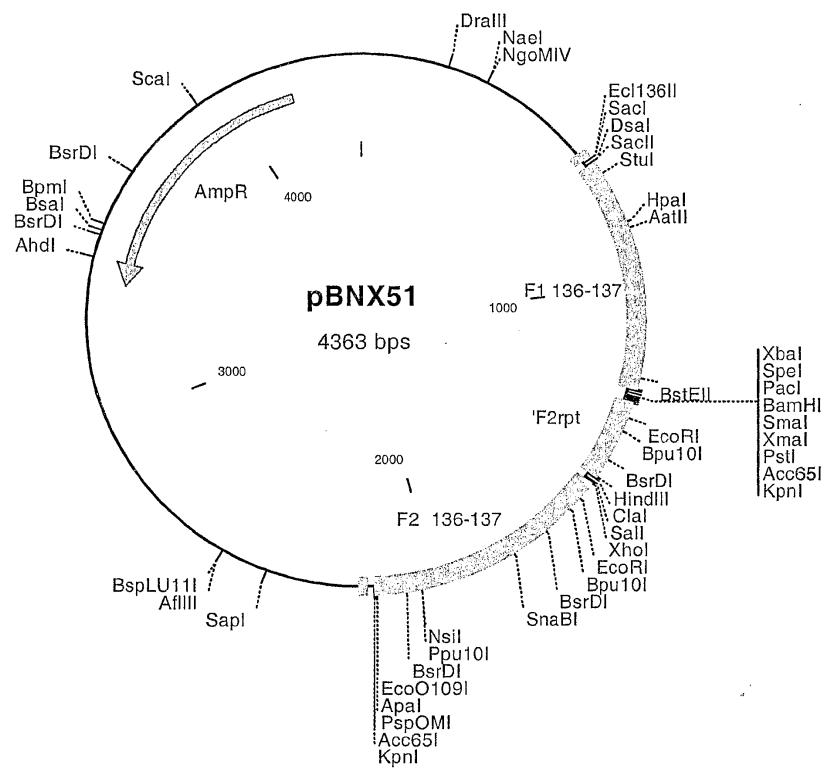
도면1b



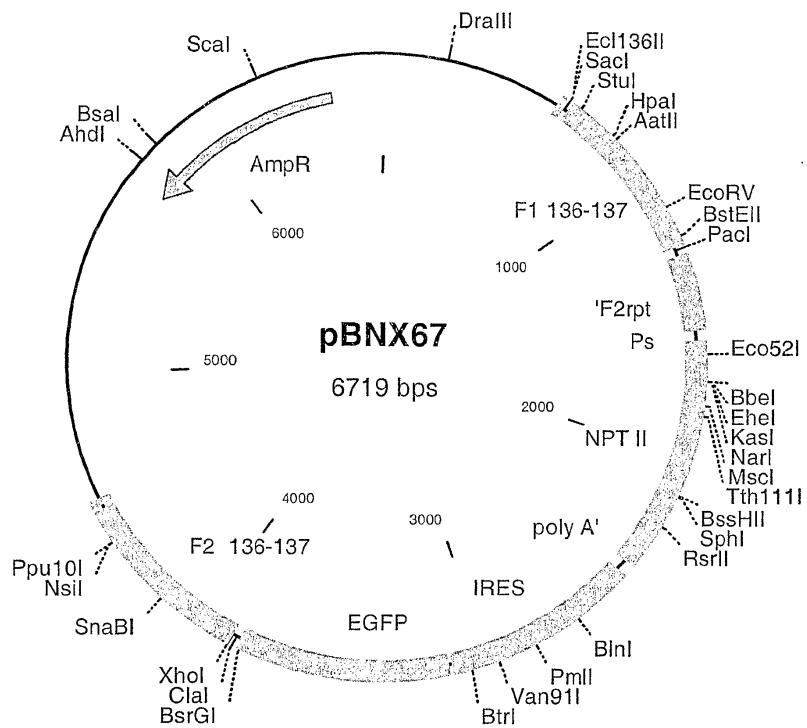
도면1c



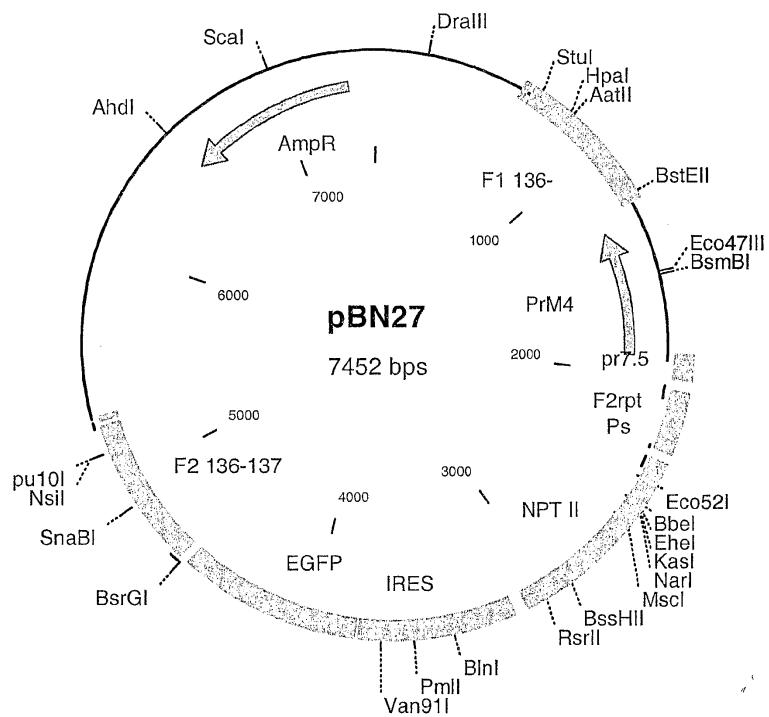
도면2a



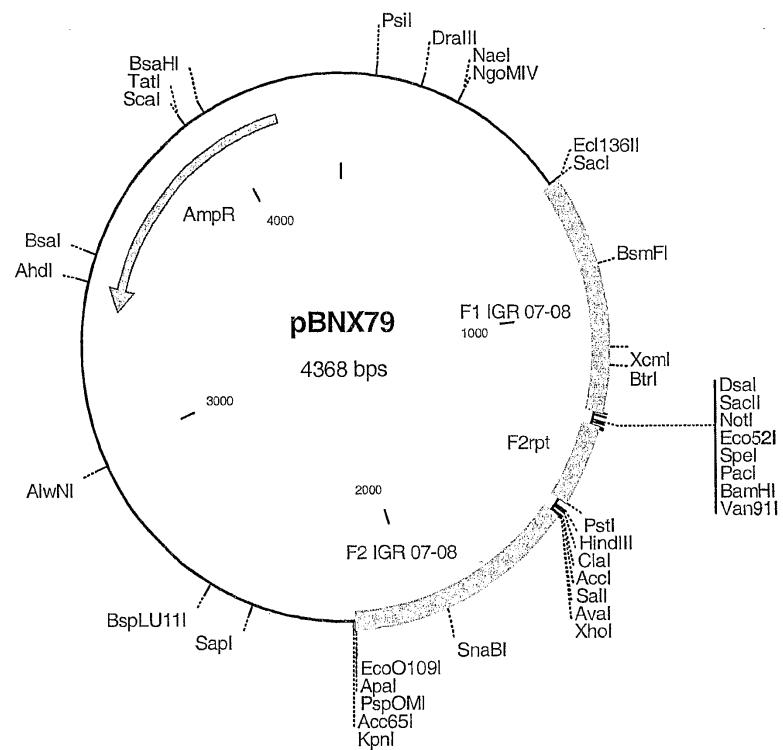
도면2b



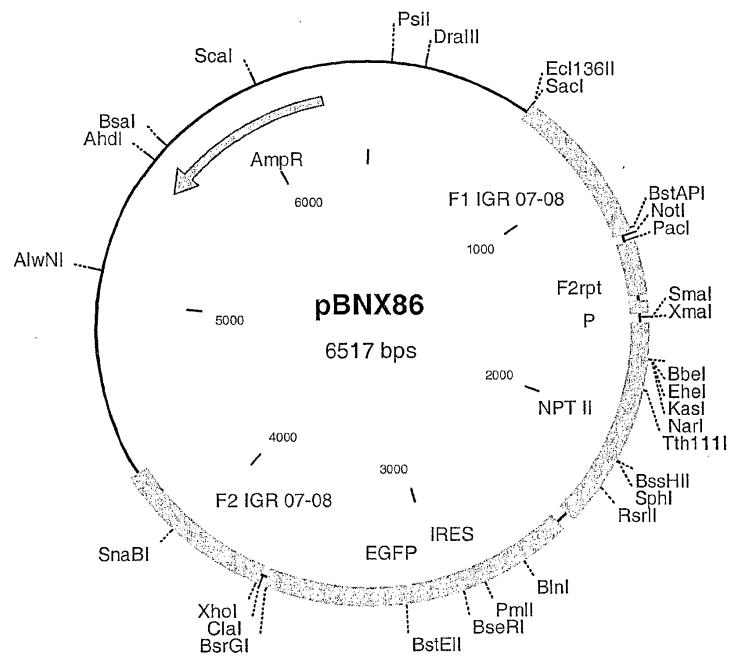
도면2c



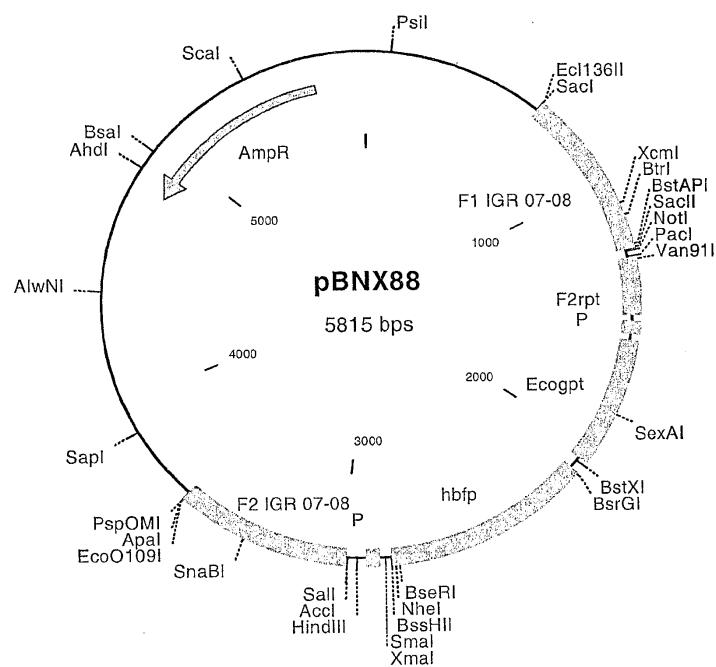
도면3a



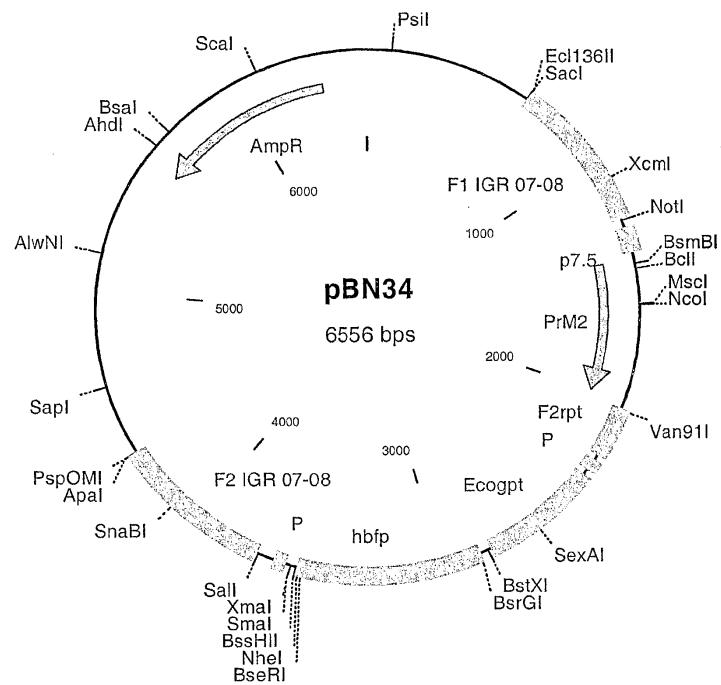
도면3b



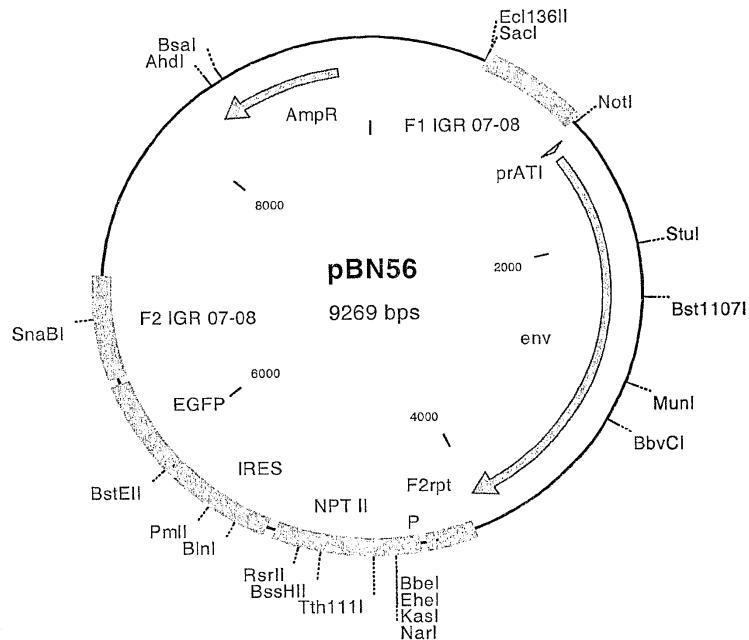
도면3c



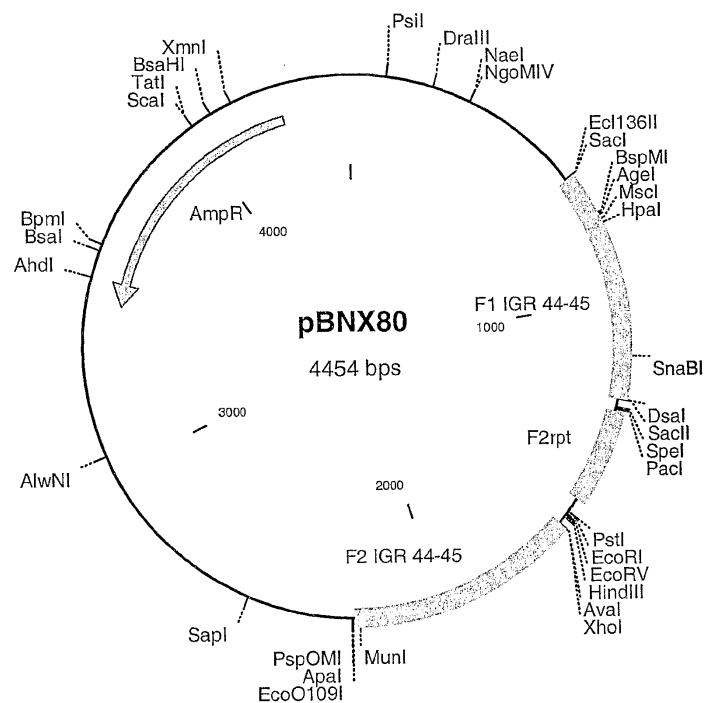
도면3d



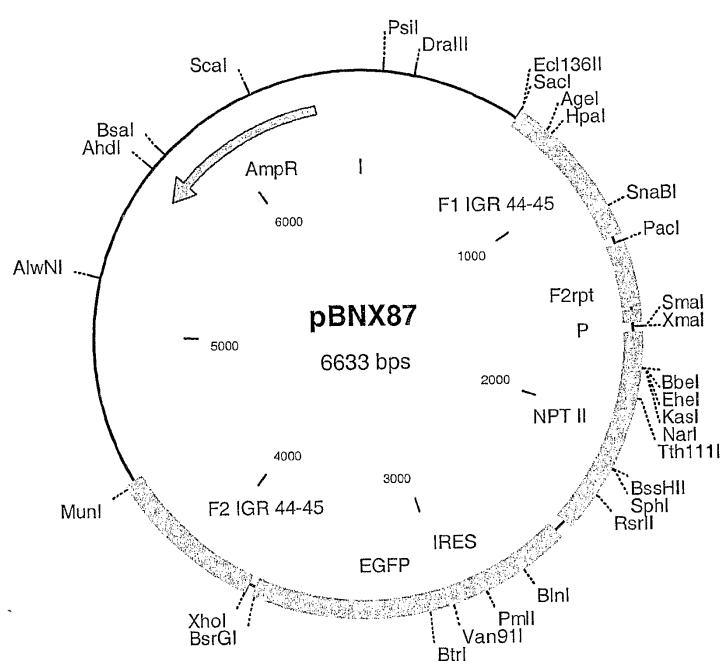
도면3e



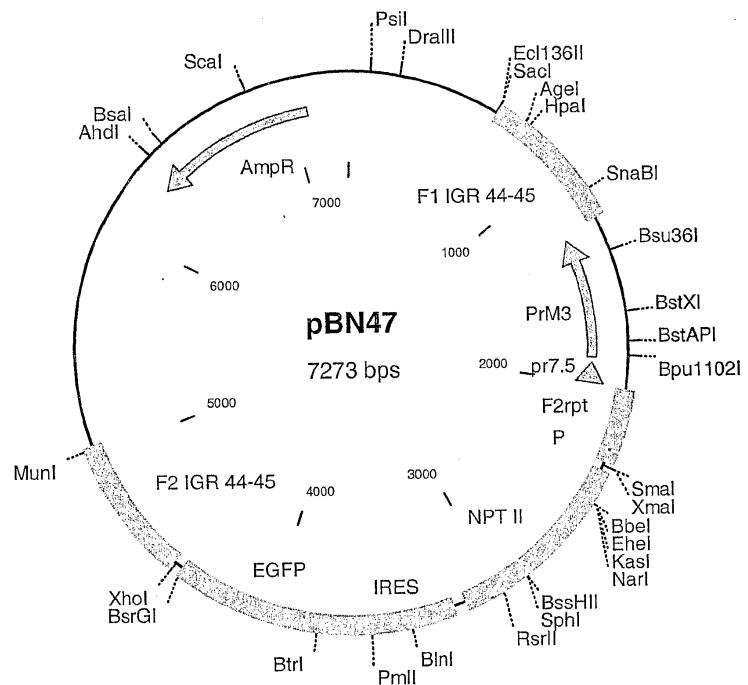
도면4a



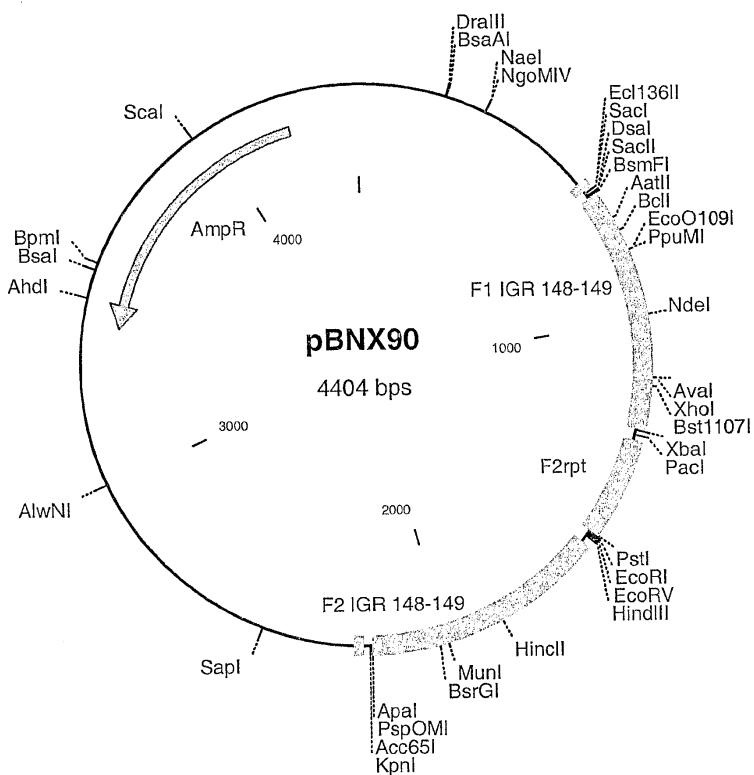
도면4b



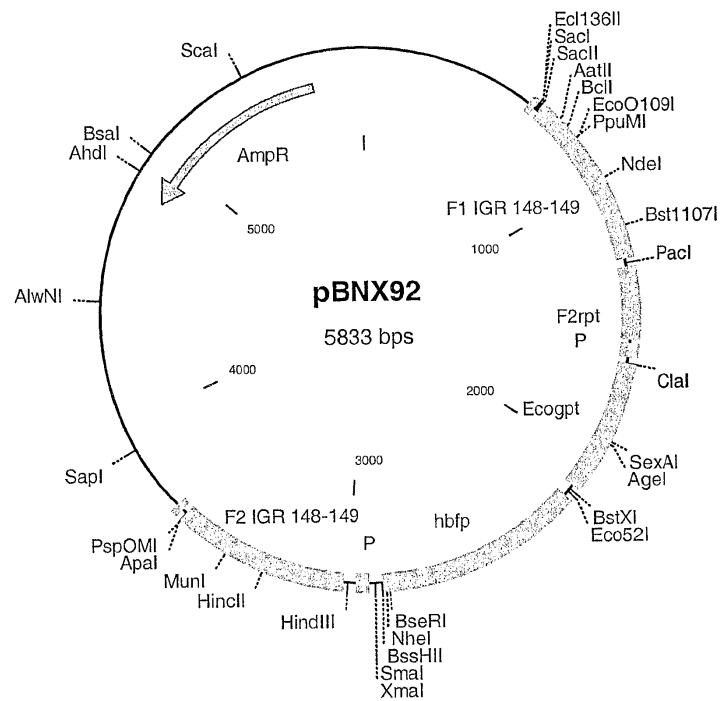
도면4c



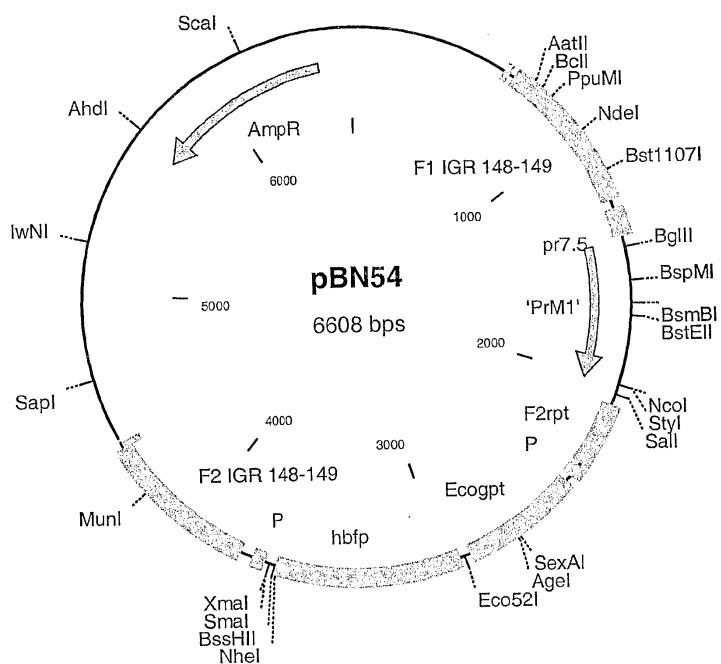
도면5a



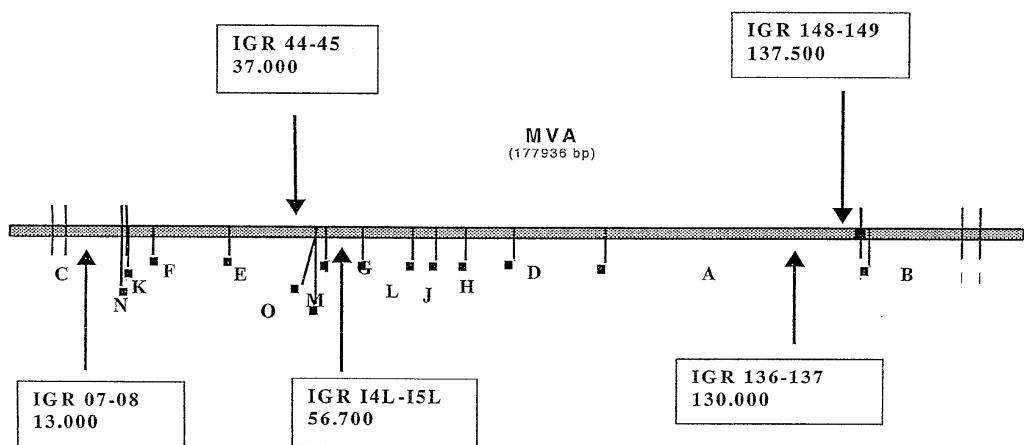
도면5b



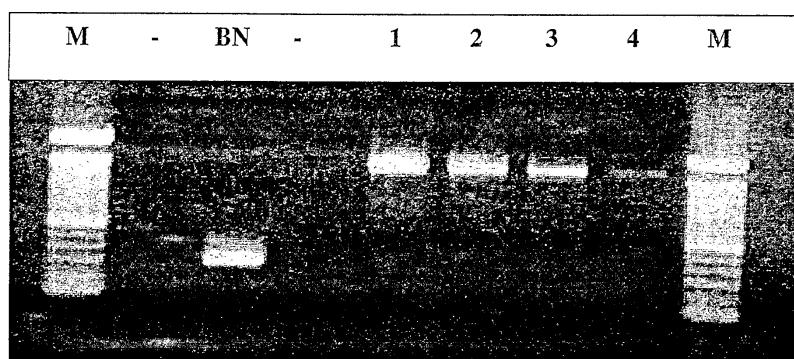
도면5c



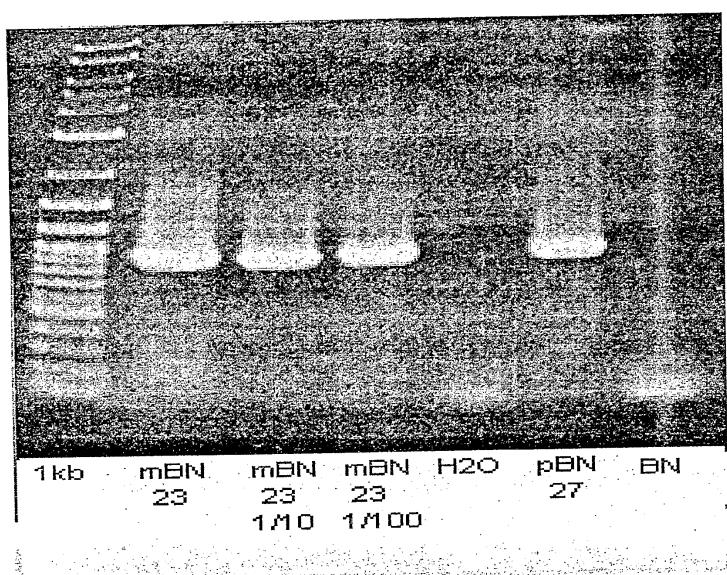
도면6



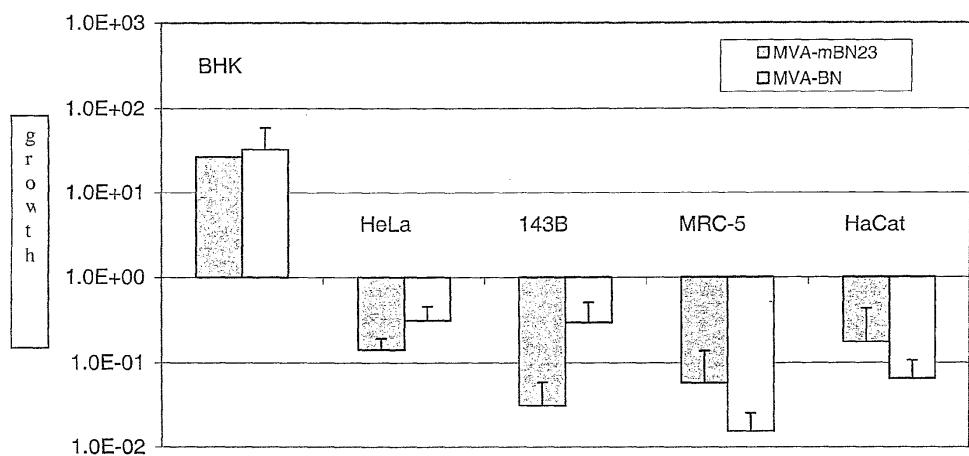
도면7



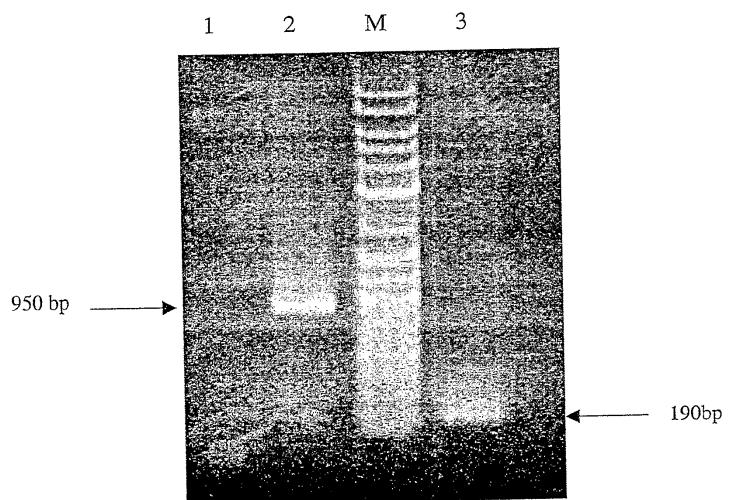
