



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0102002
(43) 공개일자 2017년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/12 (2006.01) A61K 38/19 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/12 (2013.01)
A61K 38/19 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7022208
(22) 출원일자(국제) 2016년01월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년08월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/012482
(87) 국제공개번호 WO 2016/112188
국제공개일자 2016년07월14일
(30) 우선권주장
62/101,968 2015년01월09일 미국(US)

(71) 출원인
이투빅스 코퍼레이션
미국 워싱턴 98119 시애틀 스위트 200 웨스트 해
리슨 스트리트 410
(72) 발명자
존스 프랭크 알.
미국 워싱턴주 98104 시애틀 콜럼비아 스트리트
1124
가비즈쉬 엘리자베스
미국 워싱턴주 98104 시애틀 콜럼비아 스트리트
1124
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 138 항

(54) 발명의 명칭 **에볼라 바이러스 백신접종을 위한 방법 및 조성물**

(57) 요약

동일한 아데노바이러스 벡터를 이용한 복수의 백신접종 및 아데노바이러스에 대한 기존 면역을 가진 개체에서 백신접종을 가능하게 하는 아데노바이러스 벡터를 사용하여 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 발생시키는 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 2300/00 (2013.01)

C12N 2710/10043 (2013.01)

C12N 2760/14134 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하는 조성물로서, 에볼라 바이러스 항원 코딩 서열이 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 70% 내지 100%의 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 2

재조합 핵산 벡터를 포함하는 조성물로서, 재조합 핵산 벡터가 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하고; 인간에게 투여 시, 조성물이 상기 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도할 수 있으며, 면역 반응은 세포 매개성 면역을 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 복제 결함 아데노바이러스 5 벡터를 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 E2b 유전자 영역에 결실을 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원이 25개 이하의 아미노산의 변형을 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 서열을 포함하는 E2b 유전자 영역에 결실을 가진 재조합 복제 결함 아데노바이러스 5 벡터를 포함하는 조성물로서, 에볼라 바이러스 항원이 25개 이하의 아미노산의 변형을 포함하는 것인 조성물.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원이 20개, 15개, 10개, 5개 또는 그 미만의 아미노산의 변형을 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원이 2개, 3개 또는 4개의 아미노산의 변형을 포함하는 것인 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원이 1개의 아미노산의 변형을 포함하는 것인 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 E1 유전자 영역에 결실을 포함하는 것인 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 E3 유전자 영역에 결실을 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 복제 결합 아데노바이러스 벡터가 E4 유전자 영역에 결실을 포함하는 것인 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 에볼라 바이러스가 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV, RESTV 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원이 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원이 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩되는 것인 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원이 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩되는 것인 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원이 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 97%의 서열 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩되는 것인 조성물.

청구항 18

제14항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원이 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩되는 것인 조성물.

청구항 19

제14항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원이 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 100%의 서열 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩되는 것인 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산 벡터가, 형질감염된 세포에서 에볼라 바이러스 항원의 과발현을 일으킬 수 있는 것인 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산 벡터가 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대하여, 기준(basal)보다 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배 또는 25배 높은 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 것인 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 50, 75, 100, 125, 150, 175 또는 200을 초과하는 역

(inverse) Ad5 중화 항체 역가를 갖는 것인 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 인간이 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 또는 4767을 초과하는 역 Ad5 중화 항체 역가를 갖는 것인 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 바이러스 항원 특이적인 항체 반응으로서 측정되는 것인 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응이 중화 에볼라 바이러스 항원 특이적인 항체 반응으로서 측정되는 것인 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 바이러스 항원 특이적인 세포 매개성 면역(CMI)으로서 측정되는 것인 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 바이러스 항원 특이적인 IFN- γ 분비로서 측정되는 것인 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 바이러스 항원 특이적인 IL-2 분비로서 측정되는 것인 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응이 ELISpot 검정법에 의해 측정되는 것인 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원 특이적인 CMI가 10^6 개의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 당 25개, 50개, 75개, 100개, 150개, 200개, 250개 또는 300개를 초과하는 IFN- γ 스폿 형성 세포(SFC)인 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 감염 세포주 유래의 또는 자가 에볼라 감염 세포 유래의 동종이계 에볼라 바이러스 항원 발현 세포, CAP-1 펄스 항원 제시 세포의 T 세포 용해에 의해 측정되는 것인 조성물.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 성분을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 면역원성 성분이 IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 및 IL-13으로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 34

제32항에 있어서, 면역원성 성분이 IL-7, IL-7을 코딩하는 핵산, IL-7에 대해 실질적인 동일성을 가진 단백질, 및 IL-7에 대해 실질적인 동일성을 가진 단백질을 코딩하는 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

물.

청구항 35

0.8 mL 내지 1.2 mL 범위의 부피의 치료 용액으로 이루어진 조성물을 포함하는 바이알(vial)로서, 치료 용액이 2.5×10^{11} 개 내지 7.5×10^{11} 개의 바이러스 입자를 포함하고; 바이러스 입자가 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 복제 결함 아데노바이러스를 포함하는 것인 바이알.

청구항 36

제35항에 있어서, 재조합 핵산 벡터가, 형질감염된 세포에서 에볼라 바이러스 항원의 과발현을 일으킬 수 있는 것인 바이알.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 형질감염된 세포가 E.C7 세포인 바이알.

청구항 38

제35항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 복제 결함 아데노바이러스 5 벡터를 포함하는 것인 바이알.

청구항 39

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 복제 결함 아데노바이러스가, 인간에서 에볼라 바이러스 항원 발현 세포에 대해 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 것인 바이알.

청구항 40

제39항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 바이러스 항원 특이적인 항체 반응으로서 측정되는 것인 바이알.

청구항 41

제39항에 있어서, 면역 반응이 중화 에볼라 바이러스 항원 특이적인 항체 반응으로서 측정되는 것인 바이알.

청구항 42

제39항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 바이러스 항원 특이적인 세포 매개성 면역(CMI)으로서 측정되는 것인 바이알.

청구항 43

제39항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 바이러스 항원 특이적인 IFN- γ 분비로서 측정되는 것인 바이알.

청구항 44

제39항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 바이러스 항원 특이적인 IL-2 분비로서 측정되는 것인 바이알.

청구항 45

제39항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응이 ELISpot 검정법에 의해 측정되는 것인 바이알.

청구항 46

제45항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원 특이적인 CMI가 10^6 개의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 당 25개, 50개, 75개, 100개, 150개, 200개, 250개 또는 300개를 초과하는 IFN- γ 스폿 형성 세포(SFC)인 바이알.

청구항 47

제39항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 감염 세포주 유래의 또는 자가 에볼라 감염 세포 유래의 동종이계 에볼라 바이러스 항원 발현 세포, CAP-1 펄스 항원 제시 세포의 T 세포 용해에 의해 측정되는 것인 바이알.

청구항 48

제35항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 용액이 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 적어도 1.0×10^{11} 개, 1.5×10^{11} 개, 2.0×10^{11} 개, 2.5×10^{11} 개, 3.0×10^{11} 개, 3.5×10^{11} 개, 4.0×10^{11} 개, 4.5×10^{11} 개, 4.8×10^{11} 개, 4.9×10^{11} 개, 4.95×10^{11} 개 또는 4.99×10^{11} 개 포함하는 것인 바이알.

청구항 49

제35항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 용액이 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 최대 7.0×10^{11} 개, 6.5×10^{11} 개, 6.0×10^{11} 개, 5.5×10^{11} 개, 5.2×10^{11} 개, 5.1×10^{11} 개, 5.05×10^{11} 개 또는 5.01×10^{11} 개 포함하는 것인 바이알.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 치료 용액이 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 1.0×10^{11} 개 내지 7.0×10^{11} 개 포함하는 것인 바이알.

청구항 51

제48항 또는 제49항에 있어서, 치료 용액이 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 4.5×10^{11} 개 내지 5.5×10^{11} 개 포함하는 것인 바이알.

청구항 52

제48항 또는 제49항에 있어서, 치료 용액이 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 4.8×10^{11} 개 내지 5.2×10^{11} 개 포함하는 것인 바이알.

청구항 53

제48항 또는 제49항에 있어서, 치료 용액이 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 4.9×10^{11} 개 내지 5.1×10^{11} 개 포함하는 것인 바이알.

청구항 54

제48항 또는 제49항에 있어서, 치료 용액이 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 4.95×10^{11} 개 내지 5.05×10^{11} 개 포함하는 것인 바이알.

청구항 55

제48항 또는 제49항에 있어서, 치료 용액이 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 4.99×10^{11} 개 내지 5.01×10^{11} 개 포함하는 것인 바이알.

청구항 56

제35항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 성분을 추가로 포함하는 바이알.

청구항 57

제56항에 있어서, 면역원성 성분이 IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 및 IL-13으로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인을 포함하는 것인 바이알.

청구항 58

제56항에 있어서, 면역원성 성분이 IL-7, IL-7을 코딩하는 핵산, IL-7에 대해 실질적인 동일성을 가진 단백질,

및 IL-7에 대해 실질적인 동일성을 가진 단백질을 코딩하는 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 바이알.

청구항 59

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 조성물을 인간에게 투여하는 단계를 포함하는, 인간에서 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 발생시키는 방법.

청구항 60

제35항 내지 제58항 중 어느 한 항의 바이알의 조성물을 인간에게 투여하는 단계를 포함하는, 인간에서 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 발생시키는 방법.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서, 투여 단계가 적어도 1회 반복되는 것인 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 투여 단계가 이전의 투여 단계 이후 약 3주 후에 반복되는 것인 방법.

청구항 63

제61항에 있어서, 투여 단계가 이전의 투여 단계 이후 약 3개월 후에 반복되는 것인 방법.

청구항 64

제61항에 있어서, 투여 단계가 2회 반복되는 것인 방법.

청구항 65

(a) 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하는 제1 조성물을 인간에게 투여하는 단계를 포함하는 제1 치료기; 및

(b) 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하는 제2 조성물을 인간에게 투여하는 단계를 포함하는 후속의 제2 치료기

를 포함하는, 인간에서 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 발생시키는 방법.

청구항 66

치료 방법으로서,

(a) 제1 치료기 및 제2 치료기를 선택하는 단계;

(b) 제1 치료기 동안, 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하는 제1 조성물을 인간에게 총 n 회 투여하는 단계; 및

(c) 제2 치료기 동안, 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하는 제2 조성물을 인간에게 총 m 회 투여하는 단계

를 포함하는 치료 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, n 이 1보다 큰 것인 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, n 이 3인 방법.

청구항 69

제66항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, m 이 1보다 큰 것인 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, m 이 3인 방법.

청구항 71

제65항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 치료기가 적어도 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주 또는 8주인 방법.

청구항 72

제65항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 치료기가 적어도 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월 또는 8개월인 방법.

청구항 73

제65항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 치료기는, 제1 치료기가 종료한 후 3주 내지 16주째에 시작하는 것인 방법.

청구항 74

제65항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 치료기에서, 복제 결함 아데노바이러스의 2회 투여가 적어도 18일의 간격을 두는 것인 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 제1 치료기에서, 복제 결함 아데노바이러스의 2회 투여가 약 21일의 간격을 두는 것인 방법.

청구항 76

제74항에 있어서, 제1 치료기에서, 복제 결함 아데노바이러스의 2회 투여가 최대 24일의 간격을 두는 것인 방법.

청구항 77

제65항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 치료기에서, 복제 결함 아데노바이러스의 2회 투여가 적어도 10주의 간격을 두는 것인 방법.

청구항 78

제77항에 있어서, 제2 치료기에서, 복제 결함 아데노바이러스의 2회 투여가 약 13주의 간격을 두는 것인 방법.

청구항 79

제77항에 있어서, 제2 치료기에서, 복제 결함 아데노바이러스의 2회 투여가 최대 16주의 간격을 두는 것인 방법.

청구항 80

치료 방법으로서,

(a) 제1 치료기 및 제2 치료기를 선택하는 단계;

(b) 제1 치료기 동안, 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하는 제1 조성물을 인간에게 총 3회, 약 3주 간격으로 투여하는 단계; 및

(c) 제2 치료기 동안, 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하는 제2 조성물을 상기 인간에게 총 3회, 약 3개월 간격으로 투여하는 단계

를 포함하고, 제2 치료기는 제1 치료기의 종료 후 약 3개월째에 시작하는 것인 치료 방법.

청구항 81

제59항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩되는 에볼라 바이러스 항원이 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩되는 에볼라 바이러스 항원과 동일한 것인 방법.

청구항 82

제65항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩되는 에볼라 바이러스 항원이 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩되는 에볼라 바이러스 항원과 상이한 것인 방법.

청구항 83

제65항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터 및 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 동일한 것인 방법.

청구항 84

제65항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 복제 결함 아데노바이러스 5 벡터를 포함하는 것인 방법.

청구항 85

제65항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 복제 결함 아데노바이러스 5 벡터를 포함하는 것인 방법.

청구항 86

제65항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 60% 내지 100%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 87

제65항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 60% 내지 100%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 88

제65항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 또는 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩되는 에볼라 바이러스 항원이 25개 이하의 아미노산의 변형을 포함하는 것인 방법.

청구항 89

제88항에 있어서, 제1 또는 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩되는 에볼라 바이러스 항원이 20개, 15개, 10개, 또는 5개 또는 그 미만의 아미노산의 변형을 포함하는 것인 방법.

청구항 90

제88항에 있어서, 제1 또는 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩되는 에볼라 바이러스 항원이 1개의 아미노산의 변형을 포함하는 것인 방법.

청구항 91

제65항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 E2b 유전자 영역에 결실을

포함하는 것인 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 E1 유전자 영역에 결실을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 93

제91항 또는 제92항에 있어서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 E3 유전자 영역에 결실을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 94

제91항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 E4 유전자 영역에 결실을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 95

제65항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 E2b 유전자 영역에 결실을 포함하는 것인 방법.

청구항 96

제95항에 있어서, 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 E1 유전자 영역에 결실을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 97

제95항 또는 제96항에 있어서, 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 E3 유전자 영역에 결실을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 98

제95항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터가 E4 유전자 영역에 결실을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 99

제65항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다가, 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 적어도 1.0×10^{11} 개, 1.5×10^{11} 개, 2.0×10^{11} 개, 2.5×10^{11} 개, 3.0×10^{11} 개, 3.5×10^{11} 개, 4.0×10^{11} 개, 4.5×10^{11} 개, 4.8×10^{11} 개, 4.9×10^{11} 개, 4.95×10^{11} 개 또는 4.99×10^{11} 개 포함하는 것인 방법.

청구항 100

제65항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다가 최대 7.0×10^{11} 개, 6.5×10^{11} 개, 6.0×10^{11} 개, 5.5×10^{11} 개, 5.2×10^{11} 개, 5.1×10^{11} 개, 5.05×10^{11} 개 또는 5.01×10^{11} 개의 바이러스 입자를 포함하는 것인 방법.

청구항 101

제99항 또는 제100항에 있어서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다가 1.0×10^{11} 개 내지 7.0×10^{11} 개의 바이러스 입자를 포함하는 것인 방법.

청구항 102

제99항 또는 제100항에 있어서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다가 4.5×10^{11} 개 내지 5.5×10^{11} 개의 바이러스 입자를 포함하는 것인 방법.

청구항 103

제99항 또는 제100항에 있어서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다가 4.8×10^{11} 개 내지 5.2×10^{11} 개의 바이러스 입자를 포함하는 것인 방법.

청구항 104

제99항 또는 제100항에 있어서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다가 4.9×10^{11} 개 내지 5.1×10^{11} 개의 바이러스 입자를 포함하는 것인 방법.

청구항 105

제99항 또는 제100항에 있어서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다가 4.95×10^{11} 개 내지 5.05×10^{11} 개의 바이러스 입자를 포함하는 것인 방법.

청구항 106

제99항 또는 제100항에 있어서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다가 4.99×10^{11} 개 내지 5.01×10^{11} 개의 바이러스 입자를 포함하는 것인 방법.

청구항 107

제59항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응이 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배 또는 25배 증가하는 것인 방법.

청구항 108

제59항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 바이러스 항원 특이적인 항체 반응으로서 측정되는 것인 방법.

청구항 109

제59항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응이 중화 에볼라 바이러스 항원 특이적인 항체 반응으로서 측정되는 것인 방법.

청구항 110

제59항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 바이러스 항원 특이적인 세포 매개성 면역(CMI)으로서 측정되는 것인 방법.

청구항 111

제59항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 바이러스 항원 특이적인 IFN- γ 분비로서 측정되는 것인 방법.

청구항 112

제59항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 바이러스 항원 특이적인 IL-2 분비로서 측정되는 것인 방법.

청구항 113

제59항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응이 ELISpot 검정법에 의해 측정되는 것인 방법.

청구항 114

제113항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원 특이적인 CMI가 10^6 개의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 당 25개, 50개, 75개, 100개, 150개, 200개, 250개 또는 300개를 초과하는 IFN- γ 스폿 형성 세포(SFC)인 방법.

청구항 115

제59항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응이 에볼라 감염 세포주 유래의 또는 자가 에볼라 감염 세포 유래의 동종이계 에볼라 바이러스 항원 발현 세포, CAP-1 펄스 항원 제시 세포의 T 세포 용해에 의해 측정되는 것인 방법.

청구항 116

제59항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 또는 제2 복제 결함 아데노바이러스가 인간에서 수지상 세포를 감염시키고, 감염된 수지상 세포가 에볼라 바이러스 항원을 제시하고, 이에 의해 면역 반응을 유도하는 것인 방법.

청구항 117

제59항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 피하 투여를 포함하는 것인 방법.

청구항 118

제59항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 투여 단계 전에 50, 75, 100, 125, 150, 160, 175, 200, 225, 250, 275 또는 300을 초과하는 역 Ad5 중화 항체 역가를 보유하는 것인 방법.

청구항 119

제59항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 또는 4767을 초과하는 역 Ad5 중화 항체 역가를 갖는 것인 방법.

청구항 120

제59항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 스테로이드, 코르티코스테로이드, 면역억제제 및 면역요법 중 임의의 하나에 의한 치료를 동시에 받고 있지 않는 것인 방법.

청구항 121

제59항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 투여 단계 전에, 스테로이드, 코르티코스테로이드, 면역억제제 및 면역요법 중 임의의 하나에 의한 치료를 받은 적이 없는 것인 방법.

청구항 122

제59항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 자가면역 질환을 갖고 있지 않는 것인 방법.

청구항 123

제59항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 염증성 장질환, 전신 홍반성 루푸스, 강직성 척추염, 경피증, 다발성 경화증, 바이러스 간염 또는 HIV를 갖고 있지 않는 것인 방법.

청구항 124

제59항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 자가면역과 관련된 갑상선 질환 또는 백반증을 갖고 있는 것인 방법.

청구항 125

제59항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포를 갖고 있는 것인 방법.

청구항 126

제59항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포를 갖고 있지 않는 것인 방법.

청구항 127

제59항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 에볼라 바이러스 감염의 적어도 1개, 2개 또는 3개의 증상을 갖고 있는 것인 방법.

청구항 128

제59항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 투여 전에 치료를 받은 적이 있는 것인 방법.

청구항 129

제65항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 치료기 이전에, 인간이 경구 또는 정맥내 유체를 이용한 재수화, 혈액 제제, 면역 치료제, 발열, 피로, 근육통, 두통 및 인후통, 구토, 설사, 발진, 신장 및 간 기능 장애, 및 내출혈 및 외출혈과 같은 특정의 증상에 대한 약물 또는 치료제로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 약물치료를 제공받은 적이 있는 것인 방법.

청구항 130

제59항 내지 제129항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 화학요법 또는 방사선요법 치료를 동시에 받는 것인 방법.

청구항 131

제59항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 플루오로피리미딘, 이리노테칸, 옥살리플라틴, 베바시주맵, 카페시타빈, 미토마이신, 레고라페닙, 세특시맵, 파니투무맵 및 아세트아미노펜으로 이루어진 군의 적어도 하나의 약물의 투여를 포함하는 요법을 동시에 받는 것인 방법.

청구항 132

제59항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 에볼라 바이러스 항원을 과발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 133

제132항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원을 과발현하는 세포가 비감염 세포에서의 에볼라 바이러스 항원의 기준선(baseline) 발현보다 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 15배 또는 20배 더 에볼라 바이러스 항원을 과발현하는 것인 방법.

청구항 134

제132항 또는 제133항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원을 과발현하는 세포가 에볼라 감염 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 135

제132항 내지 제134항 중 어느 한 항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원을 과발현하는 세포가 면역 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 136

제132항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원을 과발현하는 세포가 혈구를 포함하는 것인 방법.

청구항 137

제132항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원을 과발현하는 세포가 상피 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 138

제59항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, 에볼라 바이러스 항원이 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV, RESTV 또는 이들의 임의의 조합에서 유래한 항원인 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 상호참조
- [0002] 본 출원은 2015년 1월 9일에 출원된 미국 가출원 62/101,968에 대해 우선권을 주장하며, 이는 그 전체가 인용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0003] 서열목록
- [0004] 본 출원은, ASCII 포맷으로 전자적으로 제출되었으며 그 전문이 인용에 의해 본원에 포함되는 서열 목록을 포함한다. 상기 ASCII 카피는 2016년 1월 25일에 생성되었으며, 39891-715.601_SL_SL.txt로 명명되고 크기는 166,679 바이트이다.
- [0005] 기술분야
- [0006] 본 발명은 에볼라 바이러스 백신접종을 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 필로바이러스과의 구성원인 에볼라 바이러스는 인간 및 비인간 영장류에서 고 치사율의 유행성 출혈열의 발병과 연관이 있다. 분디부교(Bundibugyo) 에볼라바이러스, 자이르(Zaire) 에볼라바이러스 및 수단 에볼라바이러스는 모두 아프리카에서 대규모 발병과 연관이 있어 왔다. 서아프리카에서의 현재의 에볼라 발병의 심각성은, 의료에 의 일상적인 접근을 갖지 않은 위험 집단에 대해, 많은 군주들을 커버하는 오래 지속되고 압축적인 에볼라 백신에 대한 의료 수요로 강조된다. 일부 재조합 아데노바이러스-기반 백신들이 단일 면역화 후 다수의 에볼라 군주들에 대항하여 양호한 보호를 부여하였지만, 인간에서 이들 백신의 효능은 상기 고찰된 바와 같이 아데노바이러스에 대한 기존 면역(pre-existing immunity)에 의해 종종 약화된다.
- [0008] 인간에서 강력한 T 세포 매개성 면역(CMI: cell-mediated immune) 반응을 유도하기 위해 반복적으로 사용되어 온 Ad5-기반 면역치료제들이 특히 흥미로우며, 이들 면역치료제들은 모두 폭넓은 안전성 프로파일을 유지한다. 또한, Ad5 벡터는 신뢰가능하게 대량 제조될 수 있고, 외래 환자 투여를 위한 저장 및 운반에 안정하다. 그렇긴 하지만, 1세대 (E1-결실된) Ad5-기반 벡터의 사용에 있어서 주요 결함들은 기존의 항-아데노바이러스 타입 5 중화 항체의 높은 빈도이다. 이들 항체는 이전의 야생형 아데노바이러스 감염 및/또는 Ad5-기반 백신을 사용한 반복된 주사에 의한 아데노바이러스 중화 항체의 유도로 인해, 잠재적인 백신 수용자에 존재할 수 있으며, 표적 EA에 대하여 부적절한 면역 자극을 초래할 수 있다.
- [0009] 아데노바이러스 벡터가 갖는 주요 문제점은 대체로, 면역-적격(competent) 피험체에서 아데노바이러스 벡터 및 바이러스성으로 형질도입된 세포를 제거하는 숙주 면역 반응으로 인해 장기적인 전이유전자 발현의 지속 불능이었다. 따라서, 1세대 아데노바이러스 벡터 백신의 사용은 아데노바이러스(Ad)에 대한 백신의 기존 면역 또는 유도 면역에 의해 심각하게 제한을 받는다(문헌[Yang, et al. J Virol 77/799-803 (2003); Casimiro, et al. J Virol 77/6305-6313 (2003)]). 한 그룹은, 다수의 인간들이, 유전자 전달 벡터를 위해 가장 광범위하게 사용되는 혈청형인 아데노바이러스 타입 5(Ad5)에 대한 항체를 가지고 있으며, 연구된 인간 중 2/3가 Ad에 대한 림프구-중식성 반응을 가지고 있음을 보고하였다(문헌[Chirmule, et al. Gene Ther 6/1574-1583 (1999)]). 또 다른 연구에서, HIV-1 외피 유전자를 운반하는 아데노바이러스 벡터 백신은 비-보조된(non-adjuvanted) DNA를 사용하여 프라이밍된(primed) 면역 반응을 재면역화할 수 없었다(문헌[Barouch, et al. J. Virol 77/8729-8735 (2003)]). 또 다른 그룹은, Ad5를 사용한 단일 면역화로 인해 Ad5에 대하여 기존 면역을 가진 비-인간 영장류가 HIV 단백질에 대해 전이유전자-특이적인 항체를 생성할 수 없었으며, 뿐만 아니라 전반적인 T-세포 반응을 변경할 수도 없었음을 보고하였다(문헌[McCoy, et al. J. Virol 81/6594-6604 (2007)]).
- [0010] 기존 면역이 아데노바이러스 벡터 백신을 방해하는 메커니즘들이 많이 존재하지만, 하나의 주요 관심사는 중화 항체의 존재, 및 Ad에 의해 감염된 항원을 가진 세포의 세포 매개 면역 제거이다. 이들 반응은 둘 다 몇몇 Ad 단백질에 관한 것일 수 있다. 하나의 접근법은 벡터 백신 용량을 증가시키는 것이다. 백신 용량의 증가가 Ad-면역 동물에서 요망되는 세포 매개 면역(CMI) 반응의 유도를 증가시킬 수 있다는 증거가 존재하긴 하지만(문헌[Barouch, et al. J. Virol 77/8729-8735 (2003)]), 그로 인해 종종 동물 및 인간에서 허용 불가능한 부작용이 생기기도 한다. 1세대 Ad5 벡터 백신을 사용하는 경우, 하나의 옵션은 네이키드(비-벡터화된) DNA를 프라이밍 백신접종으로서 사용하고, 후속해서 Ad5 벡터 면역주사를 사용하는 이중성 프라임-부스트 처방(regimen)의

접근법을 사용하는 것일 수 있다. 이러한 프로토콜은, 당업자가, 동일한 바이러스 벡터를 이용하는 동일한 (또는 상이한) 아데노바이러스 벡터 백신을 이용한 추가의 재면역주사(부스트)를 투여할 수 없도록 Ad5에 대한 후속적인 면역 반응을 초래할 수 있다. 따라서, 현재의 1세대 Ad5 벡터를 이용하는 이러한 접근법의 사용 또한, Ad5 면역화된 백신에서 Ad5 벡터 면역화의 임의의 추가 사용을 저지할 수 있다.

[0011] 1세대 (E1-결실된) 아데노바이러스 벡터 백신은 Ad 후기 유전자를 야생형 Ad 바이러스보다 감소된 수준이긴 하지만 더 오랫동안 발현한다(문헌[Nevins, et al. Cell 26/213-220 (1981); Gaynor, et al. Cell 33/683-693 (1983); Yang, et al. J Virol 70/7209-7212 (1996)]). 면역화를 위해 1세대 아데노바이러스 벡터를 사용하는 경우, 백신 항원은 고도로 면역원성인 Ad 캡시드 단백질과 함께 동시에 면역 시스템에 제시된다. 이들 아데노바이러스 벡터가 가진 주요 문제점은, 발생된 면역 반응이 요망되는 백신 에피토프에 대한 것일 가능성이 낮고(문헌[McMichael, et al. Nat Rev Immunol 2/283-291 (2002)]), 아데노바이러스-유래 항원에 관한 것일 가능성이 높다는 점, 즉, 항원 경쟁적이라는 점이다. 1세대 아데노바이러스 벡터가 강력한 면역원이 되는 메커니즘에 대해서는 논란이 있다. Ad 캡시드의 조성물 또는 바이러스 유전자의 독성 효과가 전반적인 염증을 일으켜, 비특이적인 면역 자극 효과를 초래하는 것으로 가정되어 왔다. Ad의 E1 단백질은 감염 후 염증을 저해하는 작용을 한다(문헌[Schaack, et al. PNAS 101/3124-3129 (2004)]). 1세대 아데노바이러스 벡터에 대한 경우인 이들 단백질에 대한 유전자 분절의 제거는 염증 수준을 증가시킨다(문헌[Schaack, et al. PNAS 101/3124-3129 (2004); Schaack, et al. Viral Immunol 18/79-88 (2005)]).

[0012] 따라서, 보다 효과적인 에볼라 백신 벡터 후보물질이 요망되고 있는 것이 분명하다. 장기적인 면역 반응, 복수의 백신접종, 및 Ad에 대한 기존 면역을 가진 개체에서의 백신접종을 허용하는 Ad 백신 벡터. 본 발명은 이러한 이점 및 다른 이점들을 제공한다.

발명의 내용

[0013] 본 발명은 표적 항원, 특히 에볼라 세포와 관련된 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위한 방법 및 아데노바이러스 벡터에 관한 것이다. 이와 같이, 본 발명은 추가로, 하나 이상의 관심 표적 항원을 코딩하는 핵산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 제공한다. 이와 같이, 본 발명은 본원에 추가로 기재된 바와 같은 임의의 소스 유래의 표적 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 이러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 및 이러한 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포를 제공한다.

[0014] 항-Ad 면역을 극복하려는 시도는 대안적인 Ad 혈청형의 사용 및/또는 Ad5 바이러스 캡시드 단백질에서의 변경을 포함하였으며, 이들은 각각, 생성된 백신의 생체분포를 유의하게 변경시키는 데 있어서 제한된 성공률 및 잠재력을 가지고 있었다. 따라서, 완전히 신규 접근법은 기존의 Ad 면역의 표적인 것으로 알려진 단백질인, E1 결실된 Ad5 벡터로부터의 바이러스 단백질 발현을 더 감소시킴으로써 시도되었다. 구체적으로는, 신규 재조합 Ad5 플랫폼은 초기 1(E1) 유전자 영역에 결실이 존재하고, 초기 2b(E2b) 유전자 영역에 부가적인 결실이 존재하는 것(Ad5[E1-, E2b-])으로 기재되어 있다. (DNA 폴리머라제 및 전-말단(pre-terminal) 단백질을 코딩하는) E2b 영역이 결실되면, 바이러스 DNA 복제 및 후기 바이러스 단백질 발현이 감소한다. 이러한 벡터 플랫폼은 암 및 감염성 질환의 동물 모델에서 CMI 반응을 성공적으로 유도하는 것으로 이미 보고된 바 있으며, 보다 중요하게는, 이러한 재조합 Ad5 유전자 전달 플랫폼은 Ad5 면역의 장벽을 극복하고, 기존의 Ad 면역 및/또는 벡터-유도 Ad 면역의 설정에 사용되어, 백신의 복수의 동종 투여(homologous administration)를 가능하게 할 수 있다.

[0015] 본 개시내용은 개체에서 하나 또는 다수의 에볼라 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위한 조성물, 방법 및 키트를 제공한다. 본 조성물은 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 복제 결함(replication defective) 아데노바이러스 벡터를 포함하며, 여기서, 에볼라 바이러스 항원 코딩 서열은 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 70% 내지 100%의 서열 동일성을 가진다.

[0016] 일 양태에서, 재조합 핵산 벡터를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서, 재조합 핵산 벡터는 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하고; 인간에게 투여 시, 조성물은 상기 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도할 수 있으며, 여기서, 면역 반응은 세포 매개성 면역을 포함한다.

[0017] 일부 실시형태에서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 복제 결함 아데노바이러스 5 벡터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 E2b 유전자 영역에 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원은 25개 이하의 아미노산의 변형을 포함한다.