도면8a



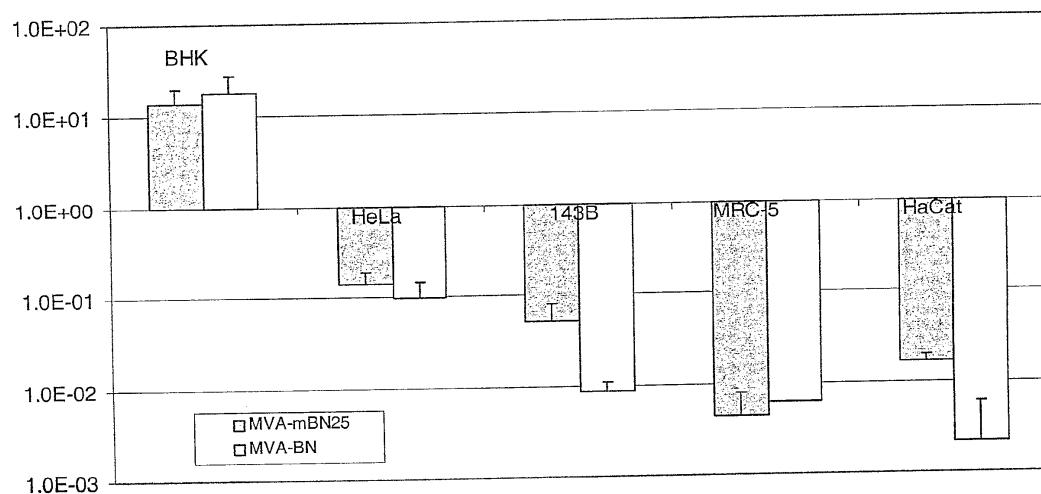
도면8b



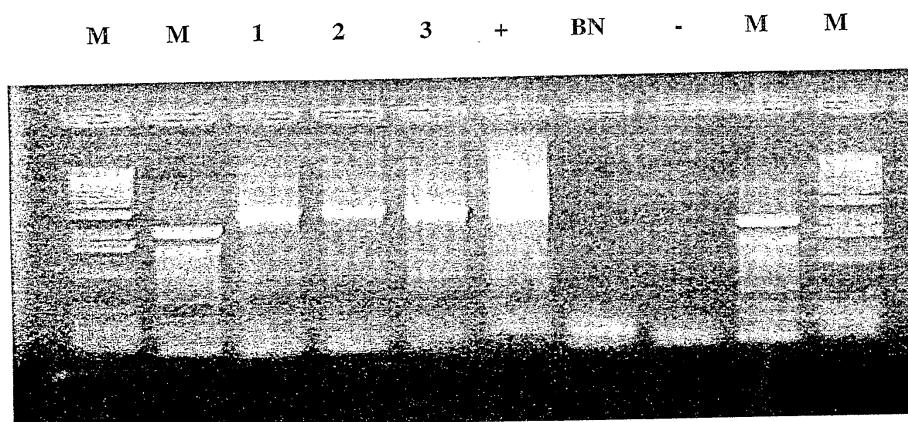
도면9a



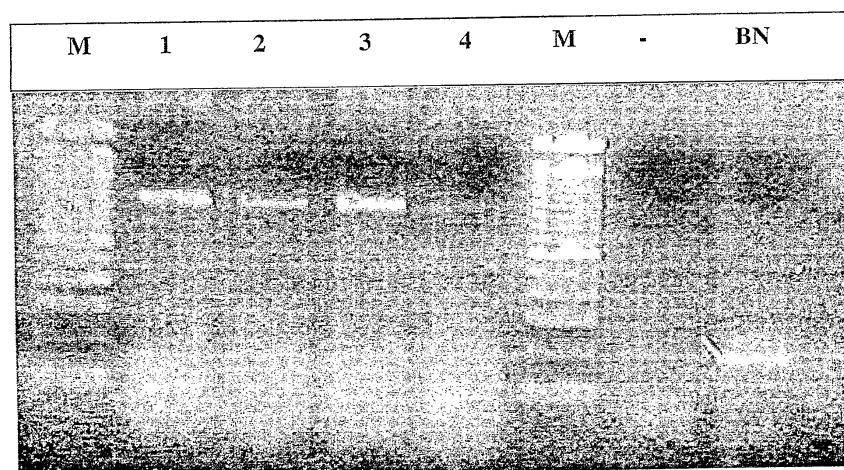
도면9b



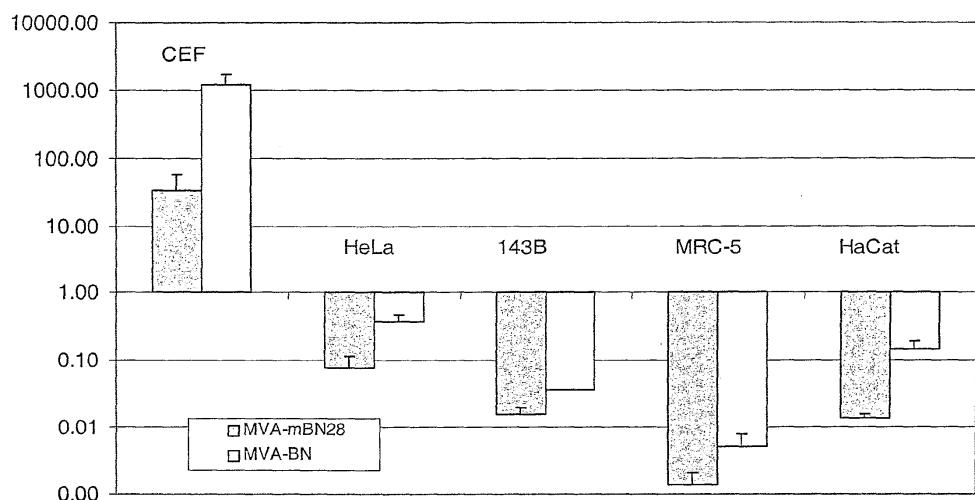
도면10



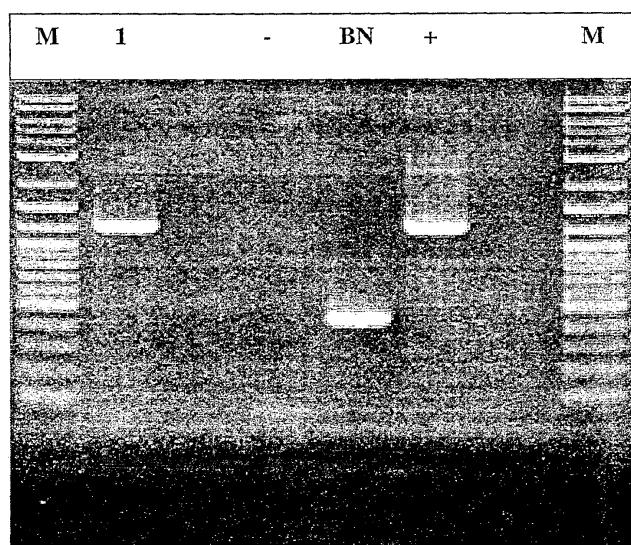
도면11a



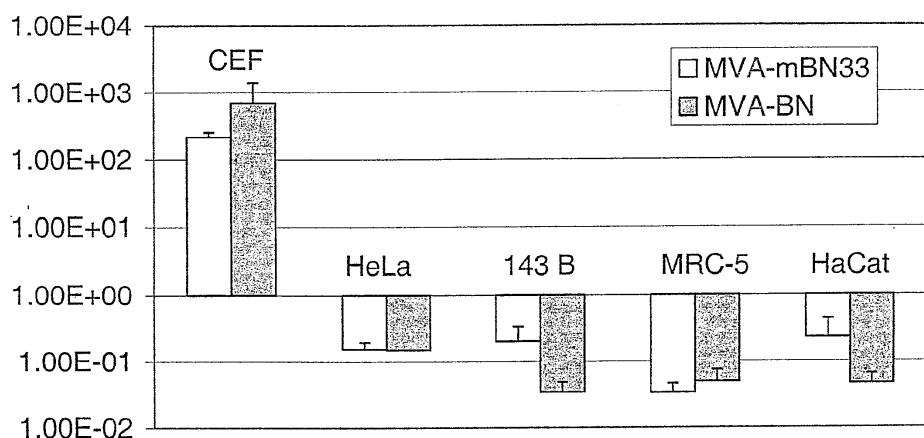
도면11b



도면12a



도면12b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Bavarian Nordic A/S

<120> Intergenic Regions as New Insertion Sites in the Genome of Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA)

<130> BN45PCT

<150> DK PA 2002 00752

<151> 2002-05-16

<160> 37

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> primer

<400> 1

caactctttt ctgtgattacc

20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> primer

<400> 2
cgatcaaagt caatctatg 19

<210> 3
<211> 33
<212> DNA
<213> primer

<400> 3
tcccccgcca gaggcgtaaa agttaaattt gat 33

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> primer