- [0018] 일 양태에서, 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 서열을 포함하는 E2b 유전자 영역에 결실을 갖는 재조합 복제 결함 아데노바이러스 5 벡터를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서, 에볼라 바이러스 항원은 25개 이하의 아미노산의 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원은 20개, 15개, 10개, 5개 또는 그 미만의 아미노산의 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원은 2개, 3개 또는 4개 아미노산에서의 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원은 1개 아미노산에서의 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 E1 유전자 영역에서의 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 E3 유전자 영역에서의 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 E4 유전자 영역에서의 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스는 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV, RESTV 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원은 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원은 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원은 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원은 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 97%의 서열 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원은 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원은 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 100%의 서열 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시형태에서, 재조합 핵산 벡터는 형질감염된 세포에서 에볼라 바이러스 항원의 과발현을 일으킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 재조합 핵산 벡터는 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대하여, 기준(basal)보다 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배 또는 25배 높은 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있다. 일부 실시형태에서, 인간은 50, 75, 100, 125, 150, 175 또는 200을 초과하는 역(인버스)(inverse) Ad5 중화 항체 역가를 가진다. 일부 실시형태에서, 인간은 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 또는 4767을 초과하는 역의 Ad5 중화 항체 역가를 가진다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 바이러스 항원 특이적인 항체 반응으로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 중화 에볼라 바이러스 항원 특이적인 항체 반응으로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 바이러스 항원 특이적인 세포 매개성 면역(CMI)으로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 바이러스 항원 특이적인 IFN- γ 분비로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 바이러스 항원 특이적인 IL-2 분비로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응은 ELISpot 검정법에 의해 측정된다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원 특이적인 CMI는 10^6 개의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC: peripheral blood mononuclear cells) 당 25개, 50개, 75개, 100개, 150개, 200개, 250개 또는 300개를 초과하는 IFN- γ 스폿 형성 세포(SFC: spot forming cells)이다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 감염 세포주 유래의 또는 자가(autologous) 에볼라 감염 세포 유래의 동종이계(allogeneic) 에볼라 바이러스 항원 발현 세포, CAP-1 펄스(pulsed) 항원 제시 세포의 T 세포 용해에 의해 측정된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 면역원성 성분을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 성분은 IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 및 IL-13으로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 성분은 IL-7, IL-7을 코딩하는 핵산, IL-7에 대해 실질적인 동일성을 가진 단백질, 및 IL-7에 대해 실질적인 동일성을 가진 단백질을 코딩하는 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0019] 일 양태에서, 0.8 mL 내지 1.2 mL 범위의 부피의 치료 용액으로 이루어진 조성물을 포함하는 바이알(vial)이 제공되며, 이 치료 용액은 2.5×10^{11} 개 내지 7.5×10^{11} 개의 바이러스 입자를 포함하며; 여기서, 바이러스 입자는 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 복제 결함 아데노바이러스를 포함한다.
- [0020] 일부 실시형태에서, 재조합 핵산 벡터는 형질감염된 세포에서 에볼라 바이러스 항원의 과발현을 일으킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 형질감염된 세포는 E.C7 세포이다. 일부 실시형태에서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 복제 결함 아데노바이러스 5 벡터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복제 결함 아데노바이러스는, 인간에서 에볼라 바이러스 항원 발현 세포에 대해 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산 서열을

포함한다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 바이러스 항원 특이적인 항체 반응으로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 중화 에볼라 바이러스 항원 특이적인 항체 반응으로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 바이러스 항원 특이적인 세포 매개성 면역(CMI)으로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 바이러스 항원 특이적인 IFN- γ 분비로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 바이러스 항원 특이적인 IL-2 분비로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응은 ELISpot 검정법에 의해 측정된다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원 특이적인 CMI는 10^6 개의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 당 25개, 50개, 75개, 100개, 150개, 200개, 250개 또는 300개를 초과하는 IFN- γ 스폿 형성 세포(SFC)이다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 감염 세포주 유래의 또는 자가 에볼라 감염 세포 유래의 동종이계 에볼라 바이러스 항원 발현 세포, CAP-1 펄스 항원 제시 세포의 T 세포 용해에 의해 측정된다. 일부 실시형태에서, 치료 용액은 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 적어도 1.0×10^{11} 개, 1.5×10^{11} 개, 2.0×10^{11} 개, 2.5×10^{11} 개, 3.0×10^{11} 개, 3.5×10^{11} 개, 4.0×10^{11} 개, 4.5×10^{11} 개, 4.8×10^{11} 개, 4.9×10^{11} 개, 4.95×10^{11} 개 또는 4.99×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 용액은 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 최대 7.0×10^{11} 개, 6.5×10^{11} 개, 6.0×10^{11} 개, 5.5×10^{11} 개, 5.2×10^{11} 개, 5.1×10^{11} 개, 5.05×10^{11} 개 또는 5.01×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 용액은 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 1.0×10^{11} 개 내지 7.0×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 용액은 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 4.5×10^{11} 개 내지 5.5×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 용액은 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 4.8×10^{11} 개 내지 5.2×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 용액은 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 4.9×10^{11} 개 내지 5.1×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 용액은 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 4.95×10^{11} 개 내지 5.05×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 용액은 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 4.99×10^{11} 개 내지 5.01×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이알은 면역원성 성분을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 성분은 IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 및 IL-13의 군으로부터 선택된 사이토카인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 성분은 IL-7, IL-7을 코딩하는 핵산, IL-7에 대해 실질적인 동일성을 가진 단백질, 및 IL-7에 대해 실질적인 동일성을 가진 단백질을 코딩하는 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0021] 일 양태에서, 인간에서 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 발생시키는 방법이 제공되며, 본 방법은 본원에 기재된 조성물을 인간에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0022] 일 양태에서, 인간에서 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 발생시키는 방법이 제공되며, 본 방법은 본원에 기재된 바이알의 조성물을 인간에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0023] 일부 실시형태에서, 투여 단계는 적어도 1회 반복된다. 일부 실시형태에서, 투여 단계는 이전의 투여 단계 이후 약 3주 후에 반복된다. 일부 실시형태에서, 투여 단계는 이전의 투여 단계 이후 약 3개월 후에 반복된다. 일부 실시형태에서, 투여 단계는 2회 반복된다.
- [0024] 일 양태에서, 인간에서 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응을 발생시키는 방법이 제공되며, 본 방법은, 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하는 제1 조성물을 인간에게 투여하는 단계를 포함하는 제1 치료기; 및 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하는 제2 조성물을 인간에게 투여하는 단계를 포함하는 제2 치료기를 포함한다.
- [0025] 일 양태에서, 치료 방법이 제공되며, 본 방법은, 제1 치료기 및 제2 치료기를 선택하는 단계; 제1 치료기 동안, 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하는 제1 조성물을 인간에게 총 n 회 투여하는 단계; 및 제2 치료기 동안, 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하는 제2 조성물을 인간에게 총 m 회 투여하는 단계를 포함한다.
- [0026] 일부 실시형태에서, n 은 1보다 크다. 일부 실시형태에서, n 은 3이다. 일부 실시형태에서, m 은 1보다 크다. 일부

실시형태에서, m은 3이다. 일부 실시형태에서, 제1 치료기는 적어도 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주 또는 8주이다. 일부 실시형태에서, 제2 치료기는 적어도 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월 또는 8개월이다. 일부 실시형태에서, 제2 치료기는 제1 치료기가 종료한 후 3주 내지 16주째에 시작한다. 일부 실시형태에서, 제1 치료기에서, 복제 결함 아데노바이러스의 2회 투여는 적어도 18일의 간격을 둔다. 일부 실시형태에서, 제1 치료기에서, 복제 결함 아데노바이러스의 2회 투여는 약 21일의 간격을 둔다. 일부 실시형태에서, 제1 치료기에서, 복제 결함 아데노바이러스의 2회 투여는 최대 24일의 간격을 둔다. 일부 실시형태에서, 제2 치료기에서, 복제 결함 아데노바이러스의 2회 투여는 적어도 10주의 간격을 둔다. 일부 실시형태에서, 제2 치료기에서, 복제 결함 아데노바이러스의 2회 투여는 약 13주의 간격을 둔다. 일부 실시형태에서, 제2 치료기에서, 복제 결함 아데노바이러스의 2회 투여는 최대 16주의 간격을 둔다.

[0027] 일 양태에서, 치료 방법이 제공되며, 본 방법은, 제1 치료기 및 제2 치료기를 선택하는 단계; 제1 치료기 동안, 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하는 제1 조성물을 인간에게 총 3회, 약 3주 간격으로 투여하는 단계; 및 제2 치료기 동안, 인간에서 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 에볼라 바이러스 항원을 코딩하는 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하는 제2 조성물을 상기 인간에게 총 3회, 약 3개월 간격으로 투여하는 단계를 포함하며; 여기서, 제2 치료기는 제1 치료기의 종료 후 약 3개월째에 시작한다.

[0028] 일부 실시형태에서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩되는 에볼라 바이러스 항원은 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩되는 에볼라 바이러스 항원과 동일하다. 일부 실시형태에서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩되는 에볼라 바이러스 항원은 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩되는 에볼라 바이러스 항원과 상이하다. 일부 실시형태에서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터 및 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 동일하다. 일부 실시형태에서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 복제 결함 아데노바이러스 5 벡터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 복제 결함 아데노바이러스 5 벡터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 60% 내지 100%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 60% 내지 100%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 또는 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩되는 에볼라 바이러스 항원은 25개 이하의 아미노산의 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 또는 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩되는 에볼라 바이러스 항원은 20개, 15개, 10개 또는 5개 또는 그 미만의 아미노산의 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 또는 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩되는 에볼라 바이러스 항원은 1개 아미노산의 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 E2b 유전자 영역에 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 추가로 E1 유전자 영역에 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 추가로 E3 유전자 영역에 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 추가로 E4 유전자 영역에 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 E2b 유전자 영역에 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 추가로 E1 유전자 영역에 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 추가로 E3 유전자 영역에 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 추가로 E4 유전자 영역에 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다는 재조합 핵산 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 적어도 1.0×10^{11} 개, 1.5×10^{11} 개, 2.0×10^{11} 개, 2.5×10^{11} 개, 3.0×10^{11} 개, 3.5×10^{11} 개, 4.0×10^{11} 개, 4.5×10^{11} 개, 4.8×10^{11} 개, 4.9×10^{11} 개, 4.95×10^{11} 개 또는 4.99×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다는 바이러스 입자를 최대 7.0×10^{11} 개, 6.5×10^{11} 개, 6.0×10^{11} 개, 5.5×10^{11} 개, 5.2×10^{11} 개, 5.1×10^{11} 개, 5.05×10^{11} 개 또는 5.01×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다는 바이러스 입자를 1.0×10^{11} 개 내지 7.0×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다는 바이러스 입자를 4.5×10^{11} 개 내지 5.5×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다는 바이러스 입자를 4.8×10^{11} 개 내지 5.2×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다는 바이러스 입자를 4.9×10^{11} 개 내지 5.1×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에

서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다는 바이러스 입자를 4.95×10^{11} 개 내지 5.05×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 조성물, 제2 조성물 또는 둘 다는 바이러스 입자를 4.99×10^{11} 개 내지 5.01×10^{11} 개 포함한다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응은 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배 또는 25배 증가한다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 바이러스 항원 특이적인 항체 반응으로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 중화 에볼라 바이러스 항원 특이적인 항체 반응으로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 바이러스 항원 특이적인 세포 매개성 면역(CMI)으로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 바이러스 항원 특이적인 IFN- γ 분비로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 바이러스 항원 특이적인 IL-2 분비로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원에 대한 면역 반응은 ELISpot 검정법에 의해 측정된다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원 특이적인 CMI는 10^6 개의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 당 25개, 50개, 75개, 100개, 150개, 200개, 250개 또는 300개를 초과하는 IFN- γ 스폿 형성 세포(SFC)이다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 에볼라 감염 세포주 유래의 또는 자가 에볼라 감염 세포 유래의 동종이계 에볼라 바이러스 항원 발현 세포, CAP-1 펄스 항원 제시 세포의 T 세포 용해에 의해 측정된다. 일부 실시형태에서, 제1 또는 제2 복제 결함 아데노바이러스는 인간에서 수지상 세포를 감염시키고, 여기서, 감염된 수지상 세포는 에볼라 바이러스 항원을 제시하여, 면역 반응을 유도한다. 일부 실시형태에서, 투여 단계는 피하 투여를 포함한다. 일부 실시형태에서, 인간은 투여 단계 전에 50, 75, 100, 125, 150, 160, 175, 200, 225, 250, 275 또는 300을 초과하는 역 Ad5 중화 항체 역가를 가진다. 일부 실시형태에서, 인간은 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 또는 4767을 초과하는 역 Ad5 중화 항체 역가를 가진다. 일부 실시형태에서, 인간은 스테로이드, 코르티코스테로이드, 면역억제제 및 면역요법 중 임의의 하나에 의한 치료를 동시에 받고 있지 않다. 일부 실시형태에서, 인간은 투여 단계 전에, 스테로이드, 코르티코스테로이드, 면역억제제 및 면역요법 중 임의의 하나에 의한 치료를 받은 적이 없다. 일부 실시형태에서, 인간은 자가면역 질환을 갖고 있지 않다. 일부 실시형태에서, 인간은 염증성 장질환, 전신 홍반성 루푸스, 강직성 척추염, 경피증, 다발성 경화증, 바이러스 감염 또는 HIV를 갖고 있지 않다. 일부 실시형태에서, 인간은 자가면역과 관련된 갑상선 질환 또는 백반증을 갖고 있다. 일부 실시형태에서, 인간은 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포를 갖고 있다. 일부 실시형태에서, 인간은 에볼라 바이러스 항원을 발현하는 세포를 갖고 있지 않다. 일부 실시형태에서, 인간은 에볼라 바이러스 감염의 적어도 1개, 2개 또는 3개의 증상을 갖고 있다. 일부 실시형태에서, 인간은 투여 전에 치료(요법)를 받은 적이 있다. 일부 실시형태에서, 제1 치료기 이전에, 인간은 경구 또는 정맥내 유체를 이용한 재수화, 혈액 제제, 면역 치료제, 발열, 피로, 근육통, 두통 및 인후통, 구토, 설사, 발진, 신장 및 간 기능 장애, 및 내출혈 및 외출혈과 같은 특징의 증상에 대한 약물 또는 치료제로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 약물치료를 제공받은 적이 있다. 일부 실시형태에서, 인간은 화학요법 또는 방사선요법 치료를 동시에 받는다. 일부 실시형태에서, 인간은 플루오로피리미딘, 이리노테칸(irinotecan), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 베바시주맵(bevacizumab), 카페시타빈(Capecitabine), 미토마이신(Mitomycin), 레고라페닙(Regorafenib), 세톡시맵(cetuxinab), 파니투무맵(panitumumab) 및 아세트아미노펜(acetaminophen)으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 약물의 투여를 포함하는 요법을 동시에 받는다. 일부 실시형태에서, 인간은 에볼라 바이러스 항원을 과발현하는 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원을 과발현하는 세포는 에볼라 바이러스 항원을, 비감염 세포에서의 에볼라 바이러스 항원의 기준선(baseline) 발현보다 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 15배 또는 20배 더 높게 과발현한다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원을 과발현하는 세포는 에볼라 감염 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원을 과발현하는 세포는 면역 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원을 과발현하는 세포는 혈구를 포함한다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원을 과발현하는 세포는 상피 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 에볼라 바이러스 항원은 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV, RESTV 또는 이들의 임의의 조합에서 유래한 항원이다.

[0029] 인용에 의한 포함

[0030] 본 명세서에서 언급된 모든 공개, 특허 및 특허 출원은, 각각의 개별 공개, 특허 또는 특허 출원이 인용에 의해 구체적으로 및 개별적으로 포함되는 것으로 지시된 것과 동일한 범위로 인용에 의해 본원에 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 Ad5-널(null)(빈 벡터)을 사용하여 면역화한 마우스의 항체 수준을 보여주는 막대 그래프를 예시한 것이다. 마우스에게 14일 간격으로 Ad5-널 바이러스 입자(VP)를 3회 면역화하였다. 각각의 면역화 후 항-Ad 항체

(중화 항체) 수준이 증가하였다.

도 2는 Ad5-넬을 사용하여 면역화한 마우스의 중화 항체(NAb) 수준을 보여주는 막대 그래프를 예시한 것이다. 마우스에게 14일 간격으로 Ad5-넬 VP를 3회 면역화하였다. 각각의 면역화 후 중화 항체 수준이 증가하였다. 광학 밀도 판독값은 생존가능한 표적 세포의 존재를 나타낸다.

도 3은 에볼라 바이러스 게놈의 하나의 구조를 예시한 것이다.

도 4는 HeLa 세포에서 Ad5[E1-, E2b-] 벡터에 의한 후기 유전자 발현의 결여를 예시한 것이다. HeLa 세포를 Ad5[E1-]-LacZ 벡터 또는 Ad5[E1-, E2b-]-LacZ 벡터를 사용하여 감염시켰다. 단백질 용해물을 수합하고, 66 kD 섬유 단백질을 웨스턴 블로팅에 의해 검출하였다. 양성 대조군으로서, 보완 세포주(complementing cell line)에서 성장된 Ad 바이러스의 생산적 감염(productive infection) 유래의 단백질 용해물 중 일부가 포함된다.

도 5는 백신접종된 마우스, 및 식염수 또는 Ad5-넬을 주사한 대조군 마우스에서의 생존율을 예시한 것이다.

도 6은 백신접종된 마우스(상단) 또는 대조군 마우스(하단)를 예시한 것이다. 시도(challenge) 후, 백신접종된 마우스에서가 아니라 대조군 마우스에서의 폭넓은 염증에 주목한다.

도 7은, 혈구응집 저해(HAI) 역가가 Ad5[E1-, E2b-]-HA를 사용한 1회의 백신접종 후 Ad5-면역 원숭이에서 유도되었음을 예시한 것이다. HAI 활성이 면역화 후 14일째에 검출되었으며, 제28일까지 제14일째의 수준보다 유의하게 증가하였음에 주목한다($P < 0.01$). 평균 \pm SEM.

도 8은 생성된 4개의 Ad5[E1-, E2b-]-EA 기반 백신을 예시한 것이다.

도 9는 Ad5[E1, E2b-]-GP_{EZ}를 사용하여 24시간 동안 감염시킨 E.C7 세포로부터의 에볼라 GP의 발현을 예시한 것이다(좌측 레인). 우측 레인(비감염 세포 유래의 용해물)에서가 아니라 좌측 레인에서 GP 단백질 밴드의 존재가 대략 125 kDa 이동하였음에 주목한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 하기 단락들은 본 발명의 상이한 양태들을 보다 상세히 기재하고 있다. 본 발명의 각각의 양태는 명확히 다르게 지시되지 않는 한, 본 발명의 임의의 다른 양태 또는 양태들과 조합될 수 있다. 특히, 바람직하거나 유리한 것으로 지시된 임의의 특징은 바람직하거나 유리한 것으로 지시된 특징들 중 임의의 다른 특징과 조합될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 다르게 지시되지 않는 한, 관사 "a"는 명쾌하게 다르게 제공되지 않는 한 하나 이상을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 다르게 지시되지 않는 한, "함유하다," "함유하는," "수반하다," "수반하는"과 같은 용어들은 "포함하는"을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 다르게 지시되지 않는 한, 용어 "또는"은 결합적이거나 분리적일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 다르게 지시되지 않는 한, 임의의 실시형태는 임의의 다른 실시형태와 조합될 수 있다.

[0033] Ad5[E1-, E2b-] 벡터가 항원 특이적인 면역 반응의 유도에 있어서 Ad5[E1-] 벡터보다 더 안전할 뿐만 아니라 우수한 것으로 보이며, 이로써 임상 반응을 초래할 수 있는 에볼라 백신을 전달하기 위한 플랫폼으로서 훨씬 더 적합한 것으로 발견되었다. 다른 경우, 면역 유도는 수개월이 소요될 수 있다. Ad5[E1-, E2b-] 벡터는 항원 특이적인 면역 반응의 유도에 있어서 Ad5[E1-] 벡터보다 더 안전할 뿐만 아니라 우수한 것으로 보이며, 이로써 임상 반응을 초래할 수 있는 에볼라 백신을 전달하기 위한 플랫폼으로서 훨씬 더 적합하다.

[0034] 본 발명의 다양한 실시형태들은 에볼라에 대한 치료용 백신을 개발하려는 오랫동안 요망된 수요를 전달하는 데 있어서 새로운 Ad5[E1-, E2b-] 벡터 시스템을 이용함으로써, 다른 Ad5 시스템에서 발견된 장벽을 극복하고, 이전에 Ad5에 노출된 적이 있는 사람의 면역화를 가능하게 한다. 본 발명의 다른 실시형태에서, 에볼라에 대한 치료용 백신을 개발하려는 오랫동안 요망된 수요를 전달하는 데 있어서 새로운 Ad5[E1-, E2b-] 벡터 시스템을 이용함으로써, 다른 Ad5 시스템에서 발견된 장벽을 극복하고, 이전에 Ad5에 노출된 적이 있는 사람의 면역화를 가능하게 한다.

[0035] "아데노바이러스"(Ad)는 아데노바이러스과 유래의 비-외피화된 DNA 바이러스를 지칭한다. 이들 바이러스는 인간, 조류, 소, 돼지 및 개 중에서 발견될 수 있지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 본 발명은 E2b 결실된 바이러스 벡터, 또는 본원에 기재된 바와 같은 다른 결실을 함유하는 벡터를 기반으로 하는, 아데노바이러스과의 4개의 속(예, 조류아데노바이러스(Aviadenovirus), 포유류아데노바이러스(Mastadenovirus), 애틀아데노바이러스

(Atadenovirus) 및 시아데노바이러스(Siadenovirus)) 중 임의의 속 유래의 임의의 Ad의 사용을 고려한다. 또한, 몇몇 혈청형들이 각각의 종에서 발견된다. Ad는 또한, 이들 바이러스 혈청형들 중 임의의 혈청형의 유전적 유도체와 관련이 있으며, 이로써 유전적 돌연변이, 결실 또는 전이 등이 있으나 이들로 한정되는 것은 아니다.

- [0036] "헬퍼 아데노바이러스" 또는 "헬퍼 바이러스"는, 특정 숙주 세포는 할 수 없는 바이러스 기능을 공급할 수 있는 Ad를 지칭한다(숙주는 E1 단백질과 같은 Ad 유전자 생성물을 제공할 수 있음). 이 바이러스는 제2 바이러스 또는 헬퍼 의존적 바이러스(예, 거티드(gutted) 또는 거트리스(gutless) 바이러스, 또는 특정 영역, 예컨대 E2b 또는 본원에 기재된 바와 같은 다른 영역이 결실된 바이러스)에 결합되어 있는 기능(예, 단백질)을 인 트랜스(in trans) 공급하는 데 사용되며; 제1 복제-무능 바이러스는 제2, 헬퍼 의존적 바이러스를 "도와" 세포에서 제2 바이러스 게놈의 생성을 허용하는 것으로 일컬어진다.
- [0037] "아데노바이러스 5 널(Ad5-널)"은 발현을 위한 임의의 이중성 핵산 서열을 함유하지 않는 비-복제성 Ad를 지칭한다.
- [0038] "1세대 아데노바이러스"는, 초기 영역 1(E1)이 결실된 Ad를 지칭한다. 부가적인 경우, 초기 영역 3(E3) 또한 결실될 수 있다.
- [0039] "거티드" 또는 "거트리스"는 모든 바이러스 코딩 영역들이 결실된 Ad 벡터를 지칭한다.
- [0040] "형질감염"은 진핵 세포 내로의 외래 핵산의 도입을 지칭한다. 예시적인 형질감염 수단으로는, 칼슘 포스페이트-DNA 공동-침전, DEAE-텍스트란-매개 형질감염, 폴리브렌-매개 형질감염, 전기천공, 현미주사, 리포솜 융합, 리포펙션, 원형질 융합, 레트로바이러스 감염 및 유전자총(biolistics) 등이 있다.
- [0041] "안정한 형질감염" 또는 "안정하게 형질감염된"은 형질감염된 세포의 게놈 내로의 외래 핵산, DNA 또는 RNA의 도입 및 통합을 지칭한다. 용어 "안정한 형질감염체"는 게놈 DNA 내에 안정하게 통합된 외래 DNA를 가진 세포를 지칭한다.
- [0042] "리포터 유전자"는 리포터 분자(예, 효소)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. "리포터 분자"는 비제한적으로 효소-기반 검출 검정법(예, ELISA, 조직화학적 검정법), 형광 시스템, 방사성 시스템 및 발광 시스템 등을 포함한 여러 가지 검출 시스템들 중 임의의 검출 시스템에서 검출 가능하다. 이. 콜라이(*E. coli*) β -갈락토시다제 유전자, 녹색 형광 단백질(GFP), 인간 태반 알칼리 포스파타제 유전자, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT) 유전자; 및 다른 리포터 유전자들이 이용될 수 있다.
- [0043] "이중(성) 서열"은, 자연상에서는 연결되어 있지 않거나 또는 자연상에서는 상이한 위치에서 연결되어 있는 핵산 서열에 연결되어 있거나 또는 연결되도록 조작된 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 이중성 핵산은 자연 발생적 뉴클레오타이드 서열 또는 이러한 자연 발생적 서열에 대한 일부 변형을 포함할 수 있다.
- [0044] "전이유전자(transgene)"는 피험체의 세포 또는 게놈 내에 도입된 자연적 또는 이중성 핵산 서열 또는 융합된 상동성 또는 이중성 핵산 서열인 임의의 유전자 코딩 영역을 지칭한다. 전이유전자는 피험체의 세포에 전이유전자를 도입하는 데 사용되는 임의의 바이러스 벡터 상에서 운반될 수 있다.
- [0045] "2세대 아데노바이러스"는 E1, E2, E3, 및 소정의 실시형태에서는, E4 DNA 유전자 서열의 전부 또는 일부가 바이러스로부터 결실된(제거된) Ad를 지칭한다.
- [0046] "피험체"는 비제한적으로 인간, 비-인간 영장류(예, 레수스(rhesus) 또는 다른 타입의 마카크(macaque)), 마우스, 돼지, 말, 당나귀, 소, 양, 래트 및 가금류를 포함한 임의의 동물을 지칭한다.
- [0047] "면역원성 단편"은, B-세포 및/또는 T-세포 표면 항원 수용체에 의해 특이적으로 인지(즉, 특이적으로 결합)되어 단편에 대해 특이적으로 면역 반응을 발생시키는 폴리펩타이드 단편을 지칭한다.
- [0048] "표적 항원" 또는 "표적 단백질"은 면역 반응이 유도되는 분자, 예컨대 단백질을 지칭한다.
- [0049] "E2b 결실된"은 적어도 하나의 E2b 유전자 생성물의 발현 및/또는 기능을 방지하는 방식으로 돌연변이화된 DNA 서열을 지칭한다. 따라서, 소정의 실시형태에서, "E2b 결실된"은 Ad 게놈으로부터 결실된(제거된) 특정한 DNA 서열과 관련하여 사용된다. E2b 결실된 또는 "E2b 영역 내에 결실을 함유하는"은 Ad 게놈의 E2b 영역 내에서의 적어도 하나의 염기쌍의 결실을 지칭한다. 따라서, 소정의 실시형태에서, 1개 초과 염기쌍이 결실되고, 추가의 실시형태에서, 적어도 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 110개, 120개, 130개, 140개 또는 150개의 염기쌍이 결실된다. 또 다른 실시형태에서, 결실은 Ad 게놈의 E2b 영역 내에서의 150개, 160개, 170개, 180개, 190개, 200개, 250개 또는 300개 초과 염기쌍의 결실이다. E2b 결실은 적어도 하나의

E2b 유전자 생성물의 발현 및/또는 기능을 방지하는 결실일 수 있고, 따라서, E2b-특이적 단백질의 부분을 코딩하는 엑손 내에서의 결실뿐만 아니라 프로모터 및 리더 서열 내에서의 결실을 포함한다. 소정의 실시형태에서, E2b 결실은 E2b 영역의 DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질 중 하나 또는 둘 다의 발현 및/또는 기능을 방지하는 결실이다. 추가의 실시형태에서, "E2b 결실된"은, 하나 이상의 코딩된 단백질이 비-기능성이 되도록, Ad 게놈의 이러한 영역의 DNA 서열에서의 하나 이상의 점 돌연변이를 지칭한다. 이러한 돌연변이는 비기능성 단백질을 초래하는 아미노산 서열에서의 변화를 이끄는 상이한 잔기로 대체된 잔기를 포함한다.

[0050] "E1-결실된"은 적어도 하나의 E1 유전자 생성물의 발현 및/또는 기능을 방지하는 방식으로 돌연변이화된 DNA 서열을 지칭한다. 따라서, 소정의 실시형태에서, "E1 결실된"은 Ad 게놈으로부터 결실된(제거된) 특정한 DNA 서열과 관련되어 사용된다. E1 결실된 또는 "E1 영역 내에 결실을 함유하는"은 Ad 게놈의 E1 영역 내에서의 적어도 하나의 염기쌍의 결실을 지칭한다. 따라서, 소정의 실시형태에서, 1개 초과 염기쌍이 결실되고, 추가의 실시형태에서, 적어도 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 110개, 120개, 130개, 140개 또는 150개의 염기쌍이 결실된다. 또 다른 실시형태에서, 결실은 Ad 게놈의 E1 영역 내에서의 150개, 160개, 170개, 180개, 190개, 200개, 250개 또는 300개 초과 염기쌍의 결실이다. E1 결실은 적어도 하나의 E1 유전자 생성물의 발현 및/또는 기능을 방지하는 결실일 수 있고, 따라서, E1-특이적 단백질의 부분을 코딩하는 엑손 내에서의 결실뿐만 아니라 프로모터 및 리더 서열 내에서의 결실을 포함한다. 소정의 실시형태에서, E1 결실은 E1 영역의 트랜스-작용 전사 조절 인자 중 하나 또는 둘 다의 발현 및/또는 기능을 방지하는 결실이다. 추가의 실시형태에서, "E1 결실된"은, 하나 이상의 코딩된 단백질이 비-기능성이 되도록, Ad 게놈의 이러한 영역의 DNA 서열에서의 하나 이상의 점 돌연변이를 지칭한다. 이러한 돌연변이는 비기능성 단백질을 초래하는 아미노산 서열에서의 변화를 이끄는 상이한 잔기로 대체된 잔기를 포함한다.

[0051] "면역 반응을 발생시키는" 또는 "면역 반응을 유도하는"은 하나 이상의 면역 세포(T-세포, B-세포, 항원-제시 세포, 수지상 세포, 호중구 등)의 수 또는 이들 면역 세포 중 하나 이상의 활성화(CTL 활성화, HTL 활성화, 사이토카인 분비, 사이토카인 분비의 프로파일의 변화 등)에서의 통계학적으로 유의한 변화, 예를 들어 증가 또는 감소를 지칭한다.

[0052] 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 본질적으로 상호호환적으로 사용된다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 단일-가닥(코딩 또는 안티센스) 또는 이중-가닥일 수 있고, DNA(예, 게놈, cDNA 또는 합성) 또는 RNA 분자일 수 있다. RNA 분자는, 인트론을 함유하고 DNA 분자와 1-대-1 방식으로 상응하는 HnRNA 분자, 및 인트론을 함유하지 않는 mRNA 분자일 수 있다. 부가적인 코딩 또는 비-코딩 서열이 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 내에 존재할 수 있긴 하지만 그럴 필요는 없으며, 폴리뉴클레오타이드가 다른 분자 및/또는 지지 물질에 연결될 수 있긴 하지만 그럴 필요는 없다. 본원에 사용된 바와 같이, 단리된 폴리뉴클레오타이드는, 폴리뉴클레오타이드가 다른 코딩 서열로부터 실질적으로 분리됨을 의미한다. 예를 들어 본원에 사용된 바와 같이, 단리된 DNA 분자는 관련이 없는 코딩 DNA, 예컨대 크기가 큰 염색체 단편 또는 다른 기능성 유전자 또는 폴리펩타이드 코딩 영역의 큰 부분들을 함유하지 않는다. 이는 본래 단리된 대로의 DNA 분자를 지칭하고, 이후에 실험실에서 재조합에 의해 분절에 첨가된 유전자 또는 코딩 영역을 배제하지 않는다.

[0053] 당업자가 이해하는 바와 같이, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 본원에 기재된 바와 같이 표적 항원, 항원 단편, 펩타이드 등을 발현하거나 또는 발현하도록 개조될 수 있는 게놈 서열, 게놈-외 서열 및 플라스미드-코딩된 서열 및 더 작은 조작된 유전자 분절을 포함할 수 있다. 이러한 분절은 자연적으로 단리되거나, 합성에 의해 인위적으로 변형될 수 있다.

[0054] 폴리뉴클레오타이드 서열을 비교할 때, 하기 기재된 바와 같이 2개의 서열 내의 뉴클레오타이드 서열이 최대 상응을 위해 정렬되었을 때 동일하다면 이 2개의 서열들은 "동일"하다. 2개 서열들 사이의 비교는 전형적으로, 비교 창에 걸쳐 서열들을 동일성에 대해 비교함으로써 수행되고, 서열 유사성의 로컬 영역들을 비교한다. 본원에 사용된 바와 같이, "비교 창"은 적어도 약 20개, 통상 30개 내지 약 75개, 40개 내지 약 50개의 연속적인(contiguous) 위치들로 된 분절을 지칭하며, 이러한 비교 창에서, 2개의 서열이 최적으로 정렬된 후, 서열이, 동일한 수의 연속적인 위치들로 된 참조 서열과 비교될 수 있다. 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은 디폴트 파라미터를 사용하여 Lasergene 스위트 오브 바이오인포매틱스 소프트웨어(DNASTAR, Inc., 위스콘신주 매디슨)에서 Megalign 프로그램을 사용하여 수행될 수 있다. 이 프로그램은 몇몇 정렬안을 구현한다.

[0055] 대안적으로, 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은 문헌[Smith and Waterman, Add. APL. Math 2:482 (1981)]의 로컬 동일성 알고리즘에 의해, 문헌[Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]의 동일성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌[Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)]의 유사성 방법에 대한

검색에 의해, 이들 알고리즘(GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA 및 TFASTA)의 컴퓨터화된 실행에 의해, 또는 조사에 의해 수행될 수 있다.

[0056] 서열 동일성% 및 서열 유사성%를 확인하는 데 적합한 알고리즘의 일례는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이다. BLAST 및 BLAST 2.0은 예를 들어 본원에 기재된 파라미터들과 함께 사용되어, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 대한 서열 동일성%를 확인할 수 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립 생물공학 정보 센터를 통해 공개적으로 입수 가능하다. 하나의 예시적인 예에서, 누적 점수는 뉴클레오타이드 서열에 대해, 파라미터 M(매칭 잔기 쌍에 대한 보상 점수(reward score); 항상 0 초과) 및 파라미터 N(미스매칭 잔기에 대한 페널티 점수; 항상 0 미만)을 사용하여 계산될 수 있다. 각각의 방향에서의 워드 히트(word hit)의 연장은, 누적 정렬 점수가 이의 최대로 달성된 값으로부터 X 양만큼 하락할 때; 하나 이상의 음성-점수화 잔기 정렬의 축적으로 인해 누적 점수가 0 이하로 될 때; 또는 어느 서열이든지 이의 말단에 도달할 때, 중단된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T 및 X는 정렬의 민감성 및 속도를 결정한다. BLAST 프로그램은 디폴트로서 11의 워드 길이(W) 및 10의 예상값(E)을 사용하고, BLOSUM62 점수화 매트릭스 정렬은 50의 (B), 10의 예상값(E), M=5, N=-4 및 2개 가닥들의 비교를 사용한다.

[0057] "서열 동일성%"는 적어도 20개 위치들의 비교 창에 걸쳐 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교함으로써 확인될 수 있으며, 여기서, 비교 창 내의 폴리뉴클레오타이드 서열의 부분은, 2개 서열의 최적 정렬을 위한 (첨가 또는 결실을 포함하지 않는) 참조 서열과 비교하여, 20% 이하, 통상 5% 내지 15%, 또는 10% 내지 12%의 첨가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 퍼센트는, 2개 서열에서 동일한 핵산 염기들이 존재하는 위치의 수를 확인하여 매칭된 위치의 수를 수득하고, 이 매칭된 위치의 수를 참조 서열 내의 위치의 총 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱해서 서열 동일성%를 수득한다.

[0058] 당업자는, 유전자 코드의 축퇴 결과, 본원에 기재된 바와 같이 관심 특정 항원 또는 이의 단편을 코딩하는 많은 뉴클레오타이드 서열들이 존재함을 이해할 것이다. 이들 폴리뉴클레오타이드 중 일부는 임의의 천연 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대해 최소의 상동성을 가진다. 그렇긴 하지만, 코돈 사용빈도에서의 차이로 인해 달라지는 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 의해 구체적으로 고려된다. 나아가, 본원에 제공된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자의 대립 유전자는 본 발명의 범위 내에 존재한다. 대립 유전자는 뉴클레오타이드의 하나 이상의 돌연변이, 예컨대 결실, 첨가 및/또는 치환의 결과 변경되는 내인성 유전자이다. 생성되는 mRNA 및 단백질은 변경된 구조 또는 기능을 가질 수 있지만 그럴 필요는 없다. 대립 유전자는 표준 기술(예, 혼성화, 증폭 및/또는 데이터베이스 서열 비교)을 사용하여 동정될 수 있다.

[0059] 본 개시내용을 읽을 때 당업자가 이해하게 될 바와 같이, Ad 게놈의 다른 영역이 결실될 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, Ad 게놈의 특정 영역에서 "결실된"다는 것은 해당 영역에 의해 코딩되는 적어도 하나의 유전자 생성물의 발현 및/또는 기능을 방지하는 방식으로 돌연변이화된 특정한 DNA 서열을 지칭한다. 소정의 실시형태에서, 특정 영역에서 "결실된"다는 것은 해당 영역에 의해 코딩되는 발현 및/또는 기능(예, DNA 폴리머라제의 E2b 기능 또는 전-말단 단백질 기능)을 방지하는 방식으로 Ad 게놈으로부터 결실된(제거된) 특정한 DNA 서열을 지칭한다. 특정 영역 내에서 "결실된" 또는 "결실을 함유하는"은 Ad 게놈의 해당 영역 내에서의 적어도 하나의 염기쌍의 결실을 지칭한다. 따라서, 소정의 실시형태에서, 1개 초과와 염기쌍이 결실되고, 추가의 실시형태에서, 적어도 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 110개, 120개, 130개, 140개 또는 150개의 염기쌍이 특정 영역으로부터 결실된다. 또 다른 실시형태에서, 결실은 Ad 게놈의 특정 영역 내에서의 150개, 160개, 170개, 180개, 190개, 200개, 250개 또는 300개 초과와 염기쌍의 결실이다. 이들 결실은 그 영역에 의해 코딩되는 유전자 생성물의 발현 및/또는 기능이 방지되도록 하는 결실이다. 따라서, 결실은 단백질의 부분을 코딩하는 엑손 내에서의 결실뿐만 아니라 프로모터 및 리더 서열 내에서의 결실을 포함한다. 추가의 실시형태에서, Ad 게놈의 특정 영역에서 "결실된"은, 하나 이상의 코딩된 단백질이 비-기능성이 되도록, Ad 게놈의 이러한 영역의 DNA 서열에서의 하나 이상의 점 돌연변이를 지칭한다. 이러한 돌연변이는 비기능성 단백질을 초래하는 아미노산 서열에서의 변화를 이끄는 상이한 잔기로 대체된 잔기를 포함한다. Ad 게놈에서의 결실 또는 돌연변이는 E1a, E1b, E2a, E2b, E3, E4, L1, L2, L3, L4, L5, TP, POL, IV 및 VA 영역 중 하나 이상 내에 존재할 수 있다. 본 발명의 결실된 아데노바이러스 벡터는 재조합 기술을 사용하여 발생될 수 있다.

[0060] 당업자가 인지하게 될 바와 같이, 본 발명에 사용되기 위한 아데노바이러스 벡터는, E2b 유전자 생성물 및 결실되었을 수 있는 필수적인 유전자들 중 임의의 유전자의 생성물을 구성적으로 발현하는 적절한 패키징 세포주를 사용하여 높은 역가까지 성공적으로 성장될 수 있다. 소정의 실시형태에서, E1 및 DNA 폴리머라제 단백질뿐만 아니라 Ad-전-말단 단백질을 구성적으로 발현하는 HEK-293-유래의 세포가 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 높

은 역가 스톡(stock)의 아데노바이러스 벡터를 성공적으로 성장시키는 데 E.C7 세포가 사용된다.

[0061] 자가-증식성 아데노바이러스 벡터로부터 중요한 유전자를 결실시키기 위해, 표적화된 유전자에 의해 코딩되는 단백질이 우선 HEK-293 세포에서 공동발현될 수 있거나 유사하게는 E1 단백질과 함께 공동발현될 수 있다. 예를 들어, 구성적으로 공동발현될 때 무독성인 단백질(또는 유도적으로-발현되는 독성 단백질)만이 선택적으로 이용될 수 있다. HEK-293 세포에서 E1 및 E4 유전자의 공동발현이 가능하다. E1 및 단백질 IX 유전자, 비리온 구조 단백질이 공동발현될 수 있다. E1, E4 및 단백질 IX 유전자의 추가의 공동발현이 또한, 가능하다. E1 및 100 k 유전자가 트랜스보완(transcomplementing) 세포주에서 성공적으로 발현될 수 있으며, E1 및 프로테아제 유전자가 또한 그럴 수 있다.

[0062] E2b 결실된 Ad 입자를 높은 역가로 성장시키는 데 사용되기 위한 E1 및 E2b 유전자 생성물을 공동발현하는 세포주가 기재되어 있다. E2b 영역은 Ad 게놈 복제에 필수적인 바이러스 복제 단백질을 코딩한다. 유용한 세포주는 대략 140 kDa Ad-DNA 폴리머라제 및/또는 대략 90 kDa 전-말단 단백질을 구성적으로 발현한다. 특히, 독성 없이 E1, DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질의 높은-수준의 구성적 공동발현을 가진 세포주(예, E.C7)가, 복수의 백신접종에 사용되기 위한 Ad를 증식시키는 데 사용되기에 바람직하다. 이들 세포주는 E1, DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질에 대해 결실된 아데노바이러스 벡터의 증식을 가능하게 한다.

[0063] 바이러스 운반 시스템에 대한 추가의 정보는 문헌[Fisher-Hoch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321, 1989; Flexner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86-103, 1989; Flexner et al., Vaccine 8:17-21, 1990]; 미국 특허 4,603,112, 4,769,330 및 5,017,487; WO 89/01973; 미국 특허 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; 문헌[Berkner, Biotechniques 6:616-627, 1988; Rosenfeld et al., Science 252:431-434, 1991; Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219, 1994; Kass-Eisler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11498-11502, 1993; Guzman et al., Circulation 88:2838-2848, 1993; 및 Guzman et al., Cir. Res. 73:1202-1207, 1993]에서 찾을 수 있다.

[0064] 이중성 핵산

[0065] 본 발명의 아데노바이러스 벡터는 전형적으로, 하나 이상의 관심 표적 항원, 또는 이의 변이체, 단편 또는 융합체를 코딩하는 변형된 핵산 서열 또는 이중성 핵산 서열을 포함하며, 이에 대해 면역 반응을 발생시키는 것이 바람직하다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 아데노바이러스 벡터는, 하나 이상의 단백질, 이의 변이체, 이의 융합체 또는 이의 단편을 코딩하며 면역 반응을 조절할 수 있는 변형된 핵산 서열 또는 이중성 핵산 서열을 포함한다. 본 발명의 추가의 실시형태에서, 본 발명의 아데노바이러스 벡터는 특정한 항원, 예컨대 탄저병 보호 항원에 대한 하나 이상의 항체를 코딩하여, 수동적인 면역요법을 가능하게 한다. 소정의 실시형태에서, 본 발명의 아데노바이러스 벡터는 치료 효과(예, 항-바이러스, 항균, 항-기생충 또는 항-에볼라 기능)를 가진 하나 이상의 단백질을 코딩하는 변형된 핵산 서열 또는 이중성 핵산 서열을 포함한다. 따라서, 본 발명은 이중성 핵산 서열을 포함하는 2세대 E2b 결실된 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 일부 실시형태에서, 이중성 변형된 또는 핵산 서열은 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원, 이의 변이체, 이의 단편 또는 이들의 조합이다. 일부 실시형태에서, 이중성 변형된 또는 핵산 서열은 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원, 이의 변이체, 이의 단편 또는 이들의 조합 또는 융합이다. 일부 실시형태에서, 이중성 변형된 또는 핵산 서열은 BOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원, 이의 변이체, 이의 단편 또는 이들의 조합의 조합 또는 융합이다.

[0066] 특히, 본 발명은, 하나 이상의 항원 표적 엔티티에 대한 복수의 백신접종이 달성될 수 있도록 개선된 아데노바이러스(Ad)-기반 백신을 제공한다. 일부 실시형태에서, 개선된 아데노바이러스(Ad)-기반 백신은 표적 항원, 이의 단편, 변이체 또는 변이체 단편을 운반하는 복제 결함 아데노바이러스, 예컨대 Ad5[E1-, E2b-]-서열 번호1, Ad5[E1-, E2b-]-서열 번호2, Ad5[E1-, E2b-]-서열 번호4, Ad5[E1-, E2b-]-서열 번호5, Ad5[E1-, E2b-]-서열 번호6을 포함한다. 일부 실시형태에서, 개선된 아데노바이러스(Ad)-기반 백신은 표적 항원, 이의 단편, 변이체 또는 변이체 단편을 운반하는 복제 결함 아데노바이러스, 예컨대 Ad5[E1-, E2b-]-GP, Ad5[E1-, E2b-]-NP, Ad5[E1-, E2b-]-VP40, Ad5[E1-, E2b-]-VP35, Ad5[E1-, E2b-]-VP30 및 Ad5[E1-, E2b-]-VP24를 포함한다. 표적 항원, 예를 들어 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원의 변이체 및/또는 단편, 예컨대 GP, NP, VP40, VP35, VP30 또는 VP24 항원의 돌연변이체가 야생형 형태와 비교하여 면역 반응을 상승시키는 능력의 증가를 위해 이용된다. 중요하게는, 백신접종은 Ad에 대한 기존 면역의 존재 하에 수행되고/거나 본 발명의 아데노바이러스 벡터 또는 다른 아데노바이러스 벡터를 사용하여 이미 수회 면역화된 피험체에게 투여될 수 있다. 본 발명의

아데노바이러스 벡터는, 예를 들어 비제한적으로 본원에 기재된 바와 같고 GenBank에서 공개적으로 입수 가능한 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV의 하나 이상의 표적 항원, 예컨대 GP, NP, VP40, VP35, VP30 또는 VP24 및 /또는 하나 이상의 에볼라 바이러스 균주에 대한 항체의 생성 및 세포 매개성 면역 반응을 포함하여, 관심 항원, 예를 들어 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원, 예컨대 GP, NP, VP40, VP35, VP30 또는 VP24에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 피험체에게 수회 투여될 수 있다.

[0067] 면역원성 폴리펩타이드는 에볼라 자이르(GenBank: KJ660347.2) 유래의 RNA 서열 또는 이의 단편일 수 있다. 일부 실시형태에서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 면역원성 폴리펩타이드에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9%의 동일성을 가진 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함한다.

[0068] 일부 실시형태에서, 면역원성 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 서열 번호1의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 서열 번호1에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9%의 동일성을 갖는 서열, 또는 인간 게놈에 대해 최적화된 대안적인 코돈 대체에 의해 서열 번호1로부터 발생된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩된 면역원성 폴리펩타이드는 야생형 GenBank 서열(자이르 KJ660347)과 비교하여 최대 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개 또는 그 이상의 점 돌연변이, 예컨대 단일 아미노산 치환 또는 결실을 포함한다.

[0069] 일부 실시형태에서, 면역원성 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 서열 번호2의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 서열 번호2에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9%의 동일성을 갖는 서열, 또는 인간 게놈에 대해 최적화된 대안적인 코돈 대체에 의해 서열 번호2로부터 발생된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩된 면역원성 폴리펩타이드는 야생형 GenBank 서열(수단 KC545392.1)과 비교하여 최대 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개 또는 그 이상의 점 돌연변이, 예컨대 단일 아미노산 치환 또는 결실을 포함한다.

[0070] 일부 실시형태에서, 면역원성 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 서열 번호4의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 서열 번호4에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9%의 동일성을 갖는 서열, 또는 인간 게놈에 대해 최적화된 대안적인 코돈 대체에 의해 서열 번호4로부터 발생된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩된 면역원성 폴리펩타이드는 야생형 GenBank 서열(타이 포레스트 NC_014372.1)과 비교하여 최대 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개 또는 그 이상의 점 돌연변이, 예컨대 단일 아미노산 치환 또는 결실을 포함한다.

[0071] 일부 실시형태에서, 면역원성 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 서열 번호5의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 서열 번호5에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9%의 동일성을 갖는 서열, 또는 인간 게놈에 대해 최적화된 대안적인 코돈 대체에 의해 서열 번호5로부터 발생된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩된 면역원성 폴리펩타이드는 야생형 NCBI 서열 분디부교 에볼라바이러스(NC_014373.1)과 비교하여 최대 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개 또는 그 이상의 점 돌연변이, 예컨대 단일 아미노산 치환 또는 결실을 포함한다.

[0072] 일부 실시형태에서, 면역원성 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 서열 번호6의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 서열 번호6에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9%의 동일성을 갖는 서열, 또는 인간 게놈에 대해 최적화된 대안적인 코돈 대체에 의해 서열 번호6으로부터 발생된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩된 면역원성 폴리펩타이드는 야생형 레스톤(Reston) 에볼라바이러스(GenBank: JX477166.1)와 비교하여 최대 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개 또는 그 이상의 점 돌연변이, 예컨대 단일 아미노산 치환 또는 결실을 포함한다.

[0073] 다양한 실시형태들에서, 본원에 기재된 아데노바이러스-유래 벡터는 E2b 영역, 및 선택적으로 E1 영역에 결실을

갖고 있으며, 이러한 결실은 본원에 기재된 바와 같은 면역요법에서 벡터의 사용에 여러 가지 이점들을 부여한다.

[0074] 아데노바이러스 계통 내의 소정의 영역은 필수적인 기능을 수행하고, 본 발명의 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 구축할 때 실질적으로 보존될 필요가 있을 수 있다(문헌[Lauer et al., J. Gen. Virology, 85, 2615-2625 (2004)]; Leza et al., J. Virology, pp. 3003-3013 (1988); 및 Miralles et al., JBC. Vol. 264, No. 18, pp. 10763-10772 (1983)] 참조).

[0075] 1세대, E1-결실된 아데노바이러스 서브타입 5(Ad5)-기반 벡터가 백신으로서 사용되기 위한 플랫폼을 약속하긴 하지만, 이는 자연 발생적 또는 유도된 Ad-특이적 중화 항체에 의해 활성화에 있어서 방해받는다. E1 및 E2b 영역이 결실된 Ad5-기반 벡터(Ad5[E1-, E2b-])는 후기 바이러스 단백질 발현의 감소로 인해, Ad-면역 숙주에서 코딩된 항원 전이유전자에 대한 면역학적 제거를 피하고 보다 강력한 면역 반응을 유도하는 기회를 제공하며, 상기 E2b 영역은 DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질을 코딩한다.

[0076] 에볼라 항원을 코딩하는 Ad5[E1-, E2b-]-EA를 사용한 다수의 상동성 면역화가 본 발명에 따라 사용되어, 기존의 Ad5-중화 항체 또는 유도된 Ad5-중화 항체의 존재 하에도 불구하고 마우스에서 항-에볼라 활성을 가진 EA-특이적 세포 매개성 면역(CMI) 반응을 유도할 수 있다. 에볼라 환자의 코호트는 증가하는 용량의 Ad5[E1-, E2b-]-EA를 사용하여 면역화될 수 있다. EA-특이적 CMI 반응이 많은 환자 또는 대부분의 환자에서 기존의 Ad5 면역의 존재에도 불구하고 관찰될 수 있다. 중요하게는, 최소의 독성 및 전반적인 환자 생존율은 기존의 Ad5 중화 항체 역가와 무관하게 유사할 수 있다. 에볼라 감염된 피험체에서, 신규 Ad5[E1-, E2b-] 유전자 전달 플랫폼은 자연적으로 획득된 Ad5 특이적인 면역 및 면역화-유도된 Ad5 특이적인 면역 둘 다의 설정에서 에볼라 항원에 대한 유의한 CMI 반응을 발생시키는 데 사용될 수 있다. 에볼라 항원 특이적인 CMI는 예를 들어, 10⁶개의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 당 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 5000, 10000 개 또는 그 이상의 수를 초과하는 IFN- γ 스폿 형성 세포(SFC)일 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법 및 조성물은 재조합 핵산 벡터에 관한 것이며, 여기서, 재조합 핵산 벡터는 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 포함하고, 인간에게 투여 시, 조성물은 상기 인간에서 에볼라 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다. 면역 반응은 Ad5에 대한 기존 면역의 존재 하에서도 유도될 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 1000, 12000, 15000 또는 그 이상의 수를 초과하는 기존의 역 Ad5 중화 항체 역가를 가진 인간 피험체에서 상승된다. 면역 반응은 본원에 기재된 바와 같이 세포 매개성 면역 및/또는 체액성 면역을 포함할 수 있다. 면역 반응은 세포내 사이토카인 염색(ICS), ELISPOT, 증식 검정법, 크롬 방출을 포함한 세포독성 T 세포 검정법 또는 동등한 검정법, 및 임의의 수의 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 사용한 유전자 발현 분석 또는 RT-PCR 기반 검정법뿐만 아니라 당업계에서 면역 반응을 측정하기 위한 것으로 알려진 임의의 다른 적합한 검정법 중 하나 이상에 의해 본원에 기재된 바와 같이 그리고 이러한 방법들이 당업자에게 이용 가능한 범위로 측정될 수 있다.

[0077] 에볼라-연관된 항원(EA)을 전달함으로써 달성되는 에볼라 면역요법이 일부 생존 이점을 제공하긴 하지만, 이들 전략에 대한 한계들이 존재하고, 보다 면역학적으로 강력한 백신이 요망된다. 낮은 면역원성을 해결하기 위해, 보조제와 면역 자극 사이토카인의 공동-투여를 포함한 여러 가지 진보된, 다성분 백신접종 전략들이 제공된다. 본 발명은, 선천성 염증촉진 신호를 본래 제공하면서도 관심 항원을 발현하도록 동시에 조작된 재조합 바이러스 벡터에 관한 것이다. 특히, 강력한 T 세포 매개성 면역(CMI) 반응을 유도하기 위해 인간에서 반복적으로 사용되어 온 아데노바이러스 혈청형-5(Ad5)-기반 면역치료제가 관심이 있으며, 이들은 모두 폭넓은 안전성 프로파일을 유지한다. 또한, Ad5 벡터는 다량으로 신뢰 가능하게 제조될 수 있으며, 외래 환자 투여를 위해 저장 및 운반에 안정하다. 그렇긴 하지만, 1세대(E1-결실된) Ad5-기반 벡터의 사용에 있어 주요한 장애물은 기존의 항-아데노바이러스 타입 5 중화 항체의 높은 빈도이다. 이들 항체는, 이전의 야생형 아데노바이러스 감염 및/또는 Ad5-기반 백신의 반복된 주사에 의한 아데노바이러스 중화 항체의 유도로 인해 잠재적인 백신에 존재할 수 있으며, 각각은 표적 EA에 대하여 부적절한 면역 자극을 초래할 수 있다.

[0078] 본 발명은 T 세포 반응을 증강시키는 변형을 가진 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원에 대한 유전자 삽입물을 함유하는 Ad5[E1-, E2b-] 플랫폼을 제공하며, 본 발명의 다양한 실시형태들에서 적어도 하나의 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원에 대한 면역 반응을 상승시키는 요법에 사용된다. 이러한 Ad5 플랫폼을 사용한 복수의 면역화는 마우스에서 기존의 Ad5 면역의 존재에도 불구하고 항-에볼라 활성을 가진 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원 특이적인 CMI 반응을 유도하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, Ad5[E1-,

E2B-]는 서열 번호1, 서열 번호2, 서열 번호4, 서열 번호5, 서열 번호6 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, Ad5[E1-, E2B-]는 GenBank로부터의 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원 코딩 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, Ad5[E1-, E2B-]는 GenBank 또는 NCBI로부터의 인간 단리물 유래의 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원 코딩 서열의 아종을 포함한다. 본원에 제공된 바와 같이 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 면역요법의 I/II상 임상 시험은 안전성을 나타낼 것이고, 인간 CMI에서 면역원성이 기존의 Ad5-면역의 존재와 비교하여 임상 결과에 대한 실질적인 영향 없이 유도될 수 있는 것으로 고려된다.

[0079] **면역 반응에 대한 표적으로서의 EBOV**

[0080] 에볼라 바이러스(EBOV)는 필로바이러스과의 구성원이다. 이의 게놈은 크기가 대략 19-kb인 단일-가닥 RNA 분자를 포함한다. 에볼라 바이러스는 목양 지팡이, "U"자 또는 "6"자 모양으로 보일 수 있고 코일형, 환상체 또는 분지형일 수 있는 필라멘트성 입자이다. 일반적으로, 에볼라 바이러스는 폭이 80 나노미터(nm)이고, 길이가 14,000 nm일 수 있다. EBOV는 상이한 병원성 수준에 따라 적어도 5개의 구별되는 종으로 하위구분될 수 있다. 5개의 상이한 에볼라바이러스(BDBV, EBOV, RESTV, SUDV 및 TAFV)의 게놈은 서열이 상이하고, 유전자의 수 및 위치가 중복된다.

[0081] 에볼라 바이러스는 바이러스에게 이의 특징적인 명칭을 부여하고, 외피화되며, 비-분절화되고, 음성 가닥 RNA 및 다양한 모양을 가진 필라멘트성 입자를 나타낸다. 에볼라 바이러스 게놈은 7개의 유전자, 핵단백질(NP), 비리온 단백질(VP) 35, VP40, 당단백질(GP), VP30, VP24 및 RNA-의존적 RNA 폴리머라제(L)를 함유한다. GP를 제외한, 모든 유전자들은 모노시스트론이고, 하나의 구조 단백질을 코딩한다. 바이러스의 내부 리보핵단백질 복합체는 NP에 의해 캡슐화된 RNA 게놈을 함유하고, VP35, VP30 및 RNA-의존적 RNA 폴리머라제와 결합하여 기능성 전사효소-레플리카제 복합체로 된다. 리보핵단백질 복합체의 단백질은 인터페론 길항제인 VP35와 같은 부가적인 기능을 가진다. VP40은 기질 단백질이고 바이러스 입자 형성을 매개한다. VP24는 막과 연관된(associated) 또 다른 구조 단백질이고 인터페론 신호전달을 방해한다. GP는 유일한 막관통 표면 단백질이고, 2개의 이황화 연결된 퓨린-절단 단편인 GP-1 및 GP-2로 이루어진 삼량체 스파이크(spike)를 형성한다. 다른 모노네가바이러스(Mononegavirales)와 비교하여 에볼라 바이러스의 중요한 특징은 감염된 세포 밖으로 분비되는 (GP 유전자 유래의) 용해성 GP의 생성이다.

[0082] 일부 양태에서, 본 개시내용은 BDBV 유래의 적어도 하나의 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 EBOV 유래의 적어도 하나의 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 RESTV 유래의 적어도 하나의 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 SUDV 유래의 적어도 하나의 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 TAFV 유래의 적어도 하나의 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 GenBank 및 NCBI에 기재된 에볼라 바이러스 유래의 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다.

[0083] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 에볼라 균주, 예를 들어 BDBV, EBOV, RESTV, SUDV 및 TAFV, 및 GenBank 및 NCBI에 기재된 바와 같은 다른 것들의 조합 유래의 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다.

[0084] 다른 필로바이러스의 비리온과 같은 에볼라 비리온은 7개의 단백질(도 3 참조): 표면 당단백질(GP), 핵단백질(NP), 4개의 비리온 구조 단백질(VP40, VP35, VP30 및 VP24) 및 RNA-의존적 RNA 폴리머라제(L)를 함유할 수 있다.

[0085] 에볼라 바이러스의 당단백질은 2개의 오픈 리딩 프레임에서 코딩되는 점에서 특이하다. 전사 편집은 비리온 내에 혼입된 막관통 형태를 발현하는 데 필요하다. 비편집된 형태는 감염 과정 동안 초기에 다량으로 합성되는 비구조적 분비 당단백질(sGP)을 생성한다. 일부 경우, 코딩된 단백질은 번역 후 절단되어, 바이러스 입자의 표면 상에 놓이는 성숙한 분비 형태뿐만 아니라 당-코딩된 더 작은 부분을 생성한다.

[0086] 일부 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 에볼라 비리온의 당단백질(GP) 유래의 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 에볼라 비리온의 핵단백질(NP) 유래의 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 에볼라 비리온의 4개의 비리온 구조 단백질(VP40, VP35, VP30

및 VP24) 중 적어도 하나로부터 유래하는 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다. 예를 들어, 재조합 벡터는 적어도 하나의 에볼라 비리온의 VP40 유래의 표적 바이러스 항원을 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 벡터는 적어도 하나의 에볼라 비리온의 VP35 유래의 표적 바이러스 항원을 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 벡터는 적어도 하나의 에볼라 비리온의 VP30 유래의 표적 바이러스 항원을 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 벡터는 적어도 하나의 에볼라 비리온의 VP24 유래의 표적 바이러스 항원을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 에볼라 비리온의 L 단백질 유래의 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다.

[0087] 에볼라 라이프 사이클은 비리온이 숙주 세포와 접촉 시 시작하는 것으로 생각된다. 구조 당단백질(GP1,2로 알려져 있음)은 표적화된 세포에 결합하고 이를 감염시키는 바이러스의 능력에 책임이 있다. 비리온은 숙주 세포 상의 특이적인 세포-표면 수용체, 예를 들어, C-타입 렉틴, DC-SIGN 또는 인테그린에 부착되고, 후속해서, 바이러스 외피가 숙주 세포의 세포막과 융합하는 것으로 생각된다. 비리온이 숙주 세포에 의해 취해진 후, 비리온은 산성 엔도솜 및 리소솜으로 이동하고, 그곳에서 바이러스 외피 당단백질 GP가 절단된다.

[0088] L 유전자에 의해 코딩된 바이러스 RNA 폴리머라제는 뉴클레오텐시드를 부분적으로 연코트하고, 유전자를 양성-가닥 mRNA로 전사시키며, 그런 다음 mRNA는 비리온을 포함하는 구조 단백질 및 비구조 단백질로 번역된다. 생성되는 가장 풍부한 단백질은 핵단백질이고, 숙주 세포에서의 이의 농도는 L이 유전자 전사로부터 게놈 복제로 스위치할 때 확인된다. 바이러스 게놈의 복제를 통해 전장 양성-가닥 안티게놈(antigenome)이 생성되고, 이는 다시 음성-가닥 바이러스 자손의 게놈 복사물로 전사된다. 새로 합성된 구조 단백질 및 게놈은 자가-조립하고 세포막 내부 근처에 축적된다. 비리온은 숙주 세포로부터 출아되어, 이것이 출아되는 세포막으로부터 이의 외피를 얻는다. 그런 다음, 성숙한 바이러스 자손 입자는 다른 세포를 감염시켜, 사이클을 반복한다.

[0089] 일부 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 에볼라 비리온의 L 유전자 유래의 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다. 일 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 에볼라 비리온의 핵단백질의 생성을 저해하는 표적 바이러스를 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다. 일 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 에볼라 비리온의 게놈 복제를 저해하는 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다. 일 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 에볼라 비리온의 출아 과정을 저해하는 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다. 일 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 에볼라 비리온의 감염 과정을 저해하는 표적 바이러스 항원을 포함하는 본원에 제공된 바와 같은 재조합 벡터를 제공한다.

[0090] 다양한 실시형태들에서, Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호1, Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호2, Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호4, Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호5, 및/또는 Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호6은 수지상 세포에 형질도입되는 능력을 증가시켜, Ad5[E1-, E2b-] 벡터 바이러스 단백질에 대한 감소된 염증 반응 및 결과적으로 기존의 Ad 면역의 회피를 이용함으로써 백신에서 항원 특이적인 면역 반응을 개선한다.