<400> 4
tgatctagaa tcgctcgtaa aaactgcgga ggt 33

<210> 5
<211> 29
<212> DNA
<213> primer

<400> 5
ccgctcgagt tcacgttcag cttcatgc 29

<210> 6
<211> 32
<212> DNA
<213> primer

<400> 6
cggggccct atttgtata atatctggta ag 32

<210> 7
<211> 35
<212> DNA
<213> primer

<400> 7
cggctgcagg gtacccac gttcagcctt catgc 35

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> primer

<400> 8
cggaagctt atatggtttta ggatattctg tttt 34

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> primer

<400> 9
cgttcgcatg ggtaacctcc 20

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> primer

<400> 10
gacgcatgaa ggctgaac 18

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> primer

<400> 11
cgcgagctca ataaaaaaaaa gttttac 27

<210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> primer

<400> 12
aggccgcgga tgcatgttat gcaaaatat 29

<210> 13
<211> 36
<212> DNA
<213> primer

<400> 13
ccgctcgagc gccggatccca atatatggca tagaac 36

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> primer

<400> 14
caggccctc tcatcgctt catg 24

<210> 15
<211> 28
<212> DNA
<213> primer

<400> 15
tttctgcagt gatatttata caataacta 28

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> primer

<400> 16
ctggataaat acgaggacgt g 21

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> primer

<400> 17
gacaattatc cgacgcacccg 20

<210> 18
<211> 29
<212> DNA
<213> primer

<400> 18
cgcgagctca ttcttagct agagtgata 29

<210> 19
<211> 27
<212> DNA
<213> primer

<400> 19
aggccgcgga gtgaaagcta gagaggg 27

<210> 20
<211> 36
<212> DNA
<213> primer

<400> 20
ccgctcgagc gcggatccta aactgtatcg attatt 36

<210> 21
<211> 26
<212> DNA
<213> primer

<400> 21
caggccccct aatgcgcctt ctcaat 26

<210> 22
<211> 31
<212> DNA
<213> primer

<400> 22
 tttctgcagc ctccctgggt ttgttattaac g 31

<210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> primer

<400> 23