[0091] 예를 들어, Ad5[E1-, E2B-]-GP, Ad5[E1-, E2B-]-NP, Ad5[E1-, E2B-]-VP40, Ad5[E1-, E2B-]-VP35, Ad5[E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24, 및/또는 [E1-, E2b-]-L은 수지상 세포에 형질도입되는 능력을 증가시켜, Ad5[E1-, E2b-] 벡터 바이러스 단백질에 대한 감소된 염증 반응 및 결과적으로 기존의 Ad 면역의 회피를 이용함으로써 백신에서 항원 특이적인 면역 반응을 개선할 수 있다.

[0092] 다양한 실시형태들에서, Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호1, Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호2, Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호4, Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호5, Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호6 치료용 및 예방용 백신은 인간의 총 생존율(OS)을 증가시키고 기술적 안전성의 독성 프로파일 한계를 가지는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, Ad5[E1-, E2B-]-GP, Ad5[E1-, E2B-]-NP, Ad5[E1-, E2B-]-VP40, Ad5[E1-, E2B-]-VP35, Ad5[E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24, 및/또는 [E1-, E2b-]-L 치료용 및 예방용 백신은 인간의 총 생존율(OS)을 증가시키고 기술적 안전성의 독성 프로파일 한계를 가지는 데 사용될 수 있다.

[0093] 나아가 다양한 실시형태들에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 에볼라에 의해 감염된 인간의 임상 반응, 예컨대 변경된 질병 진행 또는 기대 수명을 초래한다. 나아가, 다양한 실시형태들에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 에볼라에 의한 낮은 감염 위험도, 중간 감염 위험도 및 높은 감염 위험도에서 임상 반응, 예컨대 변경된 질병 진행 또는 기대 수명을 초래한다.

[0094] 일부 양태에서, 본 개시내용은 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 및 RESTV 항원으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 항원을 발현하는 아데노바이러스 기반 벡터를 사용하는 조성물 및 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 개시

내용은 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및 L 항원으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 항원을 발현하는 아데노바이러스 기반 벡터를 사용하는 조성물 및 방법을 제공한다.

[0095] 나아가 다양한 실시형태들에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 에볼라에 의해 감염된 인간의 임상 반응, 예컨대 변경된 질병 진행 또는 기대 수명을 초래한다. 나아가, 다양한 실시형태들에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 에볼라에 의한 낮은 감염 위험도, 중간 감염 위험도 및 높은 감염 위험도에서 임상 반응, 예컨대 변경된 질병 진행 또는 기대 수명을 초래한다.

[0096] Ad5-기반 에볼라 백신

[0097] 아데노바이러스는 선형 이중-가닥 게놈을 함유하는 정20면체의 비-외피화된 캡시드를 특징으로 하는 DNA 바이러스이다. 인간 Ad 중에서, 임의의 신생물 질병과 연관된 것은 아무것도 없으며, 오로지 면역적격 개체에서 상대적으로 온화한 자가-제한 병을 유발할 뿐이다. 바이러스에 의해 발현되는 제1 유전자는 E1 유전자이고, 이 E1 유전자는 야생형 게놈에 존재하는 다른 Ad5 유전자 프로모터로부터 높은-수준의 유전자 발현을 개시하는 작용을 한다. 바이러스 DNA 복제 및 자손 비리온의 조립은 감염된 세포의 핵 내에서 발생하고, 전체 라이프 사이클은 약 36시간 소요되고 산출량은 1개 세포 당 대략 10^4 개 비리온이다. 야생형 Ad5 게놈은 대략 36 kb이고, DNA 복제 이전 또는 이후에 발현되는지에 따라 초기 바이러스 기능 및 후기 바이러스 기능으로 구분되는 유전자를 코딩한다. 초기/후기 경계 식별(delineation)은 거의 완벽한데, 왜냐하면 Ad5에 의해 이미 감염된 세포의 중복 감염(super-infection)은 중복 감염 바이러스가 그 자체의 게놈을 복제한 후 상기 바이러스로부터 후기 유전자 발현을 결여시키는 것으로 언급되어 있기 때문이다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 이는 Ad5 주요 후기 프로모터(MLP)의 복제 의존적 *cis*-활성화로 인해, 복제된 게놈이 캡슐화되도록 존재할 때까지 후기 유전자 발현(주로 Ad5 캡시드 단백질)을 방지하기 때문인 것 같다. 본 발명의 조성물 및 방법은 진보된 세대의 Ad 벡터/백신의 개발에서 특징을 이용한다.

[0098] Ad5 벡터

[0099] 1세대, 또는 E1-결실된 아데노바이러스 벡터 Ad5[E1-]는, 전이유전자가 유전자의 E1 영역만 대체하도록 구축된다. 전형적으로, 약 90%의 야생형 Ad5 게놈이 벡터 내에 보유된다. Ad5[E1-] 벡터는 감소된 복제 능력을 갖고 있으며, Ad5 E1 유전자를 발현하지 않는 세포의 감염 후 감염성 바이러스를 생성하지 못한다. 재조합 Ad5[E1-] 벡터는 인간 세포(전형적으로 293 세포)에서 증식되어, Ad5[E1-] 벡터 복제 및 패키징을 허용한다. Ad5[E1-] 벡터는 다수의 긍정적인 특질들을 가지고 있으며; 가장 중요한 것 중 하나는 스케일 업 및 cGMP 생성에 있어서 이러한 벡터의 상대적인 용이성이다. 현재, 220개가 넘는 인간 임상 시험들이 Ad5[E1-] 벡터를 이용하며, 2,000명이 넘는 피험체가 바이러스를 피하, 근육내 또는 정맥내로 제공 받는다. 부가적으로, Ad5 벡터는 통합되지 않으며; 이의 게놈은 에피솜으로(episomal) 남아 있다. 일반적으로, 숙주 게놈 내에 통합되지 않는 벡터에 있어서, 삽입 돌연변이생성 및/또는 생식선 전이(germ-line transmission) 위험은 있다 한다 해도 극히 낮다. 종래의 Ad5[E1-] 벡터는 7 kb에 달하는 운반 능력을 가진다.

[0100] 백신으로서 사용되는 Ad5[E1-] 벡터

[0101] 여러 가지 항원들을 코딩하는 Ad5[E1-] 벡터는 생체외에서 높은 역가의 벡터에 노출된 DC 중 95%에 효율적으로 형질도입될 수 있다. 중요하게는, 증가하는 외래 유전자 발현 수준은, 벡터에 의한 감염 다중도(multiplicities of infection; MOI)가 증가하는 DC에서 유지되었다. 여러 가지 항원들(중양 항원 MART-1, MAGE-A4, DF3/MUC1, p53, hugp100 흑색종 항원, 폴리오마 바이러스 중간-T 항원 포함)을 코딩하는 Ad5[E1-] 벡터에 의해 감염된 DC는 항원 특이적인 CTL 반응을 유도하는 경향을 가지며, 증강된 항원 제시 능력을 가지고, 혼합된 림프구 반응에서 T-세포 증식을 개시하는 개선된 능력을 가진다. 중양 특이적인 항원을 코딩하는 Ad5 벡터에 의해 형질도입된 DC에 의한 동물의 면역화는, 각각의 항원을 발현하는 중양 세포를 사용한 시도 시 동물에 대해 유의한 수준의 보호를 초래하는 것으로 나타났다. 흥미롭게는, IL-7을 코딩하는 Ad의 종양내 감염은 항종양 면역을 유도하는데 있어서 IL-7 코딩 Ad5 벡터에 의해 형질도입된 DC의 주사보다 덜 효과적이어서, Ad5 벡터에 의한 DC의 생체외 형질도입에서 관심을 더 강조하였다. 생체의 DC 형질도입 전략은 또한, 예를 들어 DC 내로의 CTLA4Ig의 Ad5 매개 운반에 의해 DC CD80과 T-세포 상에 존재하는 CD28 분자와의 상호작용을 차단하여 수용체 숙주에서 관용성을 유도하려는 시도로 사용되어 왔다.

[0102] DC와 Ad5 벡터 캡시드의 상호작용은 몇몇 유익한 반응을 유발할 수 있으며, 이러한 유익한 반응은 Ad5 벡터에 의해 코딩된 항원을 제시하는 DC의 경향의 증강일 수 있다. 예를 들어, 항원 취득에 있어 특수화된 미성숙한 DC는 T-세포 활성화의 상대적으로 비효율적인 효과기이다. DC 성숙화는 T-세포 면역을 구동하는 DC의 증강된 능력

과 일치한다. 일부 경우, 본 발명의 조성물 및 방법은 Ad5 감염을 이용하여 DC 성숙화를 직접적으로 유도한다. 마우스의 미성숙 골수 유래 DC에 관한 연구는, 마우스의 미성숙 골수 유래 DC의 Ad 벡터 감염이 DC 성숙화와 통상적으로 연관된 세포 표면 마커(MHC I 및 II, CD40, CD80, CD86 및 ICAM-1)를 상향조절할 뿐만 아니라, 골수 성 DC 성숙화 시 하향조절되는 것으로 알려진 인테그린인 CD11c를 하향조절할 수 있다고 제시한다. 일부 경우에, Ad 벡터 감염은 DC 성숙화의 마커인 IL-12의 DC에 의한 생성을 유발한다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 이들 사건은 가능하게는 NF- κ B 경로의 Ad5 유발된 활성화로 인한 것일 수 있다. 성숙한 DC는 Ad 벡터에 의해 효율적으로 형질도입될 수 있고, (말초 혈액 단핵구 유래의) 성숙한 CD83+ 인간 DC에 의해 나타나는 바와 같이 더 낮은 MOI에서 네이브(naive) T-세포의 증식을 자극시키는 기능적인 잠재성을 상실하지 않았다. 그러나, 성숙한 DC는 또한, 미성숙 DC보다 감염성이 더 낮을 수 있다. 캡시드 단백질의 변형은, 통상적인 CAR 수용체 감염 메커니즘을 사용하기 보다는 예를 들어 CD40L 수용체를 바이러스 벡터 수용체로서 사용하여 Ad 벡터에 의한 DC의 감염을 최적화할 뿐만 아니라 기능적인 성숙화를 증강시키는 전략으로서 사용될 수 있다.

[0103] 가장 극적으로는, 항-HIV 면역 반응을 유도하는 비-바이러스 벡터의 잠재성이 Ad5 기반 벡터 시스템과 직접 비교되었을 때, Ad5 기반 시스템이 훨씬 더 우수한 것으로 확인되었다. 예를 들어, Ad5 네이브 영장류 모델에서, HIV gag를 발현하는 Ad5[E1-]를 사용한 백신접종은 HIV-gag를 발현하는 네이키드 DNA 백신을 이용하는 유사한 노력과 비교하여, SHIV 감염으로부터 동물을 보호하는 데 있어서 우수하였다. 따라서, 바이러스 벡터는 네이키드 DNA 접근법보다 우수할 수 있다. 네이키드 DNA-gag 백신을 프라이밍 백신접종으로 사용하고 후속해서 Ad5[E1-]-gag 백신을 사용하여 부스팅하는 조합된 전략(네이키드 DNA-gag 벡터 단독을 이용한 임상적 경험의 구축)은 인간 시험에서 DNA-HIV-gag 코딩 벡터만을 이용한 경우에 주어진 것보다 T 세포 반응을 더 개선하였다.

[0104] 안전성 및 면역원성을 평가하는 현재의 1상 임상 시험에서, 20명의 건강한 성인에게 자이르 및 수단 균주의 에볼라 바이러스의 GP 성분을 함유하는 재조합 침팬지 Ad-기반(cAd) 백신(cAd-EBO)을 사용하여 1회 근육내로 백신 접종하였다. GP-특이적 항체가 20명 피험체 모두에서 유도되었다. 항체 역가는 2×10^{10} 개 VP를 받은 그룹(n=10)과 비교하여 2×10^{11} 개 바이러스 입자(VP)를 받은 그룹(n=10)에서 가장 높았다. 달성된 항체 반응은, 비인간 영장류(NHP)를 수반하는 시도 연구에서 백신-유도된 보호적 면역과 연관된 것으로 보고된 범위 내에서 관찰되었다. GP-특이적 T-세포 반응은 또한, 2×10^{10} 개 VP 용량을 받은 것과 비교하여 2×10^{11} 개 VP 용량을 받은 피험체에서 더 빈번하였다. 백신은 안전하게 관용되었고, 심각한 부작용은 관찰되지 않았다. 중요하게는, 항-침팬지 Ad 항체 또한 피험체에서 유도되었으며 이들 항체는 보호적 면역 반응을 유지하는 데 필요할 수 있는 추가의 백신접종(부스트)을 방지할 것으로 나타났다. 부스팅 시도를 회피하기 위해, 이들 연구자들은 에볼라 바이러스의 GP를 함유하는 재조합 변형된 백신이나 바이러스 양카라(MVA)로 이루어진 부스터 백신(MVA-EBO)과 조합된 cAd-EBO 백신의 안전성 및 면역원성을 평가하는 부가적인 임상 시험을 수행할 것을 제안하고 있다. 이러한 접근법이 성공적 이더라도, cAd 및 MVA 둘 다에 대한 중화 항체의 개발은 이들 2개의 재조합 백신을 사용한 추가의 면역화를 경감시킬 수 있으므로 고려되어야 한다.

[0105] Ad5 벡터는 EA, 예컨대 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 및 RESTV 항원, 예컨대 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및 L의 높은 수준 및 효율적인 형질도입을 허용하는 독특한 기회를 제공한다. Ad5 기반 벡터가 가진 주요한 문제점들 중 하나는 인간 집단에서 Ad에 대한 기존 면역의 높은 경향, 및 이것이 임의의 부가적인 백신 적용에 있어서 대부분의 인간 집단에서 종래의 Ad5[E1-] 결실(1세대 Ad)의 사용을 어떻게 배제할 수 있는냐이다.

[0106] Ad5[E1-, E2B-]-에볼라 백신: 기존의 항-Ad5 면역의 시도를 극복하기 위한 Ad5[E1-, E2b-] 백신의 사용

[0107] 인간 및 동물에서의 연구는, Ad5에 대한 기존 면역이 Ad-기반 백신의 상업적인 사용에 대한 저해 인자일 수 있음을 언급하고 있다. 대부분의 인간은 인간 백신에 가장 광범위하게 사용되는 서브타입인 Ad5에 대한 항체를 갖고 있으며, 연구된 인간의 2/3는 Ad5에 대한 림프구-증식성 반응을 갖고 있다. 이러한 기존 면역은 전형적인 Ad5 백신을 사용한 면역화 또는 재-면역화를 저해할 수 있고, 이후에 Ad5 벡터를 사용한 제2 항원에 대한 백신의 면역화를 배제할 수 있다. 기존의 항-벡터 면역의 문제점을 극복하는 것이 심도있는 조사의 주제가 되어 왔다. 대안적인 인간(비-Ad5 기반) Ad5 서브타입 또는 심지어 비-인간 형태의 Ad5를 사용한 조사가 시험되어 왔다. 이들 접근법이 초기 면역화에 성공한다 하더라도, 후속적인 백신접종은 신규 Ad5 서브타입에 대한 면역 반응으로 인해 문제가 될 수 있다. Ad5 면역화 장벽을 피하고, 최적 면역 반응을 유도하는 데 있어서 1세대 Ad5[E1-] 벡터의 제한된 효능을 개선하기 위해, 본 발명의 다양한 실시형태들은 차세대 Ad5 벡터 기반 백신 플랫폼에 관한 것이다. 새로운 Ad5 플랫폼은 E2b 영역에 DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질 유전자를 제거하는 부가적인 결실을 가진다. Ad5[E1-, E2b-] 플랫폼은 많은 가능한 유전자들의 포함을 허용하기에 충분한 확장된 클로닝 용량을 가지고 있다. Ad5[E1-, E2b-] 벡터는 Ad5[E1-] 벡터의 7 kb 용량과 비교하여 최대 약 12 kb의 유

전자-운반 능력을 가지고 있으며, 필요하다면 다수의 유전자들을 위한 공간을 제공한다. 일부 실시형태에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11 kb 초과인 삽입물이 Ad5 벡터, 예컨대 Ad5[E1-, E2b-] 벡터 내에 도입된다. E2b 영역의 결실은 본 발명의 Ad5 벡터에 유리한 면역 특성을 부여하며, 종종, Ad 바이러스 단백질에 대한 면역 반응을 최소화하면서도 표적 전이유전자 항원에 대한 강력한 면역 반응을 유도한다.

[0108] 다양한 실시형태들에서, 본 발명의 Ad5[E1-, E2b-] 벡터는 강력한 CMI, 뿐만 아니라 Ad 면역의 존재 하에서도 벡터 발현된 백신 항원에 대한 항체를 유도한다. Ad5[E1-, E2b-] 벡터는 또한, Ad5[E1-] 벡터와 비교하여 감소된 부작용, 특히 간독성 및 조직 손상의 감소된 출현을 가진다. 이들 Ad5 벡터의 주요 양태는, Ad5 후기 유전자의 발현이 크게 감소된다는 점이다. 예를 들어, 캡시드 섬유 단백질의 생성은 Ad5[E1-] 벡터의 경우 생체내에서 검출될 수 있었으며, 한편 섬유 발현은 Ad5[E1-, E2b-] 벡터 백신으로부터 제거되었다. 야생형 Ad에 대한 선천적 면역 반응은 복잡하다. Ad5[E1-, E2b-] 벡터로부터 결실된 단백질은 일반적으로 중요한 역할을 한다. 구체적으로는, 전-말단 단백질 또는 DNA 폴리머라제가 결실된 Ad5[E1-, E2b-] 벡터는, Ad5[E1-] 벡터와 비교하여, 주사 후 처음 24시간 내지 72시간 동안 감소된 염증을 나타낸다. 다양한 실시형태들에서, Ad5 유전자 발현의 결여는, 감염된 세포가 항-Ad 활성에 대해 보이지 않게 하고 감염된 세포가 전이유전자를 연장된 기간 동안 발현하도록 허용하며, 이는 표적에 대한 면역을 발달시킨다.

[0109] 본 발명의 다양한 실시형태는 수지상 세포에 형질도입되는 Ad5[E1-, E2b-] 벡터의 능력을 증가시키고, Ad5[E1-, E2b-] 벡터 바이러스 단백질에 대한 감소된 염증 반응 및 기존의 Ad 면역에 대한 결과적인 회피를 이용함으로써, 백신에서 항원 특이적인 면역 반응을 개선하는 것을 고려한다.

[0110] 일부 경우에, 이러한 면역 유도는 수개월이 소요될 수 있다. Ad5[E1-, E2b-] 벡터는 항원 특이적인 면역 반응의 유도 측면에서 Ad5[E1-] 벡터보다 더 안전할 뿐만 아니라 우수한 것으로 보이며, 이는 Ad5[E1-, E2b-] 벡터를 임상 반응을 초래할 수 있는 에볼라 백신을 전달하기 위한 플랫폼으로서 훨씬 더 양호하게 적합하게 만든다.

[0111] 본 발명의 다양한 실시형태들은 에볼라에 대한 치료용 백신의 개발을 위해 오랫동안 추구되어 온 수요를 전달하는 데에 새로운 Ad5[E1-, E2b-] 벡터 시스템을 이용함으로써, 다른 Ad5 시스템에서 발견된 장벽을 극복하고, Ad5에 이미 노출된 적이 있는 사람의 면역화를 허용한다.

[0112] 다양한 실시형태들에서, Ad5[E1-, E2b-] 벡터를 포함하는 본 발명의 조성물 및 방법은 기술적 안전성의 한도 내에서 증가된 총 생존율(OS)이라는 에볼라 백신 효과를 가진다.

[0113] 아데노바이러스 벡터

[0114] 1세대 아데노바이러스 벡터와 비교하여, 본 발명의 2세대 E2b 결실된 아데노바이러스 벡터의 소정의 실시형태는 DNA 폴리머라제 유전자(po1)에 부가적인 결실 및 전-말단 단백질(pTP)의 결실을 함유한다. E2b 결실된 벡터는 1세대 아데노바이러스 벡터의 5 kb 내지 6 kb 용량과 비교하여 최대 13 kb의 유전자-운반 능력을 가지며, 여러 가지 표적 항원들 중 임의의 표적 항원을 코딩하는 핵산 서열을 위한 공간을 쉽게 제공한다. E2b 결실된 아데노바이러스 벡터는 또한, 1세대 아데노바이러스 벡터와 비교하여 감소된 부작용을 가진다. E2b 결실된 벡터는 바이러스 유전자의 감소된 발현을 가지고, 이러한 특징은 생체내에서 연장된 전이유전자 발현을 초래한다.

[0115] 야생형 Ad에 대한 선천적 면역 반응은 복잡할 수 있고, 아데노바이러스 벡터로부터 발현되는 Ad 단백질은 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 구체적으로는, E2b 결실된 벡터에서 전-말단 단백질 및 DNA 폴리머라제의 결실은 주사 후 처음 24시간 내지 72시간 동안 염증을 감소시키는 것으로 보이는 반면, 1세대 아데노바이러스 벡터는 이 기간 동안 염증을 자극한다. 또한, E2b 결실에 의해 생성된 부가적인 복제 차단(block) 또한, Ad 후기 유전자의 발현에 있어서 E1, E3 결실 단독에 의해 부여되는 것을 훨씬 증가하여 10,000배의 감소를 초래하는 것으로 보고되어 있다. E2b 결실된 아데노바이러스 벡터에 의해 생성된 Ad 단백질의 감소된 수준은 Ad 항원에 대한 경쟁적이며 바람직하지 못한 면역 반응에 대한 잠재성을 효과적으로 감소시키며, 이러한 면역 반응은 Ad 면역화된 개체 또는 Ad 노출된 개체에서 플랫폼의 반복된 사용을 방지한다. 2세대 E2b 결실된 벡터에 의한 염증 반응의 감소된 유도는, 항원 제시 세포(즉, 수지상 세포)의 감염 동안 요망되는 백신 항원을 발현하는 벡터의 잠재성을 증가시키고, 항원 경쟁의 잠재성을 감소시키고, 1세대 아데노바이러스 벡터를 이용한 동일한 시도와 비교하여 요망되는 항원에 대한 백신의 면역화를 더 크게 한다. E2b 결실된 아데노바이러스 벡터는, 1세대 아데노바이러스 벡터를 사용하는 이전에 기재된 백신 후보물질보다 더 안전하고, 더 효과적이며 더 다재다능한 개선된 Ad-기반 백신 후보물질을 제공한다.

[0116] 따라서, 1세대, E1-결실된 아데노바이러스 서브타입 5(Ad5)-기반 벡터는 백신으로서 사용하기에 유망한 플랫폼 이긴 하지만, 자연 발생적인 Ad-특이적 중화 항체 또는 유도된 Ad-특이적 중화 항체에 의해 활성이 지체된다.

이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, E1 영역 및 E2b 영역(후자는 DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질을 코딩함)이 결실된 Ad5-기반 벡터(Ad5[E1-, E2b-])는 Ad-면역 숙주에서 예를 들어 감소된 후기 바이러스 단백질 발현으로 인해 면역학적 제거를 피하고 코딩된 항원 전이유전자에 대한 보다 강력한 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0117] 본 발명은 미국 특허 6,063,622; 6,451,596; 6,057,158; 6,083,750; 및 8,298,549에 기재된 것들과 같은 E2b 결실된 아데노바이러스 벡터의 사용을 고려한다. 많은 경우 E2b 영역이 결실된 벡터는 바이러스 단백질 발현에 심각한 손상을 미치고/거나 복제 적격 Ad(RCA)를 발생시키는 빈도를 감소시킨다. 이들 E2b 결실된 아데노바이러스 벡터의 증식은, 결실된 E2b 유전자 생성물을 발현하는 세포주를 이용하여 수행될 수 있다. 본 발명은 또한, 이러한 패키징 세포주; 예를 들어 HEK-293 세포주 유래의 E.C7(이전에 C-7로 지칭됨)을 제공한다.

[0118] 나아가, E2b 유전자 생성물, DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질은 E.C7, 또는 유사한 세포에서 E1 유전자 생성물과 함께 구성적으로 발현될 수 있다. Ad 계놈으로부터 생성 세포주로의 유전자 분절의 트랜스퍼는 즉각적인 이득을 가진다: (1) 증가된 운반 능력; 및 (2) 전형적으로 RCA를 발생시키기 위해 2개 이상의 독립적인 재조합 사건을 필요로 하는 RCA 발생의 감소된 잠재성. 본 발명에 사용되는 E1, Ad DNA 폴리머라제 및/또는 전-말단 단백질 발현 세포주는, 오염성 헬퍼 바이러스의 필요 없이, 13 kb에 달하는 운반 능력을 가진 아데노바이러스 벡터의 증식을 가능하게 할 수 있다. 또한, 바이러스 라이프 사이클에 중요한 유전자(예, E2b 유전자)가 결실된 경우, 다른 바이러스 유전자 단백질을 복제하거나 발현시키는 Ad의 추가적인 손상이 발생한다. 이는 바이러스에 의해 감염된 세포의 면역 인지를 감소시킬 수 있고, 외래 전이유전자 발현 기간을 연장시킬 수 있다.

[0119] E1, DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질 결실된 벡터는 전형적으로, E1 영역 및 E2b 영역으로부터 각각의 단백질을 발현시킬 수 없다. 나아가, 이러한 벡터는 대부분의 바이러스 구조 단백질의 발현의 결여를 나타낼 수 있다. 예를 들어, Ad의 주요 후기 프로모터(MLP)는 후기 구조 단백질 L1 내지 L5의 전사에 책임이 있다. MLP가 Ad 계놈 복제 전에 최소한으로 활성적이라도, 고도로 독성인 Ad 후기 유전자는 주로, 오로지 바이러스 계놈 복제가 발생한 후에야 MLP로부터 전사 및 번역된다. 후기 유전자 전사의 이러한 cis-의존적 활성화는 일반적으로 DNA 바이러스의 특징이며, 예컨대 폴리오마 및 SV-40의 성장에 있어서의 특징이다. DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질이 (E4 또는 단백질 IX 단백질과는 달리) Ad 복제에 중요하다. 이들의 결실은 아데노바이러스 벡터 후기 유전자 발현, 및 APC와 같은 세포에서 해당 발현의 독성 효과에 극도로 유해할 수 있다.

[0120] 소정의 실시형태에서, 본 발명에 사용되는 것으로 고려되는 아데노바이러스 벡터는 Ad 계놈의 E2b 영역 및 선택적으로 E1 영역에 결실을 가진 E2b 결실된 아데노바이러스 벡터를 포함한다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 결실된 Ad 계놈의 임의의 다른 영역을 가지지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명에 사용되는 것으로 고려되는 아데노바이러스 벡터는 Ad 계놈의 E2b 영역에 결실, 및 선택적으로 E1 및 E3 영역에 결실을 가진 E2b 결실된 아데노바이러스 벡터를 포함한다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 결실된 다른 영역을 가지지 않는다. 추가의 실시형태에서, 본 발명에 사용되는 것으로 고려되는 아데노바이러스 벡터는 Ad 계놈의 E2b 영역에 결실, 및 선택적으로 E1, E3 영역에 결실, 및 또한 선택적으로 E4 영역의 부분적인 또는 완전한 제거를 가진 아데노바이러스 벡터를 포함한다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 다른 결실을 갖지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명에 사용되는 것으로 고려되는 아데노바이러스 벡터는 Ad 계놈의 E2b 영역에 결실, 및 선택적으로 E1 및/또는 E4 영역에 결실을 가진 아데노바이러스 벡터를 포함한다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 다른 결실을 갖지 않는다. 부가적인 실시형태에서, 본 발명에 사용되는 것으로 고려되는 아데노바이러스 벡터는 Ad 계놈의 E2a, E2b 및/또는 E4 영역에 결실을 가진 아데노바이러스 벡터를 포함한다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 다른 결실을 갖지 않는다. 일 실시형태에서, 본원에 사용되기 위한 아데노바이러스 벡터는 E1 및/또는 E2b 영역의 DNA 폴리머라제 기능이 결실된 벡터를 포함한다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 다른 결실을 갖지 않는다. 추가의 실시형태에서, 본원에 사용되기 위한 아데노바이러스 벡터는 E1 및/또는 E2b 영역의 전-말단 단백질 기능에 결실을 가진다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 다른 결실을 갖지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 본원에 사용되기 위한 아데노바이러스 벡터는 E1, DNA 폴리머라제 및/또는 전-말단 단백질 기능에 결실을 가진다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 다른 결실을 갖지 않는다. 하나의 특정 실시형태에서, 본원에 사용되는 것으로 고려되는 아데노바이러스 벡터는 E2b 영역 및/또는 E1 영역의 적어도 일부가 결실되어 있다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 "거티드" 아데노바이러스 벡터가 아니다. 이러한 측면에서, 이러한 벡터는 E2b 영역의 DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질 기능 둘 다가 결실되어 있을 수 있다. 부가적인 실시형태에서, 본 발명에 사용되기 위한 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 계놈의 E1, E2b 및/또는 100K 영역에 결실을 가진 아데노바이러스 벡터를 포함한다. 일 실시형태에서, 본원에 사용되기 위한 아데노바이러스 벡터는 E1, E2b 및/또는 프로테아제 기능이 결실된 벡터를 포함한다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 다른 결실을 갖지 않는다. 추가의 실시형태에서, 본원에 사용되기 위한 아데노바이러스 벡

터는 E1 및/또는 E2b 영역이 결실되어 있는 한편, 섬유 유전자는 돌연변이 또는 (예, Ad 향성(tropism)을 변경시키기 위한) 다른 변경에 의해 변형되어 있다. E3 또는 E4 영역으로부터의 유전자의 제거는 언급된 아데노바이러스 벡터들 중 임의의 벡터에 첨가될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 아데노바이러스 벡터는 "거티드" 아데노바이러스 벡터일 수 있다.

[0121] 본 발명은 또한, 면역 경로 체크포인트 조정제와 조합된, 에볼라 유전자에 대해 면역화하기 위한 바이러스 유전자 전달 플랫폼을 사용한, 에볼라에 대한 면역요법을 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 예를 들어, 바이러스 유전자 전달 플랫폼을 사용한, 에볼라에 대한 면역요법을 위한 조성물 및 방법이 면역 경로 체크포인트 조정제, 예컨대 PD1의 저해제와 조합되어 사용되어, 에볼라 유전자에 대해 면역화할 수 있다. 이들 조성물 및 방법은 면역 경로 체크포인트 조정제, 예컨대 체크포인트 저해제의 저해제와 조합된 Ad5[E1-, E2b-]-에볼라 백신을 이용할 수 있다.

[0122] 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되고/거나 제시되는 표적 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 에볼라 항원, 예컨대 세포에 의해 발현되거나 제시되는 에볼라 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되거나 제시되는 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원, 예컨대 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L 또는 이들의 임의의 조합에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되고/거나 제시되는 EBOV 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되고/거나 제시되는 SUDV 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되고/거나 제시되는 TAFV 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되고/거나 제시되는 BDBV 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되고/거나 제시되는 RESTV 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되고/거나 제시되는 GP에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되고/거나 제시되는 NP에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되고/거나 제시되는 VP40에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되고/거나 제시되는 VP35에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되고/거나 제시되는 VP30에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되고/거나 제시되는 VP24에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되고/거나 제시되는 L에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다.

[0123] 본 조성물 및 방법은 세포에 의해 발현되고/거나 제시되는 다수의 표적 항원들에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 2개 이상의 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원, 예컨대 2개 이상의 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및 L 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 EBOV 항원 및 SUDV 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 TAFV 항원 및 BDBV 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 RESTV 항원 및 EBOV 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 GP 및 NP에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 GP 및 VP40에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 GP 및 VP35에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 GP 및 VP30에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 GP 및 VP24에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 GP 및 L에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 NP 및 VP40에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 NP 및 VP35에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 NP 및 VP30에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 NP 및 VP24에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 NP 및 L에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 VP40 및 VP35에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 VP40 및 VP30에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 VP40 및 VP24에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 VP40 및 L에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 VP35 및 VP30에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 VP35 및 VP24에 대한 면역 반응을

을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 VP35 및 L에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 VP30 및 VP24에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 VP30 및 L에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물 및 방법은 VP24 및 L에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다.