 cgtagacaa cacaccgacg atgg 24

<210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> primer

<400> 24
 cggatgaaaa attttggaa g 21

<210> 25
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> primer

<400> 25
 tcccccgggg gactcataga ttatcgacg 29

<210> 26
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> primer

<400> 26
 ctagtctaga ctatctatt aatccacaga aatac 35

<210> 27
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> primer

<400> 27
cccaagctt ggcgggatcc cgtttctagt atggggatc 39

<210> 28
<211> 26
<212> DNA
<213> primer

<400> 28
tagggcccg tattgccatg atagag 26

<210> 29
<211> 26
<212> DNA
<213> primer

<400> 29
tttctgcagt gtataatacc acgagc 26

<210> 30
<211> 22
<212> DNA
<213> primer

<400> 30
ctgtataggt atgtcctctg cc 22

<210> 31
<211> 18
<212> DNA
<213> primer

<400> 31
gctagtagac gtggaaga 18

<210> 32
<211> 1192
<212> DNA
<213> vaccinia virus

<220>
 <221> Fragment of ORF C 64L
 <222> (1)..(526)
 <223>

<220>
 <221> IGR 64-65
 <222> (527)..(608)
 <223>

<220>
 <221> Fragment of ORF C 65L
 <222> (609)..(1190)
 <223>

<400> 32
 caccccttat agatctgaga atggatgatt ctccagtcga aacatattct accatggatc 60
 cggttaattt gttgatgaag atggattcat ccttaaatgt tttctctgtat atagtttcca 120
 ccgaaagact atgcaaagaa ttggaaatgc gttccttgcg cttaatgtttt ccatagacgg 180
 cttctagaag ttgataacaac ataggactag ccgcggtaac ttttatttt agaaagtatc 240
 catcgcttct atcttggtaa gatttatttt tataaagtttt agtctctcttccaaacataa 300
 taaaagtggaa agtcatttga ctagataaac tatcagtaag ttttatagag atagacgaa 360
 aatttagcgta ttgagaagca tttagtgcata cgtattcgat acatggatc tttagattac 420
 taatcgattt tgcatactct ataacacccg cacaagtcg tagagaatcg ctagatgcag 480
 taggtcttgg tgaagttca actctttct tgattacctt actcatgatt aaacctaaat 540
 aattgtactt tggatataa tgatataat tttcacttta tctcatttga gaataaaaat 600
 gttttgttt aaccactgca tggatgtacag atttcgaaat cgcaaacccac cagtggttt 660