[0124] EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원, 예컨대 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L의 변형된 형태가, EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원, 예컨대 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L; 또는 EBOV, SUDV, TAFV, BDBV 또는 RESTV 항원, 예컨대 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L을 발현하고/거나 제시하는 세포에 대한 면역 반응을 증가시키기 위한 백신에 사용될 수 있다. 전형적으로, 폴리뉴클레오타이드 변이체는 하나 이상의 치환, 첨가, 결실 및/또는 삽입을 함유할 것이며, 바람직하게는 변이체 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된 폴리펩타이드의 에피토프의 면역원성 또는 이중성 표적 단백질의 면역원성이 천연 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 폴리펩타이드와 비교하여 실질적으로 감소하지 않도록 함유할 것이다. 일부 경우에, 상기 하나 이상의 치환, 첨가, 결실 및/또는 삽입은 변이체 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된 폴리펩타이드의 에피토프의 면역원성을 증가시킬 수 있다. 본원 어디에서나 기재된 바와 같이, 폴리뉴클레오타이드 변이체는 표적 항원 또는 이의 단편(예, 에피토프)의 변이체를 코딩할 수 있으며, 여기서, 변이체 폴리펩타이드 또는 이의 단편(예, 에피토프)이 항원-특이적 항혈청 및/또는 T-세포주 또는 클론과 반응하는 경향은 천연 폴리펩타이드와 비교하여 실질적으로 감소하지 않는다. 폴리뉴클레오타이드 변이체는 표적 항원 또는 이의 단편의 변이체를 코딩할 수 있으며, 여기서, 변이체 폴리펩타이드 또는 이의 단편이 항원-특이적 항혈청 및/또는 T-세포주 또는 클론과 반응하는 경향은 천연 폴리펩타이드와 비교하여 실질적으로 증가한다.

[0125] 특히, 본 발명은, 하나 이상의 항원성 표적 엔티티에 대한 복수의 백신접종이 달성될 수 있도록 개선된 Ad-기반 백신을 제공한다. 일부 실시형태에서, 개선된 Ad-기반 백신은 표적 항원, 이의 단편, 변이체 또는 변이체 단편, 예컨대 Ad5[E1-, E2b-]-EBOV를 가진 복제 결함 아데노바이러스를 포함한다. 표적 항원, 예컨대 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L의 변이체 또는 단편은 면역원성 잠재성을 포함한 여러 가지 인자들을 기반으로 선택될 수 있다. 돌연변이체 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L은 각각 야생형 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L과 비교하여 면역 반응을 상승시키는 이의 증가된 능력 덕분에 이용될 수 있다. 중요하게는, 백신접종은 Ad에 대한 기존 면역의 존재 하에 수행될 수 있거나, 본 발명의 Ad 벡터 또는 다른 Ad 벡터를 사용하여 이미 수회 면역화된 피험체에게 투여될 수 있다. Ad 벡터는, 비제한적으로 하나 이상의 표적 항원에 대한 항체 생성 및 CMI 반응을 포함하여, 관심 항원, 예컨대 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 피험체에게 수회 투여될 수 있다. 특히 실시형태에서, 표적 항원의 변이체 또는 단편은, 이들이 하나 이상의 감소된 생물학적 활성을 갖도록 변형된다. 예를 들어, 에볼라 단백질 표적 항원은 단백질의 바이러스 활성을 감소시키거나 제거하도록 변형될 수 있거나, 바이러스 단백질은 하나 이상의 활성 또는 바이러스 단백질을 감소시키거나 제거하도록 변형될 수 있다. 변형된 에볼라 단백질의 일례는 변이체 단백질, 예컨대 증가된 면역원성을 가진 변이체 단백질을 초래하는 점 돌연변이를 가진 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L이다.

[0126] 요망되는 표적 항원 폴리펩타이드 또는 이의 단편 또는 변이체, 또는 이들 중 임의의 것을 포함하는 융합 단백질을 발현시키기 위해, 본원에 기재된 바와 같이, 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 기능적 등가물이 당업계에 알려진 재조합 기술을 사용하여 본원 어디에서나 기재된 바와 같이 적절한 Ad 내로 삽입된다.

[0127] 조성물

[0128] 에볼라 면역요법 및 백신을 위한 바이러스 벡터

[0129] 재조합 바이러스 벡터는 단백질 코딩 유전자 또는 항원(예, EA)을 발현하도록 사용될 수 있다. 재조합 바이러스 벡터 기반의 백신 및 면역요법의 이점으로는, 높은 효율의 유전자 형질도입, 표적 세포로의 유전자의 고도로 특이적인 운반, 강력한 면역 반응의 유도, 및 증가된 세포성 면역 등이 있다. 본 개시내용은 바이러스 계통의 결정적인 영역의 결실 또는 삽입을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 본 개시내용에 의해 제공되는 바이러스 벡터는 하나 이상의 관심 표적 항원, 또는 이의 변이체, 단편 또는 융합체를 코딩하는 이중성 핵산 서열을 포함할 수 있으며, 이에 대한 면역 반응을 발생시키는 것이 바람직하다.

[0130] 본 개시내용의 방법 및 조성물과 함께 사용될 수 있는 적합한 바이러스 벡터로는, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 프로바이러스, 백시나 바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관된 바이러스, 자가-보완성(self-complementary) 아데노-연관된 바이러스, 사이토메갈로바이러스 또는 헵다이 바이러스 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 복제-적격일 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스

백터는 복제-결합성일 수 있다. 복제-결합성 바이러스 백터에 있어서, 바이러스의 게놈은 다른 유전자로 대체되거나 결실된 복제 및 패키징의 부가적인 라운드에 필수적인 코딩 영역을 가질 수 있다. 이들 바이러스는 이들의 표적 세포를 감염시키고 이들의 바이러스 페이로드(payload)를 전달할 수 있지만, 그런 다음 세포 용해 및 사멸을 초래하는 전형적인 용해 경로를 지속하지 못한다. 바이러스 백터에 따라, 복제-결합성 바이러스 백터 내의 허용 가능한 DNA 또는 cDNA 삽입물의 전형적인 최대 길이는 약 8 킬로베이스(kb) 내지 10 킬로베이스일 수 있다.

[0131] 레트로바이러스는 역전사효소를 함유하는 항원, 예컨대 외피화된 단일-가닥 RNA 바이러스를 발현시키는 데 사용되어 왔다. 레트로바이러스 백터는 복제-결합성일 수 있다. 레트로바이러스 백터는 무린 또는 조류 기원일 수 있다. 레트로바이러스 백터는 폴로니 무린 백혈병 바이러스(MoMLV) 유래일 수 있다. 유전자 발현을 위해 게놈 통합을 필요로 하는 레트로바이러스 백터가 사용될 수 있다. 레트로바이러스 백터는 장기적인 유전자 발현을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 레트로바이러스 백터는 대략 7 kb 내지 11 kb의 게놈 크기를 가질 수 있고, 7 kb 내지 8 kb 길이의 외래 DNA 삽입물을 가질 수 있다. 레트로바이러스 백터는 낮은 면역원성을 나타내도록 사용될 수 있고, 대부분의 환자는 레트로바이러스 백터에 대한 기존 면역을 나타내지 않는다. 레트로바이러스 백터는 분열중인 세포를 감염시키는 데 사용될 수 있다. 레트로바이러스 백터는 비-분열중인 세포를 감염시키지 않는 데 사용될 수 있다.

[0132] 렌티바이러스 백터는 항원을 발현하도록 사용되어 왔다. 렌티바이러스는 레트로바이러스의 하위부류를 구성한다. 렌티바이러스 백터는 비-분열중인 세포를 감염시키는 데 사용될 수 있다. 렌티바이러스 백터는 분열중인 세포를 감염시키는 데 사용될 수 있다. 렌티바이러스 백터는 비-분열중인 세포 및 분열중인 세포 둘 다를 감염시키는 데 사용될 수 있다. 렌티바이러스는 일반적으로, 레트로바이러스보다 더 넓은 항성을 나타낸다. 몇몇 단백질, 예컨대 tat 및 rev는 렌티바이러스의 복제를 조절한다. 이들 조절 단백질은 전형적으로 레트로바이러스에는 존재하지 않는다. HIV는 전이유전자 전달 백터 내로 조작될 수 있는 예시적인 렌티바이러스이다. 렌티바이러스 백터의 이점은 레트로바이러스 백터의 이점과 유사하다. 렌티바이러스가 종양발생을 잠재적으로 유발할 수 있긴 하지만, 그 위험도는 렌티바이러스의 통합 부위가 세포성 프로모터를 가진 부위와 멀리 떨어져 있기 때문에 레트로바이러스 백터보다 더 낮다. HIV-기반 백터는 예를 들어, HIV 바이러스 외피, 및 백터 생성 동안 필요하지 않은 조절 유전자들 중 일부를 제거함으로써 발생될 수 있다. 외피가 세포 및 조직 특이성을 결정하기 때문에, 부모 외피 대신 몇몇 키메라 외피 백터 또는 변형된 외피 백터가 발생된다.

[0133] 사이토메갈로바이러스(CMV) 백터가 항원을 발현시키는 데 사용되어 왔다. CMV는 헤르페스바이러스의 구성원이다. 종-특이적 CMV가 사용될 수 있다(예, 인간 CMV(HCMV), 예를 들어, 인간 헤르페스바이러스 타입 5). HCMV는 캡시드에 의해 둘러싸인 235 kb 이중-가닥 선형 DNA 게놈을 함유한다. 외피는 당단백질 gB 및 gH를 함유하고, 이러한 당단백질은 세포성 수용체에 결합한다.

[0134] 센다이 바이러스(SeV) 백터가 항원을 발현시키는 데 사용되어 왔다. SeV는 파라믹소바이러스과의 외피화된 단일-가닥 RNA 바이러스이다. SeV 게놈은 6개의 단백질, 및 세포 도입을 매개하고 이의 항성을 결정하는 2개의 외피 당단백질, HN 및 F 단백질을 코딩한다. F 단백질이 결여된 SeV 백터는 복제-결합성 바이러스로서 사용되어 해당 백터의 안전성을 개선할 수 있다. 패키징 세포에서 생성된 SeV 백터는 F 단백질을 발현시키는 데 사용될 수 있다. F 유전자-결실되고 전이유전자-삽입된게놈은 패키징 세포 내로 형질감염될 수 있다. SeV는 RNA 의존적 RNA 폴리머라제를 함유하고, 바이러스 게놈은 세포질로 위치화된다. 이는, 감염 후 곧 신속한 유전자 발현의 발생 및 SeV의 유전자독성 이점을 보장한다. SeV 백터는 고도로 효율적인 유전자 전달을 나타내는 데에 사용될 수 있다. SeV 백터는 분열중인 세포 및 비-분열중인 세포 둘 다에 형질도입하는 데 사용될 수 있다. SeV 백터는 비-분열중인 세포에 형질도입하는 데 사용될 수 있다. SeV 백터는 분열중인 세포에 형질도입하는 데 사용될 수 있다. SeV 백터는 예를 들어 인간 기도 상피 세포에 효율적으로 형질도입하는 데 사용될 수 있다. SeV 백터는 예를 들어 (예, 경구 및 비)점막 경로에 의해 투여될 수 있다. 비내 투여가 사용되어, SeV에 대한 기존 면역의 영향을 근육내 투여와 비교하여 잠재적으로 감소시킬 수 있다. 다른 바이러스 백터와 비교하여, 이의 전이유전자 용량(3.4 kb)은 낮다. SeV는 인간 파라인플루엔자 타입 1(hPIV-1) 바이러스에 대해 고도로 상동성이며; 따라서, hPIV-1에 대한 기존 면역이 SeV의 사용에 불리하게 작용할 수 있다.

[0135] **아데노바이러스 백터**

[0136] 일반적으로, 아데노바이러스는 광범위한 항성을 가질 수 있으며, 여러 가지 분열중인 세포 타입 및 비-분열중인 세포 타입을 감염시킬 수 있고, 포유류 신체에서 전신적으로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 보다 선택적인 점막 표면을 통해 사용될 수 있기 때문에, 임상적으로 매력적이다. 또한, 아데노바이러스의 상대적인 열안정성은 이

의 임상적 용도를 더 촉진한다. 아데노바이러스는 선형 이중-가닥 게놈을 함유하는 정20면체, 비-외피화된 캡시드를 특징으로 하는 DNA 바이러스 과이다. 일반적으로, 아데노바이러스는 크기가 대략 30 kb 내지 35 kb인 이중-가닥 DNA 게놈을 포함하는 비-외피화된 바이러스로서 발견된다. 인간 Ad 중에는, 임의의 신생물성 질환과 연관된 것은 없으며, 면역적격 개체에서 상대적으로 약하고 자가-제한적인 병을 유발할 뿐이다. 바이러스에 의해 발현되는 제1 유전자는 E1 유전자이며, 이 유전자는 야생형 게놈에 존재하는 다른 Ad5 유전자 프로모터로부터 높은-수준의 유전자 발현을 개시하는 작용을 한다. 바이러스 DNA 복제 및 자손 비리온의 조립은 감염된 세포의 핵 내에서 발생하고, 전체 라이프 사이클은 약 36시간이 소요되고, 산출량은 1개 세포 당 대략 10^4 개 비리온이다. 야생형 Ad5 게놈은 대략 36 kb이고, 조기 바이러스 기능 및 후기 바이러스 기능으로 분류되는 유전자를, 이들이 DNA 복제 이전 또는 이후에 발현되는지에 따라 코딩한다. Ad5에 의해 이미 감염된 세포의 중복 감염은 이것이 그 자체의 게놈을 복제한 후가 될 때까지 중복 감염 바이러스로부터 후기 유전자 발현을 결여시키기 때문에, 조기/후기 경계 식별은 거의 완벽하다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 이는 Ad5 주요 후기 프로모터(MLP)의 복제 의존적 *cis*-활성화로 인한 것일 것이며, 이러한 활성화는 복제된 게놈이 캡슐화된 상태로 존재할 때까지 후기 유전자 발현(주로 Ad5 캡시드 단백질)을 방지한다. 본 발명의 조성물 및 방법은 진보된 세대의 Ad 벡터/백신의 개발에 그 특징을 이용한다. 아데노바이러스의 선형 게놈은 일반적으로 그 측면에 DNA 복제를 위한 2개의 기원(ITR)이 존재하고, RNA 폴리머라제 II-매개 전사를 위한 8개의 단위를 가진다. 게놈은 5개의 조기 단위 E1A, E1B, E2, E3, E4 및 E5, 바이러스 복제의 개시 후 지연되어 발현되는 2개의 단위(IX 및 IVa2), 및 L1 내지 L5로 세분되는 하나의 후기 단위(L)를 가진다. 일부 아데노바이러스는 바이러스-연관된(VA) RNA라고 하는 RNA의 1개 종 또는 2개 종을 추가로 코딩할 수 있다.

[0137] 인간 환자에서 선천적 면역 반응 및 후천적 면역 반응을 유도하는 아데노바이러스가 제공된다. 바이러스 게놈의 결정적인 영역의 결실 또는 삽입에 의해, 바이러스 게놈의 예측 가능성(predictability)을 증가시키고 원하지 않는 부작용을 감소시키도록 조작된 재조합 벡터가 제공된다. 일부 양태에서, 본 발명은 E1A, E1B, E2, E3, E4, E5, IX, IVa2, L1, L2, L3, L4 및 L5 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 게놈 결실 또는 삽입을 포함하는 아데노바이러스 벡터를 제공한다.

[0138] 본 개시내용은 변경된 캡시드를 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 일반적으로, 아데노바이러스의 캡시드는 주로 정20면체의 20개의 삼각 말단면(triangular facet)을 포함하고, 각각의 정20면체는 핵소 삼량체의 12개 복사본을 함유한다. 또한, 다른 몇몇 부가적인 부(minor) 캡시드 단백질, IIIa, VI, VIII 및 IX가 또한 존재한다.

[0139] 본 개시내용은 하나 이상의 변경된 섬유 단백질을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 일반적으로, 삼량체를 형성하기도 하는 섬유 단백질은 12개의 꼭짓점에서 오량체 펜톤 염기 내에 삽입된다. 이러한 섬유는 얇은 N-말단 꼬리, 샤프트(shaft) 및 knob 도메인(knob domain)을 포함할 수 있다. 샤프트는 가변 수의 β -가닥 반복부를 포함할 수 있다. knob은 하나 이상의 루프 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J를 포함할 수 있다. 섬유 knob 루프는 세포 수용체에 결합할 수 있다. 본 개시내용은 에볼라 치료용 백신 시스템에 사용되는 아데노바이러스 벡터를 제공한다.

[0140] 본 방법 및 본 개시내용의 조성물과 함께 사용될 수 있는 적합한 아데노바이러스로는, 인간 하위군 A, B1, B2, C, D, E 및 F 또는 본원에 제공된 바와 같은 이들의 결정적인 게놈 영역을 포함한 종-특이적 아데노바이러스가 있으나 이로 한정되는 것은 아니며, 이러한 하위군은 면역학적으로 구별되는 혈청형으로 더 분류될 수 있다. 나아가, 본 방법 및 개시내용의 조성물에 사용될 수 있는 적합한 아데노바이러스로는, 영장류, 소, 새, 파충류 또는 개구리로부터 동정된 종-특이적 아데노바이러스 또는 이의 결정적인 게놈 영역 등이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0141] 일부 아데노바이러스 혈청형은 별개의 기관들을 우선적으로 표적화한다. 혈청형, 예컨대 AdHu1, AdHu2 및 AdHu5(아속 C)는 일반적으로 상부 호흡기 감염에 영향을 미치는 한편, 아속 A 및 아속 F는 위장 기관에 영향을 미친다. 본 개시내용은 에볼라 치료를 위해 별개의 기관을 우선적으로 표적화하는 데 사용되는 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 일부 적용에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 포유류에서 특정 기관에의 향성을 감소시키도록 변경된다. 일부 적용에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 포유류에서 특정 기관에의 향성을 증가시키도록 변경된다.

[0142] 아데노바이러스의 향성은 숙주 세포 수용체에의 이의 부착 능력에 의해 결정될 수 있다. 일부 경우에, 숙주 세포 부착 과정은, 처음에 섬유의 원위부 knob 도메인이 숙주 세포 표면 분자에 결합한 다음, 펜톤 염기 내의 RGD 모티프가 αV 인테그린과 결합하는 것을 수반할 수 있다. 본 개시내용은, 재조합 아데노바이러스 벡터가 숙주의

특정 세포 타입을 감염시키기 위해 유전자 조작될 수 있도록 변경된 항성을 가진 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 본 개시내용은 세포-특이적 에볼라 감염의 치료를 위해 변경된 항성을 가진 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 본 개시내용은 하위군 A, B, C, D 또는 F 또는 이들의 조합 유래의 하나 이상의 아데노바이러스로부터의 변경된 섬유 농 또는 RGD 서열의 삽입을 가진 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 일부 적용에서, 변경된 섬유 농을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터는 하나 이상의 특정 세포 타입에 대한 항성이 감소된 벡터를 초래한다. 일부 적용에서, 변경된 섬유 농을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터는 하나 이상의 특정 세포 타입에 대한 항성이 증강된 벡터를 초래한다. 일부 적용에서, 변경된 섬유 농을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터는 생성물-특이적 B 또는 T-세포 반응이 감소된 벡터를 초래한다. 일부 적용에서, 변경된 섬유 농을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터는 생성물-특이적 B 또는 T-세포 반응이 증강된 벡터를 초래한다.

[0143] 본 개시내용은 바이러스-중화 항체의 효과를 피하거나 또는 숙주 세포 내로의 형질도입을 개선하기 위해 다른 분자로 코팅된 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 본 개시내용은 숙주 세포 수용체에의 벡터의 부착에 일조하는 어댑터 분자로 코팅된 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 예를 들어, 아데노바이러스 벡터는 콕사키 Ad 수용체(CAR)를 CD40L와 연결하는 어댑터 분자로 코팅되어, 수지상 세포의 형질도입을 증가시킴으로써 피험체에서 면역 반응을 증강시킬 수 있다. 다른 표적 세포 타입에의 부착을 증강시키기 위해 유사하게 조작된 다른 아데노바이러스 벡터 또한, 본 개시내용에 포함된다.

[0144] Ad5 벡터

[0145] 인간 및 동물에서의 연구는, Ad5에 대한 기존 면역이 Ad-기반 백신의 상업적인 사용에 대한 저해 인자일 수 있음을 나타내었다. 대부분의 인간은 인간 백신을 위해 가장 널리 사용되는 서브타입인 Ad5에 대한 항체를 갖고 있으며, 연구된 인간의 2/3는 Ad5에 대한 림프구-증식성 반응을 갖고 있다. 이러한 기존 면역은 전형적인 Ad5 백신을 사용한 면역화 또는 재-면역화를 저해할 수 있고, 이후에 Ad5 벡터를 사용한, 제2 항원에 대한 백신의 면역화를 배제할 수 있다. 기존의 항-벡터 면역의 문제점을 극복하는 것은 심도있는 조사의 주제가 되어 왔다. 대안적인 인간(비-Ad5 기반) Ad5 서브타입 또는 심지어 비-인간 형태의 Ad5를 사용한 조사가 검사되어 왔다. 이들 접근법이 초기 면역화에서는 성공적이더라도, 후속적인 백신접종은 신규 Ad5 서브타입에 대한 면역 반응으로 인해 문제가 될 수 있다. Ad5 면역화 장벽을 피하고, 최적의 면역 반응을 유도하기 위해 1세대 Ad5[E1-] 벡터의 제한된 효능을 개선하기 위해, 본 발명의 다양한 실시형태는 차세대 Ad5 벡터-기반의 백신 플랫폼에 관한 것이다.

[0146] 1세대, 또는 E1-결실된 아데노바이러스 벡터 Ad5[E1-]는, 전이유전자가 유전자의 E1 영역만 대체하도록 구축된다. 전형적으로, 야생형 Ad5 계통의 약 90%가 벡터 내에 보유된다. Ad5[E1-] 벡터는 복제 능력이 감소되어 있으며, Ad5 E1 유전자를 발현하지 않는 세포의 감염 후 감염성 바이러스를 생성할 수 없다. 재조합 Ad5[E1-] 벡터는 이러한 Ad5[E1-] 벡터의 복제 및 패키징을 허용하는 인간 세포(예, 293 세포)에서 증식된다. Ad5[E1-] 벡터는 다수의 긍정적인 특질들을 갖고 있으며; 가장 중요한 특질 중 하나는 이의 스케일 업 및 cGMP 생성이 상대적으로 용이하다는 점이다. 현재, 220개를 훌쩍 넘는 인간 임상 시험들이 Ad5[E1-] 벡터를 이용하고 있으며, 2000명이 넘는 피험체가 바이러스를 피하, 근육내 또는 정맥내로 접종받는다. 부가적으로, Ad5 벡터는 통합되지 않으며; 이의 계통은 에피솜에 남아 있다. 일반적으로, 숙주 계통 내로 통합되지 않는 벡터의 경우, 삽입 돌연변이생성 및/또는 생식선 전이의 위험은 있다고 하더라도 극히 낮다. 종래의 Ad5[E1-] 벡터는 7 kb에 근접한 운반 능력을 갖고 있다.

[0147] E1 영역 및 E2b 영역이 결실된 Ad5-기반 벡터(Ad5[E1-, E2b-])는 저하된 후기 바이러스 단백질 발현에 의해 Ad-면역 숙주에서 면역학적 제거를 피하고 코딩된 에볼라 항원 전이유전자에 대해 보다 강력한 면역 반응을 유도하는 기회를 제공하며, 상기 E2b 영역은 DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질을 코딩한다. Ad5 플랫폼은 E2b 영역에 부가적인 결실을 갖고 있어서, DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질 유전자를 제거한다. Ad5[E1-, E2b-] 플랫폼은 가능한 한 많은 유전자들을 포함시키기에 충분한 확장된 클로닝 용량을 가진다. Ad5[E1-, E2b-] 벡터는 Ad5[E1-] 벡터의 7 kb 용량과 비교하여 약 12 kb 이하의 유전자-운반 능력을 가지며, 필요하다면 다수의 유전자들에 대한 공간을 제공한다. 일부 실시형태에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11 kb 초과 삽입물이 Ad5 벡터, 예컨대 Ad5[E1-, E2b-] 벡터 내에 도입된다. E2b 영역의 결실은 본 발명의 Ad5 벡터에 유리한 면역학적 특성을 부여하여, 종종 Ad 바이러스 단백질에 대한 면역 반응을 최소화하면서도 표적 전이유전자 항원에 대한 강력한 면역 반응을 이끌어낸다.

[0148] 다양한 실시형태들에서, 본 발명의 Ad5[E1-, E2b-] 벡터는 강력한 CMI를 유도할 뿐만 아니라, 심지어 Ad 면역의 존재 하에 벡터-발현된 백신 항원에 대한 항체를 유도한다. Ad5[E1-, E2b-] 벡터는 또한, Ad5[E1-] 벡터와 비교

하여 감소된 부작용, 특히 간독성의 출현 및 조직 손상을 가진다. 이들 Ad5 벡터의 주요 양태는, Ad 후기 유전자의 발현이 크게 감소된다는 것이다. 예를 들어, 캡시드 섬유 단백질의 생성은 Ad5[E1-, E2b-] 벡터의 경우 생체내에서 검출될 수 있었으며, 한편, 섬유 발현은 Ad5[E1-, E2b-] 벡터 백신으로부터 제거되었다. 야생형 Ad에 대한 선천적 면역 반응은 복잡하다. Ad5[E1-, E2b-] 벡터로부터 결실된 단백질은 일반적으로 중요한 역할을 한다. 구체적으로는, 전-말단 단백질 또는 DNA 폴리머라제가 결실된 Ad5[E1-, E2b-] 벡터는 Ad5[E1-] 벡터와 비교하여 주사 후 처음 24시간 내지 72시간 동안 감소된 염증을 나타낸다. 다양한 실시형태들에서, Ad5 유전자 발현의 결여는 감염된 세포에서 항-Ad 활성이 나타나지 않게 하며, 감염된 세포가 연장된 기간 동안 전이유전자를 발현할 수 있게 하여, 표적에 대한 면역을 발달시킨다.

[0149] 본 발명의 다양한 실시형태는 수지상 세포에 형질도입되는 Ad5 [E1-, E2b-] 벡터의 능력을 증가시키는 것, Ad5[E1-, E2b-] 벡터 바이러스 단백질에 대한 감소된 염증 반응을 이용함으로써 백신에서 항원 특이적인 면역 반응을 개선하는 것, 및 기존의 Ad 면역의 결과적인 모면을 고려한다.

[0150] 복제 결함 Ad5 벡터

[0151] 항-Ad 면역을 극복하려는 시도는 대안적인 Ad 혈청형의 사용 및/또는 Ad5 바이러스 캡시드 단백질에서의 변경을 포함하였으며, 각각은 제한된 성공을 거두었으며 생성된 백신의 생체분포를 상당히 변경시키는 잠재성을 갖고 있다. 따라서, 완전히 신규 접근법은 기존의 Ad 면역의 표적인 것으로 알려진 단백질인 E1 결실된 Ad5 벡터로부터 바이러스 단백질의 발현을 추가로 감소시킴으로써 시도되었다. 구체적으로는, 신규 재조합 Ad5 플랫폼은 조기 1(E1) 유전자 영역이 결실되어 있으며 조기 2b(E2b) 유전자 영역이 부가적으로 결실되어 있는 것으로 기재되어 있다(Ad5[E1-, E2b-]). (DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질을 코딩하는) E2b 영역의 결실은 감소된 바이러스 DNA 복제 및 후기 바이러스 단백질 발현을 초래한다. 이러한 벡터 플랫폼은 에볼라 감염 동물 모델에서 CMI 반응을 유도하는 데 사용될 수 있으며, 보다 중요하게는, 이러한 재조합 Ad5 유전자 전달 플랫폼은 Ad5 면역의 장벽을 극복하고, 기존의 Ad 면역 및/또는 벡터-유도 Ad 면역의 설정에 사용될 수 있어서, 백신의 복수의 동종 투여를 가능하게 한다. 특정한 실시형태에서, 본 발명은 면역원성 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함하는 혈청형 5의 복제 결함 아데노바이러스 벡터에 관한 것이다. 면역원성 폴리펩타이드는 돌연변이체, 자연적 변이체 또는 이의 단편일 수 있다.

[0152] 일부 실시형태에서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 야생형 면역원성 폴리펩타이드 또는 이의 단편과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9%의 동일성을 가진 폴리펩타이드를 코딩하는 변형된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 야생형 폴리펩타이드의 하위단위를 코딩하는 변형된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 서열 번호1, 2, 4, 5 또는 6과 적어도 60%의 서열 동일성을 포함하는 아데노바이러스-유래 벡터에 관한 것이다.

[0153] 일부 실시형태에서, 선택적으로 복제 결함 아데노바이러스에 관한 아데노바이러스-유래 벡터는 서열 번호 1, 2, 4, 5 또는 6과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9%의 동일성을 갖는 서열, 또는 서열 번호3으로부터 대안적인 코돈 대체에 의해 발생된 서열을 포함한다. 다양한 실시형태들에서, 본원에 기재된 아데노바이러스-유래 벡터는 E2b 영역, 및 선택적으로 E1 영역에 결실을 가지며, 이러한 결실은 본원에 기재된 바와 같이 면역요법에서 벡터의 용도에 여러 가지 이점들을 부여한다.

[0154] 아데노바이러스 게놈 내의 소정의 영역은 필수적인 기능을 수행하고, 본 발명의 복제 결함 아데노바이러스 벡터를 구축할 때 실질적으로 보존될 필요가 있을 수 있다. 이들 영역은 문헌[Lauer et al., J. Gen. Virol., 85, 2615-25 (2004), Leza et al., J. Virol., p. 3003-13 (1988) 및 Miralles et al., J. Bio Chem., Vol. 264, No. 18, p. 10763-72 (1983)]에 더 기재되어 있으며, 이들 문헌은 그 전체가 인용에 의해 포함된다. 서열 번호 1, 2, 4, 5 또는 6의 일부와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9%의 동일성 값을 가진 서열, 예컨대 서열 번호 1, 2, 4, 5 또는 6의 적어도 약 100개, 250개, 500개, 1000개 이상의 염기를 포함하는 부분을 포함하는 재조합 핵산 벡터가 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0155] 본 발명은 E2b 결실된 아데노바이러스 벡터, 예컨대 미국 특허 6,063,622; 6,451,596; 6,057,158; 6,083,750; 및 8,298,549에 기재된 것들의 용도를 고려한다. 많은 경우, E2b 영역이 결실된 벡터는 바이러스 단백질 발현 기능을 제대로 하지 못하고/거나 복제 적격 Ad(RCA)를 발생시키는 빈도를 감소시킨다. 이들 E2b 결실된 아데노바이러스 벡터의 증식은 결실된 E2b 유전자 생성물을 발현하는 세포주를 이용하여 수행될 수 있다. 이러한 패키징 세포주는 본원에 제공되어 있으며; 예를 들어, HEK-293 세포주로부터 유래된 E.C7(이전에는 C-7이라고 불렸음)이 있다.

- [0156] 나아가, E2b 유전자 생성물, DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질은 E.C7, 또는 E1 유전자 생성물과 함께 유사한 세포에서 구성적으로 발현될 수 있다. Ad 게놈으로부터 생성 세포주로의 유전자 분절의 이동은 즉각적인 이득: (1) 증가된 운반 능력; 및 (2) 전형적으로 RCA를 발생시키기 위해 2개 이상의 독립적인 재조합 사건을 필요로 하는 RCA 발생의 감소된 잠재성을 가진다. 본 발명에 사용되는 E1, Ad DNA 폴리머라제 및/또는 전-말단 단백질 발현 세포주는 오염성 헬퍼 바이러스의 필요 없이, 13 kb에 근접한 운반 능력을 가진 아데노바이러스 벡터의 증식을 가능하게 할 수 있다. 또한, 바이러스 라이프 사이클에 중요한 유전자(예, E2b 유전자)가 결실된 경우, 다른 바이러스 유전자 단백질을 복제하거나 발현시키는 Ad의 추가적인 무능화가 발생한다. 이는 감염된 세포의 면역 인지를 감소시킬 수 있고, 외래 전이유전자 발현의 기간을 연장할 수 있다.
- [0157] E1, DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질 결실된 벡터는 전형적으로, E1 영역 및 E2b 영역 유래의 각각의 단백질을 발현할 수 없다. 나아가, 이들은 대부분의 바이러스 구조 단백질의 발현의 결여를 보여줄 수 있다. 예를 들어, Ad의 주요 후기 프로모터(MLP)는 후기 구조 단백질 L1 내지 L5의 전사를 책임진다. MLP가 Ad 게놈 복제 전에 최소로 활성화되긴 하지만, 바이러스 게놈 복제가 발생한 후에야 고도로 독성인 Ad 후기 유전자가 MLP로부터 주로 전사되고 번역된다. 이러한 후기 유전자 전사의 cis-의존적 활성화는 일반적으로 예컨대 폴리오마 및 SV-40의 성장에서 DNA 바이러스의 특징이다. DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질은 (E4 또는 단백질 IX 단백질과는 달리) Ad 복제에 중요하다. 이들의 결실은 아데노바이러스 벡터 후기 유전자 발현, 및 APC와 같은 세포에서 이의 발현의 독성 효과에 극히 불리할 수 있다.
- [0158] 아데노바이러스 벡터는 Ad 게놈의 E2b 영역, 및 선택적으로 E1 영역에 결실을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 Ad 게놈의 임의의 다른 영역에 결실을 갖지 않는다. 아데노바이러스 벡터는 Ad 게놈의 E2b 영역에 결실, 및 E1 및 E3 영역에 결실을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 결실된 다른 영역을 갖지 않는다. 아데노바이러스 벡터는 Ad 게놈의 E2b 영역에 결실, 및 E1 및 E3 영역에 결실, 및 E4 영역에 부분적인 또는 완전한 제거를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 다른 결실을 갖지 않는다. 아데노바이러스 벡터는 Ad 게놈의 E2b 영역에 결실, 및 E1 및/또는 E4 영역에 결실을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 다른 결실을 함유하지 않는다. 아데노바이러스 벡터는 Ad 게놈의 E2a, E2b 및/또는 E4 영역에 결실을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 다른 결실을 갖지 않는다. 아데노바이러스 벡터는 E1 영역, 및/또는 E2b 영역의 DNA 폴리머라제 기능에 결실을 가질 수 있다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 다른 결실을 갖지 않는다. 아데노바이러스 벡터는 E1 영역, 및/또는 E2b 영역의 전-말단 단백질 기능에 결실을 가질 수 있다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 다른 결실을 갖지 않는다. 아데노바이러스 벡터는 E1, DNA 폴리머라제 및/또는 전-말단 단백질 기능에 결실을 가질 수 있다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 다른 결실을 갖지 않는다. 아데노바이러스 벡터는 E2b 영역 및/또는 E1 영역의 적어도 일부를 가질 수 있다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 거티드 아데노바이러스 벡터가 아니다. 이러한 측면에서, 벡터는 E2b 영역의 DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질 기능 둘 다가 결실될 수 있다. 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 게놈의 E1, E2b 및/또는 100K 영역에 결실을 가질 수 있다. 아데노바이러스 벡터는 E1, E2b 및/또는 프로테아제 기능이 결실된 벡터를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 이러한 벡터는 다른 결실을 갖지 않는다. 아데노바이러스 벡터는 E1 및/또는 E2b 영역에 결실을 가질 수 있으며, 한편 섬유유전자는 돌연변이 또는 (예, Ad 항성을 변경시키기 위한) 다른 변경에 의해 변형되어 있다. E3 영역 또는 E4 영역으로부터의 유전자의 제거가, 언급된 아데노바이러스 벡터 중 임의의 아데노바이러스 벡터에 첨가될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 아데노바이러스 벡터는 거티드 아데노바이러스 벡터일 수 있다.
- [0159] Ad 게놈의 다른 영역이 결실될 수 있다. Ad 게놈의 특정 영역에서의 "결실"은, 해당 영역에 의해 코딩된 적어도 하나의 유전자 생성물의 발현 및/또는 기능(예, DNA 폴리머라제의 E2b 기능 또는 전-말단 단백질 기능)을 방지하는 방식으로 돌연변이화 또는 제거된 특정 DNA 서열을 지칭한다. 결실은 단백질의 일부를 코딩하는 엑손 내에서의 결실뿐만 아니라 프로모터 및 리더 서열 내에서의 결실을 포함한다. 특정 영역 내에서의 결실은 Ad 게놈의 해당 영역 내에서의 적어도 하나의 염기쌍의 결실을 지칭한다. 1개 초과 염기쌍이 결실될 수 있다. 예를 들어, 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 또는 150개의 염기쌍이 특정 영역으로부터 결실될 수 있다. 이러한 결실은 Ad 게놈의 특정 영역 내에서의 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250 또는 300개 초과 염기쌍일 수 있다. 이들 결실은 이 영역에 의해 코딩된 유전자 생성물의 발현 및/또는 기능을 방지할 수 있다. 예를 들어, Ad 게놈의 특정 영역은, 하나 이상의 코딩된 단백질이 비-기능성이 되도록 하나 이상의 점 돌연변이를 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는, 비기능성 단백질을 초래하는 아미노산 서열의 변화를 유발하는 상이한 잔기로 대체된 잔기를 포함한다. Ad 게놈에서의 예시적인 결실 또는 돌연변이는 E1a, E1b, E2a, E2b, E3, E4, L1, L2, L3, L4, L5, TP, POL, IV 및 VA 영역 중 하나 이상을 포함한다. 결실된 아데노바이러스 벡터는 예를 들어 재조합 기술을 사용하여 제작될 수 있다.

- [0160] 본 발명에 사용되기 위한 Ad 벡터는, E2b 유전자 생성물, 및 결실되었을 수 있는 필수 유전자 중 임의의 필수 유전자의 생성물을 구성적으로 발현하는 적절한 패키징 세포주를 사용하여 고 역가로 성공적으로 성장될 수 있다. E1 및 DNA 폴리머라제 단백질뿐만 아니라 Ad-전-말단 단백질을 구성적으로 발현하는 HEK-293-유래 세포가 사용될 수 있다. 예를 들어, 아데노바이러스 벡터의 고 역가 스톱을 성장시키기 위해, E.C7 세포가 사용될 수 있다.
- [0161] 자가-증식성 아데노바이러스 벡터로부터 중요한 유전자를 결실시키기 위해, 표적화된 유전자에 의해 코딩된 단백질이 HEK-293 세포에서 우선 공동발현되거나, 또는 E1 단백질과 함께 유사하게 공동발현될 수 있다. 예를 들어, 구성적으로 공동발현될 때 무독성인 이들 단백질(또는 유도적으로 발현되는 독성 단백질)은 선택적으로 이용될 수 있다. HEK-293 세포에서의 E1 유전자 및 E4 유전자의 공동발현이 (예, 구성적이 아닌 유도성 프로모터를 이용하여) 가능하다. E1 및 단백질 IX 유전자, 비리온 구조 단백질이 공동발현될 수 있다. E1, E4 및 단백질 IX 유전자의 추가적인 공동발현 또한 가능하다. E1 및 100K 유전자는 트랜스-보완 세포주에서 발현될 수 있으며, E1 및 프로테아제 유전자 또한 마찬가지로 발현될 수 있다.
- [0162] E2b 결실된 Ad 입자를 고 역가로 성장시키는 데 사용되기 위한 E1 및 E2b 유전자 생성물을 공동발현하는 세포주가 사용될 수 있다. 유용한 세포주는 대략 140 kDa Ad-DNA 폴리머라제 및/또는 대략 90 kDa 전-말단 단백질을 구성적으로 발현한다. 독성 없이 E1, DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질의 높은 수준의 구성적 공동발현을 가진 세포주(예, E.C7)가 복수의 백신접종용 Ad의 증식에 사용되기에 바람직하다. 이들 세포주는 E1, DNA 폴리머라제 및 전-말단 단백질이 결실된 아데노바이러스 벡터의 증식을 허용한다.
- [0163] 본 발명의 제조합 Ad는 예를 들어, 적절한 MOI(예, 5)에서 Ad 벡터 바이러스 스톱을 사용하여 감염되고 37℃에서 40시간 내지 96시간 동안 인큐베이션된 E.C7 세포를 함유하는 조직 배양 플레이트를 사용하여 증식될 수 있다. 감염된 세포를 수확하고, 10 mM Tris-Cl(pH 8.0)에 재현탁하고, 초음파처리할 수 있으며, 바이러스를 2차례의 세슘 클로라이드 밀도 원심분리에 의해 정제할 수 있다. 바이러스를 함유하는 밴드를 컬럼에 걸쳐 탈염시킬 수 있으며, 수크로스 또는 글리세롤을 첨가할 수 있고, 분취액을 -80℃에 저장할 수 있으며, 바이러스를 이의 안정성을 증강시키도록 디자인된 용액, 예컨대 A195에 넣을 수 있다. 스톱의 역가를 (예, 용해 후 바이러스 분취액의 광학 밀도를 260 nm에서 측정함으로써) 측정할 수 있다. 전체 제조합 E2b 결실된 아데노바이러스 벡터를 포함하는 선형 또는 환형 플라스미드 DNA를 E.C7 또는 유사한 세포 내에 형질감염시킬 수 있고, 바이러스 생성의 증거(예, 세포변성 효과)가 존재할 때까지 37℃에서 인큐베이션할 수 있다. 세포 유래의 조건화된 배지를 사용하여, 보다 많은 세포를 감염시켜, 정제 전에 생성되는 바이러스의 양을 증가시킬 수 있다. 정제는 예를 들어, 2차례의 세슘 클로라이드 밀도 원심분리 또는 선택적 여과에 의해 달성될 수 있다. 바이러스는 상업적으로 입수 가능한 제품 또는 커스텀 크로마토그래피 컬럼을 사용한 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.
- [0164] 본 발명의 조성물은, 감염되는 세포가 소정의 수의 바이러스와 만나는 것을 보장하기 위해 충분한 바이러스를 포함할 수 있다. 따라서, 다양한 실시형태들에서, 본 발명은 제조합 Ad의 스톱, 예컨대 제조합 Ad의 RCA-무함유 스톱을 제공한다. 바이러스 스톱은, 대체로 바이러스 유전형, 및 이를 제조하는 데 사용되는 프로토콜 및 세포주에 따라 역가가 상당히 변할 수 있다. 바이러스 스톱은 적어도 약 10^6 , 10^7 또는 10^8 pfu/ml 또는 그 이상의 역가, 예컨대 적어도 약 10^9 , 10^{10} , 10^{11} 또는 10^{12} pfu/ml의 역가를 가질 수 있다. 제조합 바이러스 및 패키징 세포주의 성질에 따라, 본 발명의 바이러스 스톱은 심지어 약 10^{13} 입자/ml 이상의 역가를 가질 수 있다.
- [0165] 항원 표적을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 변이체
- [0166] 본 개시내용은 추가로, 하나 이상의 관심 표적 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이의 단편 또는 변이체로 지칭되기도 하는 핵산 서열을 제공한다. 이와 같이, 본 발명은 본원에 추가로 기재된 바와 같이 임의의 소스 유래의 표적 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 이러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 및 이러한 발현 벡터로 형질전환되거나 형질감염된 숙주 세포를 제공한다. 요망되는 표적 항원 폴리펩타이드를 발현하기 위해, 이러한 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 기능적인 등가물이 적절한 Ad 벡터 내로 (예, 제조합 기술을 사용하여) 삽입될 수 있다. 적절한 아데노바이러스 벡터는 삽입된 코딩 서열의 전사 및 번역을 위한 필수적인 요소들, 및 임의의 요망되는 링커를 함유할 수 있다. 당업자에게 잘 알려져 있는 방법이 사용되어, 관심 폴리펩타이드를 코딩하는 서열, 및 적절한 전사 및 번역 조절 요소를 함유하는 이들 아데노바이러스 벡터를 구축할 수 있다. 이들 방법은 시험관내 제조합 DNA 기술, 합성 기술 및 생체내 유전자 제조합을 포함한다.
- [0167] 폴리뉴클레오타이드는 천연 서열(즉, 본 발명의 표적 항원 폴리펩타이드/단백질/에피토프를 코딩하는 내인성 서

열 또는 이의 일부)을 포함할 수 있거나, 이러한 서열의 변이체, 단편 또는 유도체를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 서열은 표적 항원 단백질을 코딩할 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 천연 뉴클레오타이드 서열 또는 변이체와 실질적으로 다를 수 있으나 유사한 단백질 항원을 코딩하는, 특정 세포 타입에서의 발현을 위해 최적화된 신규 유전자 서열을 나타낸다.

[0168] 다른 관련된 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 변이체는 단백질(예, 관심 표적 항원)을 코딩하는 천연 서열과 실질적인 동일성을 가지며, 예를 들어 폴리펩타이드를 코딩하는 천연 폴리뉴클레오타이드 서열과 비교하여 적어도 70%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그보다 높은 서열 동일성을 포함하는 것들이다(예, 표준 파라미터를 사용한 BLAST 분석). 이들 값은 코돈 축퇴, 아미노산 유사성, 해독 프레임 위치화(reading frame positioning) 등을 고려하여, 2개의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 단백질의 상응하는 동일성을 확인하도록 적절하게 조정될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 천연 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 단백질 서열과 비교하여 예를 들어 적어도 70%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그보다 높은 서열 동일성을 포함하는 단백질을 코딩할 수 있다.

[0169] 폴리뉴클레오타이드는 폴리펩타이드(예, 표적 단백질 항원)를 코딩하는 적어도 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 11, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 또는 1000개 또는 그 이상의 연속 뉴클레오타이드, 및 이들 사이의 모든 중간 길이를 포함할 수 있다. 이러한 맥락에서 "중간 길이"는 인용된 값들 사이의 임의의 길이, 예컨대 16, 17, 18, 19 등; 21, 22, 23 등; 30, 31, 32 등; 50, 51, 52, 53 등; 100, 101, 102, 103 등; 150, 151, 152, 153 등; 200 내지 500 사이의 모든 정수를 포함하며; 500 내지 1,000 등을 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드 서열은 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에서, 폴리펩타이드, 예컨대 에피토프 또는 이중성 표적 단백질을 코딩하는 천연 서열에서 발견되지 않는 부가적인 뉴클레오타이드에 의해 연장될 수 있다. 이러한 부가적인 서열은 개시된 서열의 어느 한쪽 말단에서 또는 개시된 서열의 양쪽 말단에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드로 이루어질 수 있다.

[0170] 코딩 서열 자체의 길이와는 상관없이 폴리뉴클레오타이드는 다른 DNA 서열, 예컨대 프로모터, 발현 조절 서열, 폴리아데닐화 신호, 부가적인 제한 효소 부위, 다수의 클로닝 부위, 다른 코딩 분절 등과 조합될 수 있으며, 따라서 이러한 폴리뉴클레오타이드의 총 길이가 상당히 다양해질 수 있다. 따라서, 대체로 임의의 길이의 핵산 단편이 이용될 수 있는 것으로 고려되며, 총 길이는 바람직하게는 의도되는 재조합 DNA 프로토콜에서 제조 및 용도의 용이성에 의해 제한된다. (모든 중간 길이를 포함하여) 총 길이가 약 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10,000, 약 500, 약 200, 약 100, 약 50개 염기쌍 길이 등인 예시적인 폴리뉴클레오타이드 분절은 본 발명의 많은 실시에서 유용한 것으로 고려된다.

[0171] 돌연변이생성 접근법, 예컨대 부위-특이적 돌연변이생성이 표적 항원 서열의 제조에 이용될 수 있다. 폴리펩타이드 서열 내의 특이적인 변형은 이를 코딩하는 기본(underlying) 폴리뉴클레오타이드의 돌연변이생성을 통해 이루어질 수 있다. 요망되는 돌연변이의 DNA 서열을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드 서열의 사용뿐만 아니라 횡단되는(traversed) 결실 연결부의 양쪽 면 상에서 안정한 듀플렉스를 형성하기 위해 충분한 크기의 프라이머 서열 및 서열 복잡성을 제공하기 위해 충분한 수의 인접한 뉴클레오타이드의 사용을 통해 돌연변이체를 만들기 위해 부위-특이적 돌연변이생성이 사용될 수 있다. 예를 들어, 길이가 약 14개 내지 약 25개 뉴클레오타이드 등을 포함하는 프라미어가 이용될 수 있으며, 서열의 연결부의 양쪽 면 상의 약 5개 내지 약 10개의 잔기가 변경된다. 돌연변이는 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열에서 이루어져서, 해당 폴리뉴클레오타이드의 특성을 개선, 변경, 감소, 변형 또는 그렇지 않다면 변화시키고/거나 코딩된 폴리펩타이드의 특성, 활성, 조성, 안정성 또는 1차 서열을 변경할 수 있다.

[0172] 폴리뉴클레오타이드 서열의 돌연변이생성은 코딩된 폴리펩타이드의 하나 이상의 특성, 예컨대 폴리펩타이드에 포함된 에피토프의 면역원성 또는 표적 항원의 면역원성을 변경하는 데 사용될 수 있다. 폴리펩타이드의 면역원성을 시험하기 위한 검정법으로는, T-세포 세포독성 검정법(CTL/크롬 방출 검정법), T-세포 증식 검정법, 세포 내 사이토카인 염색, ELISA, ELISPOT 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 펩타이드 및 이를 코딩하는 DNA 서열의 서열 변이체를 수득하는 다른 방식들이 이용될 수 있다. 예를 들어, 요망되는 펩타이드 서열을 코딩하는 재조합 벡터가 돌연변이생성 제제, 예컨대 하이드록실아민으로 처리되어, 서열 변이체가 수득될 수 있다.

[0173] 본 발명의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절 또는 단편은 예를 들어, 단편을 화학적 수단에 의

해 직접 합성함으로써 쉽게 제조될 수 있다. 한편은, 선택된 서열을 재조합 생성용 재조합 벡터 내에 도입함으로써 핵산 복제 기술, 예컨대 PCR의 적용에 의해, 및 일반적으로 분자생물학 기술의 당업자에게 알려진 다른 재조합 DNA 기술에 의해 수득될 수 있다.

[0174] 폴리뉴클레오타이드 서열을 함유하고 생성하도록 여러 가지 벡터/숙주 시스템들이 이용될 수 있다. 예시적인 시스템으로는, 재조합 박테리오파지, 플라스미드 또는 코스미드 DNA 벡터로 형질전환된 미생물, 예컨대 박테리아; 효모 벡터로 형질전환된 효모; 바이러스 벡터(예, 바큘로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 바이러스 벡터(예, 꽃양배추 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV) 또는 박테리아 벡터(예, Ti 플라스미드 또는 pBR322 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 동물 세포 시스템 등이 있다.

[0175] Ad 벡터에 존재하는 조절 요소 또는 제어 서열은 벡터-인헨서의 비-번역된 영역, 프로모터 및 5' 및 3' 비번역된 영역을 포함할 수 있다. 이러한 요소들은 이들의 강도 및 특이성이 다양할 수 있다. 이용되는 벡터 시스템 및 숙주에 따라, 구성적 프로모터 및 유도성 프로모터를 포함하여 임의의 수의 적합한 전사 및 번역 요소가 사용될 수 있다. 예를 들어, 관심 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 후기 프로모터 및 트리파타이트(tripartite) 리더 서열로 이루어진 Ad 전사/번역 복합체 내로 연결될 수 있다. 바이러스 게놈의 비-필수 E1 또는 E3 영역에서의 삽입은, 감염된 숙주 세포에서 폴리펩타이드를 발현시킬 수 있는 생존가능한 바이러스를 수득하는 데 사용될 수 있다. 또한, 전사 인헨서, 예컨대 라우스 육종 바이러스(RSV) 인헨서가 사용되어, 포유류 숙주 세포에서 발현을 증가시킬 수 있다.

[0176] 특이적인 개시 신호(예, ATG 개시 코돈 및 인접한 서열)가 또한 사용되어, 관심 폴리펩타이드를 코딩하는 서열의 보다 효율적인 번역을 달성할 수 있다. 외인성 번역 요소 및 개시 코돈은 천연 및 합성 둘 다인 다양한 기원의 것일 수 있다. 발현 효율은 사용되는 특정 세포 시스템에 적절한 인헨서의 포함에 의해 증강될 수 있다. 전사 또는 번역을 위한 특이적인 종결 서열 또한, 선택된 폴리펩타이드를 코딩하는 서열의 효율적인 번역을 달성하기 위해 혼입될 수 있다.

[0177] 폴리뉴클레오타이드-코딩된 생성물(예, 표적 항원)의 발현을 (예, 생성물에 특이적인 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체를 사용하여) 검출하고 측정하기 위한 여러 가지 프로토콜들이 사용될 수 있다. 그 예로는, 효소-연결 면역흡착 검정법(ELISA), 방사성면역검정법(RIA) 및 형광 활성화된 세포 소팅(FACS) 등이 있다. 주어진 폴리펩타이드 상의 2개의 비-간섭 에피토포에 반응성인 모노클로날 항체를 이용하는 2-부위, 모노클로날-기반 면역검정법이 일부 적용에 바람직할 수 있으나, 경쟁적 결합 검정법 또한, 이용될 수 있다.

[0178] Ad 벡터는 검출되거나 선별될 수 있는 생성물, 예컨대 리포터 유전자를 포함할 수 있으며, 이의 생성물은 예컨대 형광, 발색 또는 형광 기질 상에서의 효소 활성 등에 의해 검출되거나, 성장 조건에 의해 선별될 수 있다. 예시적인 리포터 유전자로는, 녹색 형광 단백질(GFP), β -갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT), 루시페라제, 네오마이신 포스포트랜스퍼라제, 분비된 알칼리 포스파타제(SEAP) 및 인간 성장 호르몬(HGH) 등이 있다. 예시적인 선별 마커로는, 네오마이신(G418), 하이그로마이신 등과 같은 약물 내성이 있다.

[0179] Ad 벡터는 또한, 프로모터 또는 발현 조절 서열을 포함할 수 있다. 프로모터의 선택은 부분적으로는, 표적화된 세포 타입 및 요망되는 조절 정도 또는 타입에 따라 다를 것이다. 본 발명의 맥락에서 적합한 프로모터로는 비제한적으로, 구성적 프로모터, 유도성 프로모터, 조직 특이적 프로모터, 세포 타입 특이적 프로모터, 시간 특이적(temporal specific) 프로모터 또는 사전-특이적 프로모터 등이 있다. 구성적 프로모터 또는 비특이적 프로모터의 예로는, SV40 초기 프로모터, SV40 후기 프로모터, CMV 초기 유전자 프로모터, 소 유두종 바이러스 프로모터 및 아데노바이러스 프로모터 등이 있다. 바이러스 프로모터 외에도, 세포 프로모터 또한, 본 발명의 맥락 내에 포함될 수 있다. 특히, 소위 하우스키핑 유전자를 위한 세포 프로모터가 유용하다(예, β -액틴). 바이러스 프로모터는 일반적으로, 세포 프로모터보다 더 강한 프로모터이다. 유도성 프로모터 또한, 사용될 수 있다. 이들 프로모터로는, 텍사메타손에 의해 유도성인 MMTV LTR, 중금속에 의해 유도성인 메탈로티오네인, 및 cAMP에 의해 유도성인 cAMP 반응 요소를 가진 프로모터, 열 충격 프로모터 등이 있다. 유도성 프로모터를 사용함으로써, 핵산은 세포에 전달될 수 있고, 인두서(inducer)가 첨가될 때까지 휴지 상태로 존재할 것이다. 이는 관심 단백질의 생성 시점을 추가로 조절할 수 있게 한다. 사건-타입 특이적인 프로모터(예, HIV LTR)가 사용될 수 있으며, 이는 예를 들어 에볼라 바이러스 감염과 같은 사건의 발생 시에만 활성이거나 상향조절된다. HIV LTR 프로모터는, tat 유전자 생성물이 존재하지 않는 한 불활성이며, 바이러스 감염 시 활성으로 된다. 일부 사건-타입 프로모터는 또한, 조직-특이적이다. 바람직한 사건-타입 특이적 프로모터로는 바이러스 감염 시 활성화되는 프로모터가 있다.

[0180] 프로모터로는, α -페토단백질, α -액틴, myo D, 암배아 항원, VEGF-수용체; FGF 수용체; TEK 또는 tie 2; tie;

유로키나제 수용체; E-셀렉틴 및 P-셀렉틴; VCAM-1; 엔도글린; 엔도시알린; $\alpha V-\beta 3$ 인테그린; 엔도텔린-1; ICAM-3; E9 항원; 폰 빌레브란트 인자; CD44; CD40; 혈관-내피 캐드헤린; 노치 4, 고분자량 흑색종-연관된 항원; 전립선 특이적 항원-1, 프로바신, FGF 수용체, VEGF 수용체, erb B2; erb B3; erb B4; MUC-1; HSP-27; int-1; int-2, CEA, HBEGF 수용체; EGF 수용체; 티로시나제, MAGE, IL-2 수용체; 전립선 산 포스파타제, 프로바신, 전립선 특이적 막 항원, α -크리스탈린, PDGF 수용체, 인테그린 수용체, α -액틴, SM1 및 SM2 미오신 중쇄, 칼포닌-h1, SM22 α -안지오텐신 수용체, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, 면역글로불린 중쇄, 면역글로불린 경쇄, 및 CD4용 프로모터 등이 있다.

[0181] 억제자 서열, 음성 제어자, 또는 조직-특이적 사일런서가 삽입되어, 폴리뉴클레오타이드의 비-특이적 발현을 감소시킬 수 있다. 다수의 억제자 요소들이 프로모터 영역 내에 삽입될 수 있다. 전사의 억제는 억제자 요소의 배향에 독립적이거나 프로모터로부터 떨어져 있다. 억제자 성령의 하나의 타입은 인슐레이터 서열(insulator sequence)이다. 이러한 서열은 전사를 저해하고, 백그라운드 전사를 침묵시킬 수 있다. 음성 제어 요소는 다수의 상이한 유전자들의 프로모터 영역에 위치할 수 있다. 억제자 요소는 스테로이드와 같은 인자의 부재 시 전사의 억제자로서 작용할 수 있으며, 오브알부민 유전자의 프로모터 영역 내의 NSE도 마찬가지이다. 이들 요소의 일부에 상응하는 올리고뉴클레오타이드는 TK 리포터의 바이러스 전사를 억제할 수 있다. 사일런서 요소들 중 하나는 다른 유전자(TCTCTCCNA (서열 번호7)) 내의 사일런서와 서열 동일성을 공유한다

[0182] 나아가, 억제자 요소가 예를 들어 콜라겐 II 유전자를 포함하여 여러 가지 유전자들의 프로모터 영역 내에 위치할 수 있다. HeLa 세포 유래의 핵 인자는 사일런서 영역을 함유하는 DNA 단편에 특이적으로 결합할 수 있다. 억제자 요소는 카르바밀 포스페이트 신터타제 유전자에서 전사를 제어하는 역할을 할 수 있다. 이 유전자는 오로지 2개의 상이한 세포 타입인 간세포 및 장점막의 상피 세포에서만 발현된다. 음성 제어 영역은 또한, 콜린 아세틸트랜스퍼라제 유전자의 프로모터 영역, 알부민 프로모터, 포스포글리세레이트 키나제(PGK-2) 유전자 프로모터, 및 6-포스포프рук토스-2-키나제/프루크토스-2,6-비스포스파타제 유전자에서 발견되며, 여기서 음성 제어 요소는 비-간(non-hepatic) 세포주에서 전사를 저해한다. 더욱이, 음성 제어 요소 Tse-1은 티로신 아미노트랜스퍼라제(TAT)를 포함한 다수의 간 특이적 유전자들에 위치한다. TAT 유전자 발현은 간 특이적이고, 글루코코르티코이드 및 cAMP 신호 경로 둘 다에 의해 유도될 수 있다. cAMP 반응 요소(CRE)는 Tse-1 및 간세포-특이적 요소에 의한 억제를 위한 표적으로 요청될 수 있다. 이에, 이러한 각종 요소들이 알려져 있거나 쉽게 동정되는 것은 분명하다.

[0183] 소정의 실시형태에서, 요망되는 표적 항원의 발현을 증가시키는 요소가 본원에 기재된 Ad 벡터의 핵산 서열 내에 혼입될 수 있다. 예시적인 요소로는, 내부 리보솜 결합 부위(IRES)가 있다. IRES는 번역 효율을 증가시킬 수 있다. 마찬가지로, 다른 서열도 발현을 증강시킬 수 있다. 일부 유전자에 있어서, 특히 5' 말단의 서열은 전사 및/또는 번역을 저해할 수 있다. 이들 서열은 통상, 헤어핀 구조를 형성할 수 있는 회문(palindrome)이다. 일부 경우, 전달되는 핵산 내의 이러한 서열은 결실된다. 전사체 또는 번역된 생성물의 발현 수준은 어떤 서열이 발현에 영향을 미치는지 확인하거나 알아내기 위해 검정될 수 있다. 전사체 수준은 노던 블롯 혼성화, RNase 프로브 보호 등을 포함한 임의의 공지된 방법에 의해 검정될 수 있다. 단백질 수준은 ELISA를 포함한 임의의 공지된 방법에 의해 검정될 수 있다.

[0184] **에볼라 항원-특이적 면역요법 및 백신**

[0185] 본 개시내용은 본원에 제공된 바와 같은 이러한 벡터 및 다른 벡터를 이용하는, 에볼라 항원, 예컨대 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L에 대한 단일 항원 또는 조합 항원 면역화를 제공한다. 본 개시내용은 에볼라 항원에 대한 치료용 백신을 제공한다. 본 개시내용은 에볼라 항원에 대한 예방용 백신을 제공한다. 나아가, 다양한 실시형태들에서, 조성물 및 방법은 임상 반응, 예컨대 변경된 질병 진행 또는 기대 수명을 초래할 수 있다.

[0186] 여러 가지 항원들을 코딩하는 Ad5[E1-] 벡터가 사용되어, 생체외에서 노출된 DC 중 95%를 고 역가의 벡터에 효율적으로 형질도입시킬 수 있다. 중요하게는, 본 발명자들은 벡터를 이용한 감염 다중도(MOI)가 증가함에 따라 DC에서 외래 유전자 발현 수준도 증가하였음을 발견하였다. Ad5[E1-] 벡터에 의해 감염된 DC는 항원 특이적인 CTL 반응을 유도하는 경향을 가진 여러 가지 에볼라 항원들을 코딩할 수 있으며, 증강된 항원 제시 능력을 가지고/거나 혼잡된 림프구 반응에서 T-세포 증식을 개시하는 개선된 능력을 가진다. 중앙 특이적 항원을 코딩하는 Ad5 벡터에 의해 이전에 형질도입된 수지상 세포(DC)를 이용한 동물의 면역화는, 각각의 항원을 발현하는 중앙 세포를 이용한 시도 시, 동물에게 상당한 수준의 보호를 유도하는 데 사용될 수 있다. 흥미롭게는, IL-7을 코딩하는 Ad의 중앙내 주사는 항-중앙 면역을 유도하는 데 있어서 IL-7 코딩 Ad5 벡터로 형질도입된 DC의 주사보다

덜 효과적이다. Ad5 백터에 의한 DC의 생체의 형질도입은 본 개시내용에 의해 고려된다. 생체의 DC 형질도입 전략은 수용체 숙주 관용성을 유도하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, DC 내로의 CTLA4Ig의 Ad5 매개 운반은 DC CD80과 T-세포 상에 제시된 CD28 분자의 상호작용을 차단할 수 있다.

[0187] DC와 Ad5 백터 캡시드 상호작용은 몇몇 유익한 반응을 유도할 수 있으며, 이러한 반응은 Ad5 백터에 의해 코딩된 항원을 제시하는 DC의 능력을 증가시키는 것일 수 있다. 예를 들어, 미성숙한 DC는 항원 섭취에 특화되어 있지만 T-세포 활성화에 있어서는 상대적으로 불충분한 효과기이다. DC 성숙화는, T-세포 면역을 유도하는 DC의 증강된 능력과 일치한다. 일부 경우, 본 발명의 조성물 및 방법은 Ad5 감염을 이용하여, DC 성숙화를 직접적으로 유도한다. 마우스의 미성숙 골수 유래의 DC의 Ad 백터 감염은 DC 성숙화와 통상적으로 연관된 세포 표면 마커(MHC I 및 MHCII, CD40, CD80, CD86 및 ICAM-1)를 상향조절할 수 있을 뿐만 아니라 골수성 DC 성숙화 시 하향 조절되는 인테그린인 CD11c을 하향조절할 수 있다. 일부 경우에, Ad 백터 감염은 DC에 의한, DC 성숙화의 마커인 IL-12 생성을 유발한다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 이들 사건은 가능하게는, Ad5에 의해 유발된 NF- κ B 경로의 활성화로 인한 것일 수 있다. 성숙한 DC는 Ad 백터에 의해 효율적으로 형질도입될 수 있고, (말초 혈액 단핵구로부터 유래되는) 성숙한 CD83+ 인간 DC에 의해 나타난 바와 같이 더 낮은 MOI에서 네이브 T-세포의 증식을 자극하는 이의 기능적인 잠재성을 상실하지 않는다. 그러나, 성숙한 DC는 또한, 미성숙한 DC보다 감염성이 더 낮을 수 있다.