attttatect tgtccaatgt gaattgaatg ggagcggatg cgggttcgt acgttagatag 720

tacattcccg ttttagacc gagactccat ccgtaaaaat gcatactcgt tagttgaa 780

taactcggat ctgctatatg gatattcata gattgactt gatcgatgaa ggctccctg 840

tctgcagcca ttttatgt cgttttgt ggaattccc aaatagttt ataaactcgc 900

ttaatatctt ctggaagggt tgtattctga atggatccac catctccat aatcctattc 960

ttgatctcat cattccataa tttctctcg gttaaaactc taaggagatg cggatatact 1020

acttgaatt ctccagacaa tactctccga gtgtaaatat tactggata cggttccacc 1080

gactcattat ttcccaaata ttgagcagtt gatgcagtcg gcataggtgc caccaataaa 1140

ctatttctaa gaccgtatgt tctgattta tcttttagag gttcccaatt cc 1192

<210> 33

<211> 1200

<212> DNA

<213> vaccinia virus

<220>

<221> Fragment of ORF 135R

<222> (1)..(96)

<223>

<220>

<221> ORF C 136L

<222> (101)..(298)

<223>

<220>

<221> IGR 136-137

<222> (299)..(883)

<223>

<220>

<221> Fragment of ORF C 137L

<222> (884)..(1198)

<223>

| | |
|---|------|
| <400> 33 | |
| agaggcgtaa aagttaaatt agatttcgaa cgaaggccctc ctgcgttta taaaccatta | 60 |
| gataaagttg atctcaaacc gtctttctg gtgtaatatt ctagtttgtt agtagataca | 120 |
| tatcaatatc atcaaattcg agatccgaat tataaaatgg gcgtggattt ttaactatag | 180 |
| aatcgacgt ctgatattcg aaaatctgtg gagttttagg tttggtgga ggtgtactg | 240 |
| ctacttggga tactgaagtc tgatattcg aaagctgggg gatgttctgg ttgcacatcc | 300 |
| accgatggtg tcacatcact aatcggttcg gtaacgtctg tggacgatgg aggcaccact | 360 |
| tctacaggtt ctggttctt atcctcagtc atcaacggag ctacttaat gcgagggaaat | 420 |
| gtataatttgc gtaatggttt ctcatgtgaa tctgaagaag aggtaaagata tctactagaa | 480 |
| agataaccgat cacgttctag ttctctttt tagaacttaa cttttctt ctccgcatct | 540 |
| agttgatatt ccaacctt ctcgttcgca tgggttacct ccgcaggttt tacgagcgtt | 600 |
| ttcacgttca gccttcatgc gtcttatagc atgaattcgc ttatcggtt cgggtttagc | 660 |
| ttctgtcacc ttagcaattc cttttttatt aaactctaca taatcatatc catttctatt | 720 |
| gtttgttcta atataaacgaa gtatagcattt attgctaaat tttcaatag tatcgaaaac | 780 |
| agaatatcct aaaccatata atatatattc aggaacactc aaactaaatg tccaggattc | 840 |
| tcctaaatac gtaaacttta atagtgcgaa atcattcaa aatctaccac ttatagatag | 900 |
| atagatagta cttaaatgcg tttttttttt tacctatctc tttttttttt aaaccggcat | 960 |
| tacgatcata tttttttttt tttttttttt tttttttttt aaatacatgg | 1020 |
| gtgatcctat aaacatgaat ttatctaa ttctcagagc tttttttttt tgaccgtgtt | 1080 |

atatttgctt acatgcatac ttgatacgtt cattaataag attttatca ttgctcgta 1140

tttcagaatc gtatataaa ggagtaccat cgtgattctt accagatatt atacaaaata 1200

<210> 34

<211> 1200

<212> DNA

<213> vaccinia virus

<220>

<221> Fragment of ORF 07R

<222> (1)..(338)

<223>

<220>

<221> IGR 07-08

<222> (339)..(852)

<223>

<220>

<221> Fragment of ORF C 08L

<222> (853)..(1200)

<223>

<400> 34

aataaaaaaa agtttacta atttaaaatt atttacattt tttcactgt ttagtcgagg 60

atatggaatt cgatcctgcc aaaatcaata catcatctat agatcatgta acaatattac 120

aatacataga tgaaccaaat gatataagac taacagtatg cattatcaca aaaataaatac 180

cacatttggc taatcaattt cgggcttggaa aaaaacgtat cgccggaagg gactatatga 240

ctaacttatac tagagataca ggaatacaac aatcaaact tactgaaact gtcaaaaaaa 300

tagaaacata tatggctat atatacacta caattttagtt attaatggta taaccgatgt 360

gattatcaat caatattaag aagggtggta aattggtaca tagctaataa tacctataca 420

cccaataata caacaaccat ttctgagttg gatatcatca aaatactgga taaatacgag 480
 gacgtgtata gagtaagtaa agaaaaagaa tgtgaattt gctatgaagt tgtttactca 540
 aaacgataga tacttggtt tattggattc gtgtaatcat atatttgca taacatgcat 600
 caatatatgg catagaacac gaagagaaac cggtgcgtcg gataattgtc ctatatgtcg 660
 tacccgtttt agaaacataa caatgagcaa gttaactaat aaataaaaag ttttaatttgt 720
 tgacgacgta tgtcgttatt ttttctcgta taaaagattha atttgattct aatataatct 780
 ttagtattgg ataaatatca attcaaatta attccattag attatatcat aaataaaaat 840
 agtagcacgc actacttcag ccaaataattc tttttgaaa cgccatctat cgtatgtagg 900
 acacaagtga acctataatg agcaaatttta ttagtatcggtt tacatgaag gactttacgt 960
 agagtggta ttccactatc tgtggtaacga acggttcat cttcttgat gccatcaccc 1020
 agatgttcta taaacttggt atccttgcc aaccaataca tatacgtaaa ctcaggcata 1080
 tgttccacac atcctgaaca atgaaattct ccagaagatg ttacaatgtc tagatttgg 1140
 catttggtttt caaccgcgtt aacatatgag tgaacacacc catacatgaa agcgatgaga 1200

<210> 35
 <211> 1200
 <212> DNA
 <213> vaccinia virus

<220>
 <221> Fragment of ORF C 44L
 <222> (1)..(375)
 <223>

<220>
 <221> IGR 44-45
 <222> (376)..(647)

<223>

<220>

<221> Fragment of ORF C 45L

<222> (648)..(1200)

<223>

<400> 35

atttcttagc tagagtata attcgttaa aacattcaa tgggttaaa tgatcgatc 60

taaaatccat atttctggt agtgttcta ccagcctaca tttgctccc gcaggtaccg 120

gtgcaaatgg ccacattdag ttaacataaa aacttataca tcctgttcta tcaacgatc 180

tagaaatatca tcggctatat cgctaaaatt ttcatcaaag tcgacatcac aacctaactc 240

agtcaatata ttaagaagtt ccatgatgtc atctcgatc atttctatata ccgtatccat 300

tgtagattgt tgaccgatta tcgagttaa atcattacta atactcaatc cttcagaata 360

caatctgtgt ttcatgttaa attttaggc ggtgtattta agttggtaga ttttcaatta 420

tgtatcaata tagcaacagt agttcttgct cctccttgat tctagcatcc tcttcattat 480

tttcttctac gtacataaac atgtccaata cgtagacaa cacaccgacg atggcggccg 540

ccacagacac gaatatgact aaaccgatga ccattaaaa acccctctc agtttcact 600

taaacgtat cgattattct tttagaacat gtataatata aaaacattat tctatttcga 660

atttaggctt ccaaaaattt ttcatccgtaa aaccgataat aatataatata gacttggtaa 720

tagtcggaat aaatagatta atgcttaaac tatcatcatc tccacgatata gagatataat 780

atttacattt ttttgctgt ttgcggaaactt tatcaatata cgttaatata aaccggaa 840

ggagatattt aaactgaggc tgggtggaaat gaaacgggtga atacaataat tcagataatg 900

taaaatcatg attccgtatt ctgatgat tagaactgct aatggatgtc gatggatgt 960

atctaggagt atctattta acaaagcatc gatttgcata tatacaatta tcattttat 1020

taatgttat ttatttcata ttcttaaaag gtttcatatt tatcaattct tctacattaa 1080

aaattccat tttaattta tgtagcccg caatactcct cattacgtt catttttgt 1140

ctataatatc cattttgttc atctcggtac atagattatc caattgagaa gcgcatttag 1200

<210> 36

<211> 1200

<212> DNA

<213> vaccinia virus

<220>

<221> Fragment of ORF 148R

<222> (1)..(596)

<223>

<220>

<221> IGR 148-149

<222> (597)..(855)

<223>

<220>

<221> Fragment of ORF C 149L

<222> (856)..(1200)

<223>

<400> 36

ctcatagatt atcgacgatt atactctgtt ttagttctgt cgaggatgt gttatctcta 60

tagataatga cgtcaatggc aaaaatattc taaccttcc cattgatcat gctgtatca 120

tatccccact gagtaatgt gtcgtatgtt gcaagggtcc tacaaccata ttggttgtta 180

aagcggatat acctagcaaa cgattggtaa catcggttac aaacgcacata ctgtatgtaa 240

acaatctatc actgattaat tattcgccgt tgtctgtatt cattattaga cgagttaccg 300
 actatttgga tagacacata tgcgatcaga tatttgcgaa taataagtgg tattccatta 360
 taaccatcga caataagcag tttcctattc catcaaactg tataggtatg tcctctgcca 420
 agtacataaa ttctagcatc gagcaagata cttaatacata tgtttgcata ctcgagcatc 480
 cattcgactt agtatacaaa aaaatgcagt cgtacaattc tgtacccatc aaggaacaaa 540
 tattgtacgg tagaattgtat aatataaata tgagcattag tatttgcgtg gattaataga 600
 tttctagat ggggatcatt aatcatctt aatctctaaa tacctcataa aacgaaaaaa 660
 aagctattat caaatactgt acggaatgga ttcattctt tctcttttta tgaaactctg 720
 ttgtatatct actgataaaa ctggaagcaa aaaatctgtat aaaaagaata agaataagat 780
 caaggattat tataaaataa caatagttcc tggttccctt tccacgtcta ctagctcgtg 840
 gtatttataca catgcctagt aatagtctt ttgcgttgac ggaaagcaga ctagaaataa 900
 caggctaaaa tggcagaca ccataatagt tcccaaccctt gataataaca gagtaccatc 960
 aacacattcc ttiaactca atcccaaacc caaaaccgtt aaaatgtatc cggccaaattt 1020
 atagtagata atgaggtgtt cagcgcatgt tgatttacac agtaaccaaa atgaaaatac 1080
 ttttagtaatt ataagaata tagatggtaa cgtcatcatc aacaatccaa taatatgcgg 1140
 gagagtaaac attgacggat aaaacaaaaa tgctccgcat aactctatca tggcaataac 1200

<210> 37
 <211> 1200
 <212> DNA
 <213> vaccinia virus

<220>
 <221> Fragment of ORF 018L
 <222> (1)..(399)

<223>

<220>

<221> IGR 018L-019L

<222> (400)..(607)

<223>

<220>

<221> Fragment of ORF C 019L

<222> (608)..(1081)

<223>

<220>

<221> non-coding region

<222> (1082)..(1200)

<223>

<400> 37

ggatgatgg tag tttttttttaaactttata ctttttacta atcatat tta gactgatgta 60

tggtaatag ttttaaaga gttcggttctc atcatcaga a taaatcaata tctctgtttt 120

tttggtaatc agatgttata cagcctcata tattacgtta tagaacgtgt catctacctt 180

attaactttc accgcatagt tggttgc aaaa tacggtaat cctttgaccc cgtcgattt 240

cgaccaatct gggcgataa tgaatctaaa cttttaatttcc ttgtatcat tcgaaataat 300

ttttagtttgc catccgtgt tatccctttt atgttaactgtt aaatttctca acgcaatac 360

tccattataata atgatgtcga attcgtgtg tataccata ctgaatggat gaacgaatac 420

cgacggcggtt aatagtaatt tacttttca tctttacata ttgggtacta gttttactat 480

cataagttta taaattccac aagctactat ggaataagcc aaccatcttta gtataacaca 540

catgtcttaa agtttattaa ttaattacat gttgtttat atatcgctac gaatttaaac 600

agagaaatca gtttagaaaa aaaaaatatac tatctacatc atcacgtctc tgtattctac 660
gatagagtgc tacttaaga tgagacatat ccgtgtcatc aaaaatatac tccattaaaa 720
tgattattcc ggagcgaac ttgatattgg atatatacaca acctttgtta atatctacga 780
caatagacag cagtccatg gttccataaa cagttagttt atctttctt gaagagat 840
ttttagaga tcttataaaa ctgtcgaatg acatgcatt tataatctta gctaaatcgt 900
atatgttacc atcgtatat ctaaccgcgt ctatctaaa cgttccatc gctttaaaga 960
cgttccgat agatggtctc atttcatcag tcatactgag ccaacaaata taatcgtgt 1020
taacatctt gatagaatca gactctaaag aaaacgaatc ggctttatta tacgcattca 1080
tgataaactt aatgaaaaat gttttcggt gtttaagtgt gatgaatagt atgtcttaat 1140
aattgttatt attcattaa ttaatattt gtaacgagta cactctataa aaacgagaat 1200