[0188] 캡시드 단백질의 변형은 예를 들어 정상적인 CAR 수용체 감염 메커니즘을 사용하기 보다는 CD40L 수용체를 바이러스 백터 수용체로 사용하여 Ad 백터에 의한 DC의 감염을 최적화할 뿐만 아니라 기능적인 성숙화를 증강시키기 위한 전략으로서 사용될 수 있다.

[0189] 다양한 실시형태들에서, Ad5[E1-, E2b-]-GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 본 발명의 조성물 및 방법은 기술적 안전성의 경계 내에서 증가된 총 생존율(OS)이라는 백신 효과를 가진다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법은 기술적 안전성의 경계 내에서 증가된 총 생존율(OS)이라는 Ad5[E1-, E2b-] 백터(들) GP 백신 효과를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법은 기술적 안전성의 경계 내에서 증가된 총 생존율(OS)이라는 Ad5[E1-, E2b-] 백터(들) NP 백신 효과를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법은 기술적 안전성의 경계 내에서 증가된 총 생존율(OS)이라는 Ad5[E1-, E2b-] 백터(들) VP40 백신 효과를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법은 기술적 안전성의 경계 내에서 증가된 총 생존율(OS)이라는 Ad5[E1-, E2b-] 백터(들) VP35 백신 효과를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법은 기술적 안전성의 경계 내에서 증가된 총 생존율(OS)이라는 Ad5[E1-, E2b-] 백터(들) VP30 백신 효과를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법은 기술적 안전성의 경계 내에서 증가된 총 생존율(OS)이라는 Ad5[E1-, E2b-] 백터(들) VP24 백신 효과를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법은 기술적 안전성의 경계 내에서 증가된 총 생존율(OS)이라는 Ad5[E1-, E2b-] 백터(들) L 백신 효과를 포함할 수 있다.

[0190] 상기 주지한 바와 같이, 본 발명의 아데노바이러스 백터는 하나 이상의 표적 단백질 또는 관심 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 이러한 측면에서, 본 백터는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 상이한 관심 표적 항원들을 코딩하는 핵산을 함유할 수 있다. 표적 항원은 전장 단백질일 수 있거나 이의 단편(예, 에피토프)일 수 있다. 아데노바이러스 백터는 하나의 관심 표적 단백질 유래의 다수의 단편 또는 에피토프들을 코딩하는 핵산 서열을 함유할 수 있거나, 다수의 상이한 관심 표적 단백질들 유래의 하나 이상의 단편 또는 에피토프를 함유할 수 있다.

[0191] 표적 항원은 이에 대한 면역 반응을 발생시키는 것이 바람직한 임의의 성분을 포함할 수 있으나, 일반적으로 표적 항원은 단백질이다. 표적 항원은 전장 단백질, 단백질의 하위단위, 단백질의 이소폼, 또는 면역 반응을 유도하는 이의 단편(즉, 면역원성 단편)을 포함할 수 있다. 표적 항원 또는 이의 단편은 예를 들어, 표적 항원의 하나 이상의 생물학적 활성을 감소시키거나 이의 면역원성을 증강시키기 위해 변형될 수 있다.

[0192] 소정의 실시형태에서, 면역원성 단편은 MHC 부류 I 분자 또는 MHC 부류 II 분자에 결합한다. 면역원성 단편은 MHC 부류 I 분자 또는 MHC 부류 II 분자에의 결합이 당업계에 알려진 임의의 검정법을 사용하여 검출 가능하면 이러한 분자에 "결합할" 수 있다. 예를 들어, MHC 부류 I에 결합하는 폴리펩타이드의 능력은, MHC 부류 I/ β 2m/펩타이드 헤테로삼량체 복합체 내로의 ¹²⁵I 표지된 β -2-마이크로globulin (β -2m)의 혼입을 촉진하는 능력을 모니터링함으로써 간접적으로 평가될 수 있다(문헌[Parker et al., J. Immunol. 152:163, 1994] 참조). 대안적으로, 당업계에 알려진 기능성 펩타이드 경쟁 검정법이 이용될 수 있다. 폴리펩타이드의 면역원성 단편은 일반적으로 동정될 수 있다. 면역원성 단편을 동정하는 대표적인 기술은 항원-특이적 항형질 및/또는 T-세포주 또

는 클론과 반응하는 능력에 대해 폴리펩타이드를 스크리닝하는 것을 포함한다. 특정 표적 폴리펩타이드의 면역원성 단편은, (예, ELISA 및/또는 T-세포 반응성 검정법에서) 전장 표적 폴리펩타이드의 반응성보다 실질적으로 낮지 않은 수준에서 이러한 항원 및/또는 T-세포와 반응하는 단편이다. 즉, 면역원성 단편은 이러한 검정법 내에서, 전장 폴리펩타이드의 반응성과 유사하거나 그보다 큰 수준에서 반응할 수 있다. 이러한 스크린은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0193] 일부 실시형태에서, 본 발명의 바이러스 벡터는 면역 반응을 조절할 수 있는 하나 이상의 단백질, 이의 변이체, 이의 융합체 또는 이의 단편을 코딩하는 이중성 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 바이러스 벡터는 특이적 항원, 예컨대 탄저병 보호 항원에 대한 하나 이상의 항체를 코딩하여, 수동적인 면역요법을 허용한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 바이러스 벡터는 치료 효과(예, 항-바이러스, 항-박테리아, 항-기생충 또는 항-에볼라 기능)를 가진 하나 이상의 단백질을 코딩하는 이중성 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 2세대 E2b 결실된 아데노바이러스 벡터는 이중성 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중성 핵산 서열은 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L, 이들의 변이체, 일부 또는 임의의 조합이다.

[0194] 표적 항원으로는, 여러 가지 에볼라 바이러스 유래의 항원 등이 있으나 이로 한정되는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 에볼라 단백질의 일부 또는 변이체가 표적 항원으로서 이용된다. 일부 실시형태에서, 표적 항원으로서 이용되는 에볼라 단백질의 일부 또는 변이체는 에볼라 단백질 또는 이러한 단백질을 함유하는 세포에 대한 면역 반응을 발현하는 변형된, 예를 들어 증가된 능력을 가진다. 본 발명의 백신은 항원에 대해 백신접종될 수 있다. 백신은 또한, 에피토프를 표적으로 할 수 있다. 항원은 에볼라 바이러스 항원일 수 있다. 에피토프는 에볼라 바이러스 에피토프일 수 있다. 이러한 에볼라 바이러스 에피토프, 예컨대 돌연변이로부터 발생된 에볼라 바이러스의 항원 및 공유된 에볼라 중 특이적 항원은 여러 가지 광범위한 에볼라 바이러스로부터 유래될 수 있다. 에볼라 항원(EA)은 숙주에 의해 통상 발현되지 않는 항원일 수 있다. 에볼라-연관된 항원은 예를 들어, 단백질 또는 단백질 단편, 복합체 탄수화물, 강글리오사이드, 합텐, 핵산, 다른 생물학적 분자 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0195] 본 발명에 유용한 예시적인 에볼라 단백질로는, GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및 L 중 임의의 하나 이상이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및 L로부터 선택되는 변형된 폴리펩타이드를 코딩하는 표적 항원 서열을 포함하며, 여기서, 이러한 폴리펩타이드 또는 이의 단편은 기재된 서열과 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9%의 동일성을 가진다.

[0196] 본 발명자들은, Ad5[E1-, E2b-]-GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L을 이용한 복수의 동종 면역화가 기존의 Ad5-중화 항체 또는 유도된 Ad5-중화 항체의 존재에도 불구하고 동물에서 항-에볼라 활성을 가진 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L-특이적 세포 매개성 면역(CMI) 반응을 유도하였음을 발견하였다. 에볼라 환자의 코호트에게, 상승하는 용량의 Ad5[E1-, E2b-]-GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L을 면역주할 수 있다. 에볼라에 감염된 피험체에서, 신규 Ad5[E1-, E2b-] 유전자 전달 플랫폼은 자연적으로 획득된 Ad5특이적 면역 및 면역화-유도된 Ad5특이적 면역 둘 다의 설정에서 EA GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L에 대해 상당한 CMI 반응을 발생시킨다.

[0197] GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L 항원 특이적인 CMI는 예를 들어, 10⁶개의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 당 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 5000, 10000개 또는 그 이상을 초과하는 IFN- γ 스폿 형성 세포(SFC)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 1000, 12000, 15000 또는 그 이상을 초과하는 기존의 역 Ad5 중화 항체 역가를 가진 인간 피험체에서 상승된다. 면역 반응은 본원에 기재된 바와 같이 세포 매개성 면역 및/또는 체액성 면역을 포함할 수 있다. 면역 반응은 본원에 기재된 바와 같이 세포내 사이토카인 염색(ICS), ELISPOT, 증식 검정법, 크롬 방출을 포함한 세포독성 T-세포 검정법 또는 등가의 검정법, 및 임의의 수의 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 또는 RT-PCR 기반 검정법을 사용한 유전자 발현 분석 중 하나 이상의 의해 이들이 당업자에게 이용 가능한 정도까지 측정될 수 있으며, 뿐만 아니라 당업계에 알려진 면역 반응 측정용의 임의의 다른 적합한 검정법에 의해서도 측정될 수 있다.

[0198] 일부 실시형태에서, 복제 결함 아데노바이러스 벡터는 폴리펩타이드의 야생형 하위단위와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9%의 동일성을 가진 하위단위를 코딩하는 변형된 서열을 포함한다. 면역원성 폴리펩타이드는 돌연변이체 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L, 또는 이의 단편일 수 있다. 일부 실

시형태에서, 복제 결합 아데노바이러스 벡터는 면역원성 폴리펩타이드와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9%의 동일성을 가진 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 서열 번호1의 서열을 포함한다.

[0199] 일부 실시형태에서, 면역원성 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 서열 번호1, 2, 4, 5 또는 6과 적어도 70% 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9%의 동일성을 갖는 서열, 또는 대안적인 코돈 대체에 의해 서열 번호 1, 2, 4, 5 또는 6으로부터 발생된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 아데노바이러스 벡터에 의해 코딩된 면역원성 폴리펩타이드는 야생형 인간 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L 서열과 비교하여 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40개 또는 그 이상의 점 돌연변이, 예컨대 단일 아미노산 치환 또는 결실을 포함한다.

[0200] 소정의 실시형태에서, 에볼라 항원은 에볼라 바이러스에 의해 감염된 개체로부터 직접 동정될 수 있다. 이러한 측면에서, 여러 가지 알려진 기술들을 사용하여 스크린이 수행될 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 세포 또는 조직 생검이 환자로부터 채취되며, RNA가 시료 샘플로부터 단리되고, 유전자 칩(예를 들어, 미국 캘리포니아주 산타 클라라 소재의 Affymetrix사)을 사용하여 스크리닝되고, 에볼라 바이러스 항원이 동정된다. 일단 에볼라 바이러스 표적 항원이 동정되면, 이 항원은 당업계에 알려진 기술을 사용하여 클로닝, 발현 및 정제될 수 있다.

[0201] 그런 다음, 이러한 표적 항원은 하나 이상의 에피토프에 혼입되거나, 본원에 기재된 카세트 또는 바이러스 벡터에 연결되고, 환자에 투여되어, 에볼라 감염된 환자 유래의 샘플로부터 단리된 표적 분자에 대한 면역 반응을 변경시킬 수 있다. 이러한 방식으로, "개인맞춤형" 면역요법 및 백신이 본 발명의 맥락에서 고려된다. 일부 실시형태에서, 서열 번호1, 서열 번호2, 서열 번호4, 서열 번호5, 서열 번호6 또는 이들의 조합과 관련된 개인맞춤형 에볼라 항원은 환자로부터 특장화되고, 나아가 전체로서, 일부로서 또는 변이체로서 표적 항원으로서 이용된다.

[0202] 병용 면역요법 및 백신

[0203] 본 개시내용은 에볼라 감염 치료를 위한 병용 면역요법 및 백신 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 본원에 제공되는 병용 면역요법 및 백신은 에볼라 감염과 연관된 항원에 대한 다중-표적화된 면역치료제 접근법을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 본원에 제공되는 병용 면역요법 및 백신은 에볼라 감염과 연관된 항원에 대한 다중-표적화된 항원 시그너처 면역치료제 접근법을 포함할 수 있다. 다양한 실시형태들에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 본원에 제공된 바와 같은 에볼라의 면역화를 위한 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L의 야생형 또는 변이체를 발현하는 바이러스-기반 벡터를 제공한다. 이들 벡터는 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L에 대한 면역 반응을 높일 수 있다.

[0204] 일부 양태에서, 벡터는 적어도 하나의 항원을 포함한다. 일부 양태에서, 벡터는 적어도 2개의 항원을 포함한다. 일부 양태에서, 벡터는 적어도 3개의 항원을 포함한다. 일부 양태에서, 벡터는 3개 초과 항원을 포함한다. 일부 양태에서, 백신 제형(제제)은 벡터 : 항원을 1:1 비율로 포함한다. 일부 양태에서, 백신은 벡터 : 항원을 1:2 비율로 포함한다. 일부 양태에서, 백신은 벡터 : 항원을 1:3 비율로 포함한다. 일부 양태에서, 백신은 벡터 : 항원을 1:4 비율로 포함한다. 일부 양태에서, 백신은 벡터 : 항원을 1:5 비율로 포함한다. 일부 양태에서, 백신은 벡터 : 항원을 1:6 비율로 포함한다. 일부 양태에서, 백신은 벡터 : 항원을 1:7 비율로 포함한다. 일부 양태에서, 백신은 벡터 : 항원을 1:8 비율로 포함한다. 일부 양태에서, 백신은 벡터 : 항원을 1:9 비율로 포함한다. 일부 양태에서, 백신은 벡터 : 항원을 1:10 비율로 포함한다.

[0205] 일부 양태에서, 백신은 조합 백신이며, 여기서, 백신은 각각의 벡터가 적어도 하나의 단일 항원을 함유하는 적어도 2개의 벡터를 포함한다. 일부 양태에서, 백신은 조합 백신이며, 여기서, 백신은 각각의 벡터가 적어도 하나의 단일 항원을 함유하는 적어도 3개의 벡터를 포함한다. 일부 양태에서, 백신은 조합 백신이며, 여기서, 백신은 각각의 벡터가 적어도 하나의 단일 항원을 함유하는 적어도 3개 초과 벡터를 포함한다.

[0206] 일부 양태에서, 백신은 조합 백신이며, 여기서 백신은 적어도 2개의 벡터를 포함하며, 적어도 2개의 벡터 중 제1 벡터는 적어도 하나의 단일 항원을 포함하고 적어도 2개의 벡터 중 제2 벡터는 적어도 2개의 항원을 포함한다. 일부 양태에서, 백신은 조합 백신이며, 여기서 백신은 적어도 3개의 벡터를 포함하며, 적어도 2개의 벡터 중 제1 벡터는 적어도 하나의 단일 항원을 포함하고 적어도 3개의 벡터 중 제2 벡터는 적어도 2개의 항원을 포함한다. 일부 양태에서, 백신은 조합 백신이며, 여기서 백신은 3개 이상의 벡터를 포함하며, 3개 이상의 벡터 중 제1 벡터는 적어도 하나의 단일 항원을 포함하고 3개 이상의 벡터 중 제2 벡터는 적어도 2개의 항원을

포함한다. 일부 양태에서, 백신은 조합 백신이며, 여기서 백신은 각각이 적어도 2개의 항원을 함유하는 3개 초과
 과의 벡터를 포함한다.

[0207] 상이한 항원들의 혼합물이 개체 내에 동시에 투여되거나 동일한 벡터 또는 상이한 벡터로부터 발현되는 경우,
 이들은 서로 경쟁할 수 있다. 그 결과, 발현되는 항원을 병용 면역요법 또는 백신에 상이한 농도 및 비율로 포
 함하는 제형은 투여 후 효과적이고 지속적인 면역 반응이 발생하는 것을 보장하기 위해 개체 또는 개체군에서
 평가되고 맞춰져야 한다.

[0208] 다수의 항원들을 포함하는 조성물은 다양한 비율로 존재할 수 있다. 예를 들어, 더 많은 벡터를 포함하는 제형
 은 다양한 비율을 가질 수 있다. 예를 들어, 면역요법 또는 백신은 2개의 상이한 벡터들을 1:1, 1:2, 1:3, 1:4,
 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 2:1, 2:3, 2:4, 2:5, 2:6, 2:7, 2:8, 3:1, 3:3, 3:4,
 3:5, 3:6, 3:7, 3:8, 3:1, 3:3, 3:4, 3:5, 3:6, 3:7, 3:8, 4:1, 4:3, 4:5, 4:6, 4:7, 4:8, 5:1, 5:3, 5:4,
 5:6, 5:7, 5:8, 6:1, 6:3, 6:4, 6:5, 6:7, 6:8, 7:1, 7:3, 7:4, 7:5, 7:6, 7:8, 8:1, 8:3, 8:4, 8:5, 8:6 또
 는 8:7의 화학양론으로 가질 수 있다. 예를 들어, 면역요법 또는 백신은 3개의 상이한 벡터들을 1:1:1, 1:2:1,
 1:3:1, 1:4:1, 1:5:1, 1:6:1, 1:7:1, 1:8:1, 2:1:1, 2:3:1, 2:4:1, 2:5:1, 2:6:1, 2:7:1, 2:8:1, 3:1, 3:3:1,
 3:4:1, 3:5:1, 3:6:1, 3:7:1, 3:8:1, 3:1:1, 3:3:1, 3:4:1, 3:5:1, 3:6:1, 3:7:1, 3:8:1, 4:1:1, 4:3:1,
 4:4:1, 4:5:1, 4:6:1, 4:7:1, 4:8:1, 5:1:1, 5:3:1, 5:4:1, 5:5:1, 5:6:1, 5:7:1, 5:8:1, 6:1:1, 6:3:1,
 6:4:1, 6:5:1, 6:6:1, 6:7:1, 6:8:1, 7:1:1, 7:3:1, 7:4:1, 7:5:1, 7:6:1, 7:7:1, 7:8:1, 8:1:1, 8:3:1,
 8:4:1, 8:5:1, 8:6:1, 8:7:1, 8:8:1, 1:1:2, 1:2:2, 1:3:2, 1:4:2, 1:5:2, 1:6:2, 1:7:2, 1:8:2, 2:1:2,
 2:3:2, 2:4:2, 2:5:2, 2:6:2, 2:7:2, 2:8:2, 3:1:2, 3:3:2, 3:4:2, 3:5:2, 3:6:2, 3:7:2, 3:8:2, 3:1:2,
 3:3:2, 3:4:2, 3:5:2, 3:6:2, 3:7:2, 3:8:2, 4:1:2, 4:3:2, 4:4:2, 4:5:2, 4:6:2, 4:7:2, 4:8:2, 5:1:2,
 5:3:2, 5:4:2, 5:5:2, 5:6:2, 5:7:2, 5:8:2, 6:1:2, 6:3:2, 6:4:2, 6:5:2, 6:6:2, 6:7:2, 6:8:2, 7:1:2,
 7:3:2, 7:4:2, 7:5:2, 7:6:2, 7:7:2, 7:8:2, 8:1:2, 8:3:2, 8:4:2, 8:5:2, 8:6:2, 8:7:2, 8:8:2, 1:1:3,
 1:2:3, 1:3:3, 1:4:3, 1:5:3, 1:6:3, 1:7:3, 1:8:3, 2:1:3, 2:3:3, 2:4:3, 2:5:3, 2:6:3, 2:7:3, 2:8:3,
 3:1:3, 3:3:3, 3:4:3, 3:5:3, 3:6:3, 3:7:3, 3:8:3, 3:1:3, 3:3:3, 3:4:3, 3:5:3, 3:6:3, 3:7:3, 3:8:3,
 4:1:3, 4:3:3, 4:4:3, 4:5:3, 4:6:3, 4:7:3, 4:8:3, 5:1:3, 5:3:3, 5:4:3, 5:5:3, 5:6:3, 5:7:3, 5:8:3,
 6:1:3, 6:3:3, 6:4:3, 6:5:3, 6:6:3, 6:7:3, 6:8:3, 7:1:3, 7:3:3, 7:4:3, 7:5:3, 7:6:3, 7:7:3, 7:8:3,
 8:1:3, 8:3:3, 8:4:3, 8:5:3, 8:6:3, 8:7:3, 8:8:3, 1:1:4, 1:2:4, 1:3:4, 1:4:4, 1:5:4, 1:6:4, 1:7:4,
 1:8:4, 2:1:4, 2:3:4, 2:4:4, 2:5:4, 2:6:4, 2:7:4, 2:8:4, 3:1:4, 3:3:4, 3:4:4, 3:5:4, 3:6:4, 3:7:4,
 3:8:4, 3:1:4, 3:3:4, 3:4:4, 3:5:4, 3:6:4, 3:7:4, 3:8:4, 4:1:4, 4:3:4, 4:4:4, 4:5:4, 4:6:4, 4:7:4,
 4:8:4, 5:1:4, 5:3:4, 5:4:4, 5:5:4, 5:6:4, 5:7:4, 5:8:4, 6:1:4, 6:3:4, 6:4:4, 6:5:4, 6:6:4, 6:7:4,
 6:8:4, 7:1:4, 7:3:4, 7:4:4, 7:5:4, 7:6:4, 7:7:4, 7:8:4, 8:1:4, 8:3:4, 8:4:4, 8:5:4, 8:6:4, 8:7:4,
 8:8:4, 1:1:5, 1:2:5, 1:3:5, 1:4:5, 1:5:5, 1:6:5, 1:7:5, 1:8:5, 2:1:5, 2:3:5, 2:4:5, 2:5:5, 2:6:5,
 2:7:5, 2:8:5, 3:1:5, 3:3:5, 3:4:5, 3:5:5, 3:6:5, 3:7:5, 3:8:5, 3:1:5, 3:3:5, 3:4:5, 3:5:5, 3:6:5,
 3:7:5, 3:8:5, 4:1:5, 4:3:5, 4:4:5, 4:5:5, 4:6:5, 4:7:5, 4:8:5, 5:1:5, 5:3:5, 5:4:5, 5:5:5, 5:6:5,
 5:7:5, 5:8:5, 6:1:5, 6:3:5, 6:4:5, 6:5:5, 6:6:5, 6:7:5, 6:8:5, 7:1:5, 7:3:5, 7:4:5, 7:5:5, 7:6:5,
 7:7:5, 7:8:5, 8:1:5, 8:3:5, 8:4:5, 8:5:5, 8:6:5, 8:7:5, 8:8:5, 1:1:6, 1:2:6, 1:3:6, 1:4:6, 1:5:6,
 1:6:6, 1:7:6, 1:8:6, 2:1:6, 2:3:6, 2:4:6, 2:5:6, 2:6:6, 2:7:6, 2:8:6, 3:1:6, 3:3:6, 3:4:6, 3:5:6,
 3:6:6, 3:7:6, 3:8:6, 3:1:6, 3:3:6, 3:4:6, 3:5:6, 3:6:6, 3:7:6, 3:8:6, 4:1:6, 4:3:6, 4:4:6, 4:5:6,
 4:6:6, 4:7:6, 4:8:6, 5:1:6, 5:3:6, 5:4:6, 5:5:6, 5:6:6, 5:7:6, 5:8:6, 6:1:6, 6:3:6, 6:4:6, 6:5:6,
 6:6:6, 6:7:6, 6:8:6, 7:1:6, 7:3:6, 7:4:6, 7:5:6, 7:6:6, 7:7:6, 7:8:6, 8:1:6, 8:3:6, 8:4:6, 8:5:6,
 8:6:6, 8:7:6, 8:8:6, 1:1:7, 1:2:7, 1:3:7, 1:4:7, 1:5:7, 1:6:7, 1:7:7, 1:8:7, 2:1:7, 2:3:7, 2:4:7,
 2:5:7, 2:6:7, 2:7:7, 2:8:7, 3:1:7, 3:3:7, 3:4:7, 3:5:7, 3:6:7, 3:7:7, 3:8:7, 3:1:7, 3:3:7, 3:4:7,
 3:5:7, 3:6:7, 3:7:7, 3:8:7, 4:1:7, 4:3:7, 4:4:7, 4:5:7, 4:6:7, 4:7:7, 4:8:7, 5:1:7, 5:3:7, 5:4:7,
 5:5:7, 5:6:7, 5:7:7, 5:8:7, 6:1:7, 6:3:7, 6:4:7, 6:5:7, 6:6:7, 6:7:7, 6:8:7, 7:1:7, 7:3:7, 7:4:7,
 7:5:7, 7:6:7, 7:7:7, 7:8:7, 8:1:7, 8:3:7, 8:4:7, 8:5:7, 8:6:7, 8:7:7 또는 8:8:7의 화학양론으로 가질 수
 있다.

[0209] 본 개시내용은 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L을 코딩하는 서열을 포함하는 적어도 2개의, 적어도
 3개 또는 3개 초과 상이한 표적 항원들을 포함하는 병용 면역요법 또는 백신을 제공한다. 예를 들어, 병용 면
 역요법 또는 백신은 야생형 또는 변형된 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L을 코딩하는 서열을 포함하
 는 적어도 2개의, 적어도 3개 또는 3개 초과 상이한 표적 항원들을 포함할 수 있으며, 여기서, 야생형 또는
 변형된 표적 항원은 서열 번호1과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9%의 서열

동일성을 갖는 서열을 포함한다. 예를 들어, 병용 면역요법 또는 백신은 야생형 또는 변형된 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L을 코딩하는 서열을 포함하는 적어도 2개의, 적어도 3개 또는 3개 초과 상이한 표적 항원들을 포함할 수 있으며, 여기서, 야생형 또는 변형된 표적 항원은 서열 번호2와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 예를 들어, 병용 면역요법 또는 백신은 야생형 또는 변형된 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L을 코딩하는 서열을 포함하는 적어도 2개의, 적어도 3개 또는 3개 초과 상이한 표적 항원들을 포함할 수 있으며, 여기서, 야생형 또는 변형된 표적 항원은 서열 번호4와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 예를 들어, 병용 면역요법 또는 백신은 야생형 또는 변형된 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L을 코딩하는 서열을 포함하는 적어도 2개의, 적어도 3개 또는 3개 초과 상이한 표적 항원들을 포함할 수 있으며, 여기서, 야생형 또는 변형된 표적 항원은 서열 번호5와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 예를 들어, 병용 면역요법 또는 백신은 야생형 또는 변형된 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L을 코딩하는 서열을 포함하는 적어도 2개의, 적어도 3개 또는 3개 초과 상이한 표적 항원들을 포함할 수 있으며, 여기서, 야생형 또는 변형된 표적 항원은 서열 번호6과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0210] 일부 양태에서, 본 개시내용은, EA에 대한 다중-표적화된 면역치료제를 포함하는 병용 면역요법, 및 면역 저해 경로의 적어도 하나의 면역-체크포인트 단백질을 표적으로 하는 면역 경로 체크포인트 조정제를 포함하는 분자 조성물을 제공한다. 본 개시내용은, 야생형 또는 변형된 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L을 코딩하는 서열을 포함하는 적어도 2개의, 적어도 3개 또는 3개 초과 상이한 표적 항원, 및 면역 경로 체크포인트 조정제를 포함하는 적어도 하나의 분자 조성물을 포함하는 병용 면역요법 또는 백신을 제공한다. 예를 들어, 병용 면역요법 또는 백신은 변형된 야생형 또는 변형된 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L을 코딩하는 서열을 포함하는 적어도 2개의, 적어도 3개 또는 3개 초과 상이한 표적 항원, 및 면역-체크포인트 저해 경로의 적어도 하나의 분자 조성물을 포함할 수 있으며, 여기서, 변형된 표적 항원은 서열 번호1, 2, 4, 5, 및/또는 6과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0211] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 분자 조성물은 CTLA4를 표적으로 하는 면역 경로 체크포인트 조정제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 분자 조성물은 PD1을 표적으로 하는 면역 경로 체크포인트 조정제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 분자 조성물은 PDL1을 표적으로 하는 면역 경로 체크포인트 조정제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 분자 조성물은 LAG3를 표적으로 하는 면역 경로 체크포인트 조정제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 분자 조성물은 B7-H3을 표적으로 하는 면역 경로 체크포인트 조정제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 분자 조성물은 B7-H4를 표적으로 하는 면역 경로 체크포인트 조정제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 분자 조성물은 TIM3을 표적으로 하는 면역 경로 체크포인트 조정제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 분자 조성물은 PD1, PDL1, PDL2, CD28, CD80, CD86, CTLA4, B7RP1, ICOS, B7RP1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, KIR, TCR, LAG3, CD137, CD137L, OX40, OX40L, CD27, CD70, CD40, CD40L, TIM3(즉, HAVcr2), GAL9 및 A2a에 대한 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체인 면역 경로 체크포인트 조정제를 포함한다.

[0212] **면역학적 융합 파트너 항원 표적**

[0213] 본 발명의 바이러스 벡터는 또한, 표적 항원의 면역원성을 증가시키는 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 측면에서, 이러한 단백질을 함유하는 아데노바이러스 벡터를 사용한 면역화 후 생성되는 단백질은, 관심 표적 항원의 면역원성을 증가시키는 단백질에 융합된 관심 표적 항원을 포함하는 융합 단백질일 수 있다.

[0214] 일 실시형태에서, 이러한 면역학적 융합 파트너는 미코박테리움 sp., 예컨대 미코박테리움 튜버쿨로시스-유래의 Ra12 단편으로부터 유래된다. 이중성 폴리뉴클레오타이드/폴리펩타이드 서열의 발현 및/또는 면역원성을 증강시키는 데 있어서의 Ra12 조성물 및 이의 사용 방법은 미국 특허 출원 60/158,585 및 미국 특허 7,009,042에 기재되어 있다. 간략하게는, Ra12는 미코박테리움 튜버쿨로시스 MTB32A 핵산의 하위서열인 폴리뉴클레오타이드 영역을 지칭한다. MTB32A는 M. 튜버쿨로시스의 독성(virulent) 균주 및 무독성(avirulent) 균주에서 유전자에 의해 코딩된 32 kDa의 세린 프로테아제이다. MTB32A의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열은 기재되어 있다(예, 미국 특허 출원 60/158,585; 문헌[Skeiky et al., Infection and Immun. 67:3998-4007 (1999)] 참조). MTB32A 코딩 서열의 C-말단 단편은 높은 수준으로 발현되고, 정제 공정 전체 동안 용해성 폴리펩타이드로 남아 있다. 더욱이, Ra12는, 이것이 융합되는 이중성 면역원성 폴리펩타이드의 면역원성을 증강시킬 수 있다. 하나의 Ra12

융합 폴리펩타이드는 MTB32A의 아미노산 잔기 192 내지 323에 상응하는 14 kDa C-말단 단편을 포함한다. 다른 Ra12 폴리뉴클레오타이드는 일반적으로, Ra12 폴리펩타이드의 일부를 코딩하는 적어도 약 15, 30, 60, 100, 200, 300개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다. Ra12 폴리뉴클레오타이드는 천연 서열(즉, Ra12 폴리펩타이드 또는 이의 일부를 코딩하는 내인성 서열)을 포함할 수 있거나, 이러한 서열의 변이체를 포함할 수 있다. Ra12 폴리뉴클레오타이드 변이체는, 코딩된 융합 폴리펩타이드의 생물학적 활성이 천연 Ra12 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드와 비교하여 실질적으로 감소하지 않도록, 하나 이상의 치환, 첨가, 결실 및/또는 삽입을 함유할 수 있다. 변이체는 천연 Ra12 폴리펩타이드 또는 이의 일부를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열과 적어도 약 70%, 80% 또는 90% 또는 그 이상의 동일성을 가질 수 있다.

[0215] 면역학적 융합 파트너는 그람-음성 박테리아 헤모필루스 인플루엔자 B의 표면 단백질인 단백질 D로부터 유래될 수 있다. 일부 경우에, 단백질 D 유도체는 이 단백질의 대략 1/3(예, 처음 N-말단 100-110 아미노산)을 포함한다. 단백질 D 유도체는 지질화될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 지질단백질 D 융합 파트너의 처음 109개 잔기는 N-말단 상에 포함되어, 폴리펩타이드에 추가적인 외인성 T-세포 에피토프를 제공하며, 이는 이. 콜라이에서 발현 수준을 증가시킬 수 있고 발현 인핸서로서 작용할 수 있다. 지질 꼬리는 항원 제시 세포에의 항원의 최적의 제시를 보장할 수 있다. 다른 융합 파트너는 인플루엔자 바이러스 유래의 비-구조 단백질인 NS1(헤마글루티닌)을 포함한다. 전형적으로, N-말단 81개 아미노산이 사용되지만, T-헬퍼 에피토프를 포함하는 상이한 단편들도 사용될 수 있다.

[0216] 면역학적 융합 파트너는 LYTA로서 알려진 단백질 또는 이의 일부(바람직하게는 C-말단 부분)일 수 있다. LYTA는 스트렙토코커스 뉴모니에로부터 유래되며, (LytA 유전자에 의해 코딩되는) 아미다제 LYTA로서 알려진 N-아세틸-L-알라닌 아미다제를 합성한다. LYTA는 펩티도글리칸 백본에서 소정의 결합을 특이적으로 분해하는 자가용해소(autolysin)이다. LYTA 단백질의 C-말단 도메인은 콜린 또는 DEAE와 같은 일부 콜린 유사체에 대한 친화성을 책임진다. 이러한 특성은 융합 단백질의 발현에 유용한 이. 콜라이 C-LYTA 발현 플라스미드의 개발에 이용되어 왔다. 아미노 말단에 C-LYTA 단편을 함유하는 하이브리드 단백질의 정제가 이용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, LYTA의 반복부는 융합 폴리펩타이드 내에 혼입될 수 있다. 반복부는 예를 들어, 잔기 178에서 시작하는 C-말단 영역에서 발견될 수 있다. 하나의 특정 반복부는 잔기 188-305를 혼입한다.

[0217] 일부 실시형태에서, 항원 표적은 IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 및 IL-13의 군으로부터 선택된 사이토카인을 포함하는 면역원성 성분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 표적은 추가로, IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 및 IL-13의 군으로부터 선택된 사이토카인을 포함하는 하나 이상의 면역원성 성분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 표적은 IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 및 IL-13을 코딩하는 핵산, IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 및 IL-13과 실질적인 동일성을 가진 단백질, 및 IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 및 IL-13과 실질적인 동일성을 가진 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 면역원성 성분을 포함한다.

[0218] 일부 실시형태에서, 항원 표적은 IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 및 IL-13의 군으로부터 선택된 사이토카인을 포함하는 면역원성 성분에 융합되거나 연결된다. 일부 실시형태에서, 항원 표적은 IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 및 IL-13의 군으로부터 선택된 사이토카인을 포함하는 면역원성 성분과 함께 세포에서 공동-발현된다.

[0219] 면역 경로 체크포인트 조정제

[0220] 일부 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 면역 경로 체크포인트 조정제와 함께 투여된다. 활성화 신호와 저해 신호 사이의 균형은 T 림프구와 질병 세포 사이의 상호작용을 제어하며, 여기서, T-세포 반응은 T-세포 수용체(TCR)에 의한 항원 인지를 통해 개시된다. 저해 경로 및 신호는 면역 체크포인트로서 지칭된다. 정상적인 환경에서, 면역 체크포인트는 자가면역을 조절하고 예방하는 데 중요한 역할을 하며, 또한 병원성 감염에 대한 반응에서 조직 손상으로부터 보호한다.

[0221] 본 개시내용은 에볼라 감염의 치료를 위해 면역 체크포인트 저해 경로를 조정하기 위한 바이러스 벡터-기반 백신 및 조성물을 포함하는 병용 면역요법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 조정은 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 증가시키는 것이다. 일부 실시형태에서, 조정은 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 감소시키는 것이다. 일부 실시형태에서, 조정은 유전자 또는 단백질의 패밀리에 영향을 미친다.

- [0222] 일반적으로, 면역 저해 경로는 리간드-수용체 상호작용에 의해 개시된다. 현재, 질병에서, 해당 질병은 면역-체크포인트 경로를 피험체에서 면역 저항을 유도하기 위한 메커니즘으로서 끌어들이 수 있다.
- [0223] 피험체에서 주어진 질병에 의한 면역 저항 또는 면역 저해 경로의 유도는, 하나 이상의 면역 저해 경로를 조정하는 것으로 알려진 분자 조성물, 예컨대 siRNA, 안티센스, 저분자, 모방체, 제조합 형태의 리간드, 수용체 또는 단백질, 또는 항체(Ig 융합 단백질일 수 있음)에 의해 차단될 수 있다. 예를 들어, 면역-체크포인트 단백질의 차단제, 예컨대 세포독성 T-림프구-연관된 항원 4(CTLA4) 및 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD1)을 이용한 예비 임상 발견은 항-종양 면역을 증강시키는 데 유망한 것으로 나타났다.
- [0224] 질병에 걸린 세포가 다수의 저해 리간드들을 발현할 수 있고 질병-침윤성 림프구가 다수의 저해 수용체들을 발현할 수 있기 때문에, 면역 체크포인트 단백질의 이중 또는 삼중 차단은 항-질병 면역을 증강시킬 수 있다. 본원에 제공된 바와 같은 병용 면역요법은 하기 면역-체크포인트 단백질: PD1, PDL1, PDL2, CD28, CD80, CD86, CTLA4, B7RP1, ICOS, B7RP1, B7-H3(CD276으로도 알려져 있음), B7-H4 (B7-S1, B7x 및 VCTN1로도 알려져 있음), BTLA(CD272로도 알려져 있음), HVEM, KIR, TCR, LAG3(CD223으로도 알려져 있음), CD137, CD137L, OX40, OX40L, CD27, CD70, CD40, CD40L, TIM3(HAVcr2로도 알려져 있음), GAL9, A2aR 및 아데노신 중 하나 이상을 표적으로 하는 면역 경로 체크포인트 조절제를 포함하는 하나 이상의 분자 조성물을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 분자 조성물은 siRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 분자 조성물은 저분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 분자 조성물은 제조합 형태의 리간드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 분자 조성물은 제조합 형태의 수용체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 분자 조성물은 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 병용 요법은 1개 초과 분자 조성물 및/또는 1개 초과 타입의 분자 조성물을 포함한다. 당업자가 이해하게 될 바와 같이, 면역 체크포인트 저해 경로 중 향후 발견되는 단백질 또한, 본 개시내용에 포함되어야 한다.
- [0225] 일부 실시형태에서, 병용 면역요법은 CTLA4의 조정을 위한 분자 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 병용 면역요법은 PD1의 조정을 위한 분자 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 병용 면역요법은 PDL1의 조정을 위한 분자 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 병용 면역요법은 LAG3의 조정을 위한 분자 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 병용 면역요법은 B7-H3의 조정을 위한 분자 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 병용 면역요법은 B7-H4의 조정을 위한 분자 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 병용 면역요법은 TIM3의 조정을 위한 분자 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조정은 발현의 증가 또는 증강이다. 다른 실시형태에서, 조정은 발현의 감소 또는 부재이다.
- [0226] 2개의 예시적인 면역 체크포인트 저해제로는 세포독성 T 림프구 연관 항원-4(CTLA-4) 및 프로그래밍된 세포 사멸 단백질-1(PD1)이 있다. CTLA-4는 T-세포 상에서만 발현될 수 있으며, 여기서 이는 T-세포 활성화의 초기 단계를 제어한다. CTLA-4는 공동-자극 T-세포 수용체 CD28과 상호작용하여, T-세포 활성을 저해하는 신호전달을 초래할 수 있다. 일단 TCR 항원 인지가 발생하면, CD28 신호전달은 TCR 신호전달을 증강시킬 수 있어서 일부 경우에 활성화된 T-세포를 초래할 수 있고, CTLA-4는 CD28의 신호전달 활성을 저해한다. 본 개시내용은 본원에 제공된 바와 같은 면역요법을 에볼라 치료용 항-CTLA-4 모노클로날 항체와 병용하여 제공한다. 본 개시내용은 본원에 제공된 바와 같은 면역요법을 에볼라 치료용 CTLA-4 분자 조성물과 병용하여 제공한다.
- [0227] 프로그래밍된 사멸 세포 단백질 리간드-1(PDL1)은 B7 패밀리의 구성원이고, 다양한 조직 및 세포 타입들에 분포되어 있다. PDL1은 PD1과 상호작용하여 T-세포 활성화 및 CTL 매개 용해를 저해할 수 있다. PDL1의 유의한 발현은 다양한 인간 종양들 상에서 나타나 있으며, PDL1 발현은 종양이 숙주 항-종양 면역 반응을 모면하는 주요 메커니즘의 하나이다. 프로그래밍된 사멸-리간드 1(PDL1) 및 프로그래밍된 세포 사멸 단백질-1(PD1)은 면역 체크포인트로서 상호작용한다. 이러한 상호작용은 주요 관용성 메커니즘일 수 있으며, 항-종양 면역 반응의 막힘 및 후속적인 종양 진행을 초래한다. PD1은 활성화된 T 세포 상에 존재하고, PD1의 1차적인 리간드인 PDL1은 종종 종양 세포 및 항원-제시 세포(APC)뿐만 아니라 B 세포를 포함한 다른 세포 상에서 발현된다. PDL1의 유의한 발현은 HPV-연관된 두경부암을 포함한 다양한 인간 종양들에서 나타나 있다. PDL1은 T 세포 상의 PD1과 상호작용하여, T 세포 활성화 및 세포독성 T 림프구(CTL) 매개 용해를 저해한다. 본 개시내용은 본원에 제공된 바와 같은 면역요법을 에볼라 치료용 항-PD1 모노클로날 항체 또는 항-PDL1 모노클로날 항체와 병용하여 제공한다. 본 개시내용은 본원에 제공된 바와 같은 면역요법을 에볼라 치료용 PD1 또는 항-PDL1 분자 조성물과 병용하여 제공한다. 본 개시내용은 본원에 제공된 바와 같은 면역요법을 에볼라 치료용 항-CTLA-4 모노클로날 항체 및 항-PD1 모노클로날 항체와 병용하여 제공한다. 본 개시내용은 본원에 제공된 바와 같은 면역요법을 에볼라 치료용 항-CTLA-4 모노클로날 항체 및 PDL1 모노클로날 항체와 병용하여 제공한다. 본 개시내용은 본원에 제공된 바와 같은 면역요법을 에볼라 치료용 항-CTLA-4, 항-PD1, PDL1, 모노클로날 항체 또는 이들의 조합과 병용하여 제공한다.

다.

[0228] 면역 체크포인트 분자는 T 세포에 의해 발현될 수 있다. 면역 체크포인트 분자는 "브레이크"로서 효과적으로 역할을 하여, 면역 반응을 하향-조정하거나 저해할 수 있다. 면역 체크포인트 분자로는, 면역 세포를 직접적으로 저해하는 프로그래밍된 사멸 1(PD1, 또한 PDCD1 또는 CD279로 알려져 있음, 수탁 번호: NM_005018), 세포독성 T-림프구 항원 4(CTLA-4, 또한 CD152로 알려져 있음, GenBank 수탁 번호 AF414120.1), LAG3(또한 CD223으로 알려져 있음, 수탁 번호: NM_002286.5), Tim3(또한 HAVCR2로 알려져 있음, GenBank 수탁 번호: JX049979.1), BTLA(또한 CD272로 알려져 있음, 수탁 번호: NM_181780.3), BY55(또한 CD160으로 알려져 있음, GenBank 수탁 번호: CR541888.1), TIGIT(또한 IVSTM3으로 알려져 있음, 수탁 번호: NM_173799), LAIR1(또한 CD305로 알려져 있음, GenBank 수탁 번호: CR542051.1), SIGLEC10(GenBank 수탁 번호: AY358337.1), 2B4(또한 CD244로 알려져 있음, 수탁 번호: NM_001166664.1), PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, CD96, CRTAM, SIGLEC7, SIGLEC9, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, TGFBR1I, TGFBR1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, PD1은 이를 필요로 하는 환자를 치료하기 위해 본 발명의 아데노바이러스 백신과 병용될 수 있다.

[0229] 표 1은 본 발명의 아데노바이러스 백신의 효율을 개선하기 위해 불활성화될 수 있는 예시적인 면역 체크포인트 유전자를 완전하지는 않지만 보여준다. 면역 체크포인트 유전자는 표 1에 열거된 이러한 유전자, 및 수용체 기능, 세포 사멸, 사이토카인 신호전달, 아르기닌 트립토판 고갈, TCR 신호전달, 유도된 T-reg 억제, 전사 인자 조절 소진(exhaustion) 또는 아네르기(anergy), 및 저산소증 매개 관용성을 공동-저해하는 데 관여하는 다른 것들로부터 선택될 수 있다.

표 1

[0230]

	유전자 기호	NCBI # (GRCh38.p2)	출발	정지	게놈 위치
1	ADORA2A	135	24423597	24442360	22q11.23
2	CD276	80381	73684281	73714518	15q23-q24
3	VTCN1	79679	117143587	117270368	1p13.1
4	BTLA	151888	112463966	112499702	3q13.2
5	CTLA4	1493	203867788	203873960	2q33
6	IDO1	3620	39913809	39928790	8p12-p11
7	KIR3DL1	3811	54816438	54830778	19q13.4
8	LAG3	3902	6772483	6778455	12p13.32
9	PDCD1	5133	241849881	241858908	2q37.3
10	HAVCR2	84868	157085832	157109237	5q33.3
11	VISTA	64115	71747556	71773580	10q22.1
12	CD244	51744	160830158	160862902	1q23.3
13	CISH	1154	50606454	50611831	3p21.3

[0231] 아데노바이러스-기반 백신 및 면역 경로 체크포인트 조정제의 병용은 어느 한 제제 단독과 비교하여 치료받는 환자에서 에볼라 감염, 진행 또는 증상을 감소시킬 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 아데노바이러스-기반 백신 및 면역 경로 체크포인트 조정제의 병용은 어느 한 제제 단독과 비교하여 치료받는 환자에서 총 생존율을 개선할 수 있다. 일부 경우에, 아데노바이러스 백신 및 면역 경로 체크포인트 조정제의 병용은 어느 한 제제 단독과 비교하여 치료받는 환자에서 에볼라-특이적 T 세포 반응의 빈도 또는 강도를 증가시킬 수 있다.

[0232] 본 발명은 또한, 아데노바이러스 벡터-기반 백신의 성능을 개선하기 위한 면역 체크포인트 저해의 용도를 개시한다. 상기 면역 체크포인트 저해는 백신접종 시 투여될 수 있다. 상기 면역 체크포인트 저해는 또한, 백신 후에 투여될 수 있다. 면역 체크포인트 저해는 아데노바이러스 백신 투여와 동시에 발생할 수 있다. 면역 체크포인트 저해는 백신접종 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 또는 60분째에 발생할 수 있다. 면역 체크포인트 저해는 또한, 백신접종 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간째에 발생할 수 있다. 일부 경우에, 면역 저해는 백신접종 후 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일째에 발생할 수 있다. 면역 체크포인트 저해는 백신접종 이전 또는 이후에 임의의 시간에 발생할 수 있다.

- [0233] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항원 및 면역 경로 체크포인트 조정제를 포함하는 백신에 관한 것이다. 본 발명은 면역 체크포인트 단백질, 예를 들어 PD1, 및 피험체의 세포 상의 이의 천연 결합 파트너(들)의 하향조절로부터 이득을 얻을 병태를 가진 피험체를 치료하는 방법에 관한 것일 수 있다.
- [0234] 면역 경로 체크포인트 조정제는 임의의 항원을 포함하는 아데노바이러스 백신과 병용될 수 있다. 예를 들어, 항원은 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L일 수 있다. 면역 경로 체크포인트 조정제는 백신과 병용 시, 상승작용 효과를 발휘할 수 있다. 면역 경로 체크포인트 조정제는 또한, 백신과 병용 시, 부가(상가) 효과를 발휘할 수 있다.
- [0235] 제형
- [0236] 본 발명은 단독으로 또는 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제와 함께 임의의 경로에 의해 투여될 수 있는 백신접종 처방을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하며, 이러한 투여는 단일 투여량 및 다수의 투여량 둘 다로 수행될 수 있다. 보다 특히, 약제학적 조성물은 다양한 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 정제, 캡슐, 론제지, 트로키, 핸드 캔디, 분말, 스프레이, 수성 현탁액, 주사액, 엘릭서, 시럽 등의 형태로 병용될 수 있다. 이러한 담체로는, 고체 희석제 또는 충전제, 멸균 수성 배지 및 다양한 무독성 유기 용매 등이 있다. 더욱이, 이러한 경구 약제학적 제형은 이러한 목적을 위해 보편적으로 이용되는 타입의 다양한 제제들에 의해 적합하게 감미 및/또는 풍미될 수 있다. 명세서 전체에 기재된 조성물은 약제학적 약제 내로 제형화될 수 있고, 이를 필요로 하는 에볼라와 같은 질병을 진단받은 인간 또는 포유류를 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0237] 투여를 위해, 아데노바이러스 벡터 스톱은 적절한 완충제, 생리학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 등과 조합될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 적절한 수의 바이러스 벡터 입자(VP)가 적절한 완충제, 예컨대 멸균 PBS 또는 식염수에서 투여된다. 소정의 실시형태에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터 조성물은 피하, 비경구, 정맥내, 근육내 또는 심지어 복강내 투여용의 특정한 제형으로 제공된다. 소정의 실시형태에서, 유리 염기 또는 약물학적으로 허용 가능한 염으로서 활성 화합물의 용액 내의 제형은 하이드록시프로필셀룰로스와 같은 계면활성제와 적합하게 혼합된 물에서 제조될 수 있다. 분산액은 또한, 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 스쿠알렌-기반 에멀전, 스쿠알렌-기반 수-중-유 에멀전, 유-중-수 에멀전, 수-중-유 에멀전, 비수성 에멀전, 파라핀유-중-수 에멀전 및 이들의 혼합물 및 오일에서 제조될 수 있다. 다른 실시형태에서, 바이러스 벡터는 삼키거나 좌제에 의해 투여되는 알약 형태용 특정 제형으로 제공될 수 있다.
- [0238] 주사용으로 적합한 예시적인 약제학적 형태는 멸균 수용액 또는 분산액, 및 멸균 주사액 또는 분산액의 임기 제조용 멸균 분말을 포함한다(예, 미국 특허 5,466,468 참조). 용이한 주사성이 존재하는 정도까지의 유체 형태가 바람직할 수 있다. 제조 및 저장 조건 하에 안정한 형태가 본 발명의 범주 내에 존재한다. 다양한 실시형태들에서, 형태는 박테리아, 곰팡이 및 진균류와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존된다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물 및/또는 식물유를 함유하는 용매 또는 분산액 배지일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해 및/또는 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 및 티메로살에 의해 촉진될 수 있다. 등장성제, 예를 들어 당 또는 소듐 클로라이드를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 조성물에서 흡수를 지연하는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 유발될 수 있다.
- [0239] 일 실시형태에서, 수용액에서의 비경구 투여를 위해, 용액은 필요하다면 적합하게 완충될 수 있고, 액체 희석제는 처음에 충분한 식염수 또는 글루코스와 등장성으로 유지될 수 있다. 이들 특정 수용액은 특히, 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 적합하다. 이러한 맥락에서, 이용될 수 있는 멸균 수성 배지는 본 개시내용의 측면에서 당업자에게 알려져 있을 것이다. 예를 들어, 하나의 투여량은 1 mL의 등장성 NaCl 용액에 용해되고, 1000 mL의 대량피하주사 유체에 첨가되거나 제안된 주입 부위에 주사될 수 있다. 투여량의 일부 변화는 치료받는 피험체의 병태에 따라 발생할 수 있다.
- [0240] 제형의 담체는 임의의 및 모든 용매, 분산액 배지, 비히클, 코팅제, 희석제, 항균제 및 항진균제, 등장성제 및 흡수 지연제, 완충제, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함할 수 있다. 임의의 종래의 배지 또는 제제가 활성 성분과 비용화성인 경우를 제외하고는, 치료 조성물에서의 이의 용도가 고려된다. 보조 활성 성분 또한, 조성물 내에 혼입될 수 있다. GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및 L.
- [0241] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 바이러스 벡터는 하나 이상의 면역자극제, 예컨대 보조제와 함께 투여될 수 있

다. 면역자극제는 항원에 대한 면역 반응(항체 및/또는 세포-매개)을 증강시키거나 강력하게 하는 본질적으로 임의의 성분을 지칭한다. 하나의 타입의 면역자극제는 보조제를 포함한다. 많은 보조제들은 항원을 신속한 대사로 부터 보호하도록 디자인된 성분, 예컨대 알루미늄 하이드록사이드 또는 미네랄 오일, 및 면역 반응의 자극제, 예컨대 지질 A, 보르타텔라 페르투스스 또는 미코박테리움 튜버쿨로시스 유래 단백질을 함유한다. 소정의 보조제는 예를 들어, Freund's Incomplete 보조제 및 Complete 보조제(Difco Laboratories); Merck 보조제 65(Merck and Company, Inc.), AS-2(SmithKline Beecham); 알루미늄 염, 예컨대 알루미늄 하이드록사이드 젤(알룸(alum)) 또는 알루미늄 포스페이트; 칼슘, 철 또는 아연의 염; 아실화된 티로신의 불용성 현탁액; 아실화된 당; 양이온적으로 또는 음이온적으로 유도된 다당류; 폴리포스파젠; 생분해성 마이크로스피어; 모노포스포릴 지질 A 및 퀴(quil) A로서 상업적으로 입수 가능하다. 사이토카인, 예컨대 GM-CSF, IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, 및/또는 IL-13, 및 성장 인자와 같은 다른 것들 또한, 보조제로서 사용될 수 있다.

[0242] 본 발명의 소정의 실시형태에서, 보조제 조성물은 주로 Th1 타입의 면역 반응을 유도하는 것일 수 있다. 높은 수준의 Th1-타입 사이토카인(예, IFN- γ , TNF α , IL-2 및 IL-12)은 투여된 항원에 대한 세포 매개 면역 반응의 유도를 선호하는 경향이 있다. 이와는 대조적으로, 높은 수준의 Th2-타입 사이토카인(예, IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10)은 체액성 면역 반응의 유도를 선호하는 경향이 있다. 본원에 제공된 바와 같은 백신의 적용 후, 환자는 Th1-타입 반응 및/또는 Th2-타입 반응을 유도하는 면역 반응을 지지할 수 있다. 반응이 주로 Th1-타입인 소정의 실시형태에서, Th1-타입 사이토카인의 수준은 Th2-타입 사이토카인의 수준보다 더 큰 범위까지 증가할 것이다. 이들 사이토카인의 수준은 표준 측정법을 사용하여 쉽게 평가될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다양한 실시형태는 복제 결함 바이러스 벡터 요법과 동시에 제공되는 사이토카인, 예를 들어, IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-7, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, 및/또는 IL-13을 사용하여 표적 항원, 예를 들어 서열 번호1, 서열 번호2, 서열 번호4, 서열 번호5 또는 서열 번호6에 대한 면역 반응을 상승시키는 요법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 사이토카인, 또는 사이토카인을 코딩하는 핵산은 본원에 기재된 복제 결함성 바이러스와 함께 투여된다. 일부 실시형태에서, 사이토카인 투여는 바이러스 벡터 투여 이전 또는 후속해서 수행된다. 일부 실시형태에서, 표적 항원, 예를 들어, 서열 번호1, 서열 번호2, 서열 번호4, 서열 번호5 또는 서열 번호6에 대한 면역 반응을 상승시킬 수 있는 복제 결함 바이러스 벡터는 사이토카인을 코딩하는 서열을 추가로 포함한다.

[0243] 주로 Th1-타입 반응을 이끌어내기 위한 소정의 예시적인 보조제로는, 예를 들어, 모노포스포릴 지질 A, 예컨대 3-de-0-아실화된 모노포스포릴 지질 A와 알루미늄염의 병용이 있다. MPL® 보조제는 상업적으로 입수 가능하다. CpG-함유 올리고뉴클레오타이드(여기서, CpG 다이뉴클레오타이드가 비메틸화되어 있음) 또한, 주로 Th1 반응을 유도한다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 당업계에서 잘 알려져 있고, 기재되어 있다. 면역자극성 DNA 서열 또한, 기재되어 있다. 본 발명에 사용하기 위한 또 다른 보조제는 사포닌, 예컨대 Quil A, 또는 QS21 및 QS7을 포함한 이의 유도체; 에스신(escin); 디기토닌(digitonin); 또는 김소필라(gypsophila) 또는 케노포디움 퀴노아(chenopodium quinoa) 사포닌을 포함한다. 다른 제형은 본 발명의 보조 병용, 예를 들어 예를 들어 QS21, QS7, Quil A, β -에스신 또는 디기토닌을 포함하는 하기 군 중 적어도 2개의 병용에서 1개 초과 사포닌을 포함할 수 있다.

[0244] 소정의 실시형태에서, 조성물은 비내 스프레이, 흡입 및/또는 다른 에어로졸 운반 비히클에 의해 전달될 수 있다. 비내 미세입자 수지 및 리소포스파티딜-글리세롤 화합물(미국 특허 5,725,871)을 사용한 약물의 운반은 약제학적 분야에 잘 알려져 있다. 폴리테트라플루오로에틸렌 지지 매트릭스 형태의 예시적인 경점막 약물 운반이 기재되어 있다.

[0245] 소정의 실시형태에서, 리포솜, 나노캡슐, 미세입자, 지질 입자, 비히클 등은 적합한 숙주 세포/유기체 내로의 본 발명의 조성물의 도입을 위해 사용된다. 특히, 본 발명의 조성물은 지질 입자, 리포솜, 비히클, 나노스피어 또는 나노입자 등 내에서 운반을 위해 제형화될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 조성물은 이러한 담체 비히클의 표면에 공유 또는 비공유 결합될 수 있다.

[0246] 잠재적인 약물 담체로서의 리포솜 및 리포솜-유사 조제물의 형성 및 용도는 일반적으로 당업자에게 알려져 있다(문헌[Lasic, Trends Biotechnol 1998 July; 16(7):307-21; Takakura, Nippon Rinsho 1998 March; 56(3):691-5; Chandran et al., Indian J Exp Biol. 1997 August; 35(8):801-9; Margalit, Crit. Rev Ther Drug Carrier Syst. 1995; 12(2-3):233-61]; 미국 특허 5,567,434; 미국 특허 5,552,157; 미국 특허 5,565,213; 미국 특허 5,738,868 및 미국 특허 5,795,587 참조).

- [0247] 리포솜은 T 세포 현탁액, 원발성 간세포 배양물 및 PC 12 세포를 포함하여, 다른 절차에 의해서 형질감염시키기에 통상적으로 어려운 다수의 세포 타입들과 함께 성공적으로 사용되어 왔다. 리포솜은 유전자, 다양한 약물, 방사성치료제, 효소, 바이러스, 전사 인자, 알로스테릭 효과기 등을 여러 가지 배양된 세포주 및 동물 내에 도입하는 데 효과적으로 사용되어 왔다. 더욱이, 리포솜의 사용은 전신 운반 후, 자가면역 반응 또는 비허용 가능한 독성과 연관된 것으로 보이지 않는다.
- [0248] 소정의 실시형태에서, 리포솜은 수성 배지 내에 분산되어 멀티라멜라 동심 2층 소낭(멀티라멜라 소낭(MLV))으로 도 지칭됨)을 자발적으로 형성하는 인지질로부터 형성된다.
- [0249] 대안적으로, 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 약제학적으로-허용 가능한 나노캡슐 제형을 제공한다. 나노캡슐은 일반적으로, 안정하고 재현 가능한 방식으로 화합물을 가둬둘 수 있다. 세포내 중합체성 과부하로 인한 부작용을 피하기 위해, 이러한 초미세 입자(크기가 약 0.1 μm)는 생체내에서 분해될 수 있는 중합체를 사용하여 디자인될 수 있다. 이러한 입자는 문헌[Couvreux et al., Crit. Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988; 5(1):1-20; zur Muhlen et al., Eur J Pharm Biopharm. 1998 March; 45(2):149-55; Zambaux et al. J Controlled Release. 1998 Jan. 2; 50(1-3):31-40]; 및 미국 특허 5,145,684에 기재된 바와 같이 제작될 수 있다.
- [0250] **방법**
- [0251] 다양한 실시형태들에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 인간 세포용해 T-세포(CTL), 예컨대 선택된 MHC 분자, 예를 들어 HLA-A2, HLA-A3 및 HLA-A24에 결합하는 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L 에피토프를 인지하는 것들을 이용한다. 소정의 혈청형의 MHC 분자, 예를 들어 HLA-A2, HLA-A3 및 HLA-A24를 발현하는 개체는 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 요법을 위해 선택될 수 있다. 예를 들어, 소정의 혈청형의 MHC 분자, 예를 들어 HLA-A2, HLA-A3 및 HLA-A24를 발현하는 개체는 본원에 기재된 방법 및 조성물을 사용하여 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L에 대한 면역 반응을 상승시키는 것을 포함하는 요법을 위해 선택될 수 있다.
- [0252] 다양한 실시형태들에서, 이들 T-세포는 말초 혈액 단핵 세포를 자극시키기 위해 관심 에피토프를 이용하여 펄스 항원 제시 세포를 사용하여 시험관내에서의 배양에 의해 발생될 수 있다. 또한, T-세포주는 또한, GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L 라텍스 비드, GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L 단백질-펄스 플라스틱 부착성 말초 혈액 단핵 세포, 또는 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L RNA를 이용하여 감작된 DC를 이용한 자극 후, 발생될 수 있다. T-세포는 또한, GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L 면역원을 코팅하는 백신 벡터를 이용하여 면역화된 환자로부터 발생될 수 있다. GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L 유래의 HLA A2-제시된 펩타이드는 에볼라에 의해 감염된 환자에서 추가로 발견될 수 있다. 다양한 실시형태들에서, 본 발명은 백신-GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L을 이용하여 면역화된 환자로부터의 CTL을 자극시키는 능력을 가진 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L의 HLA A2 제약된 에피토프에 관한 것이다.
- [0253] **치료 방법**
- [0254] 본 발명의 아데노바이러스 벡터는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 표적 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위한 다수의 백신 셋팅들에서 사용될 수 있다. 본 발명은 임의의 표적 항원, 예컨대 본원 어디에서나 기재된 것들에 대한 면역 반응을 발생시키는 방법을 제공한다. 아데노바이러스 벡터는, 이것이 Ad에 대한 기존 면역을 가진 피험체에서 면역 반응을 발생시키는 데 사용될 수 있고 아데노바이러스 벡터를 사용한 다수 차례의 면역화를 포함하는 백신접종 처방, 이전 세대의 아데노바이러스 벡터를 사용하여서는 가능하지 않은 처방에 사용될 수 있다는 예상치 못한 발견 때문에 특히 중요하다.
- [0255] 일반적으로, 면역 반응의 발생은 체액성 반응 및/또는 세포-매개 반응의 유도를 포함한다. 관심 표적 항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 것이 바람직할 수 있다. 면역 반응의 발생은 면역 시스템의 소정의 세포의 활성화 및/또는 수의 감소, 또는 소정의 사이토카인 또는 다른 효과기 분자의 수준 및/또는 활성의 감소를 수반할 수 있다. 면역 반응(예, 세포 수, 사이토카인 발현, 세포 활성화)에서의 변경을 검출하기 위한 여러 가지 방법들은 당업계에 알려져 있고, 본 발명의 맥락에서 유용하다. 이러한 맥락에서 유용한 예시적인 방법은 세포내 사이토카인 염색(ICS), ELISPOT, 증식 검정법, 크롬 방출을 포함하는 세포독성 T-세포 검정법 또는 등가의 검정법, 및 임의의 수의 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 또는 RT-PCR-기반 검정법을 사용한 유전자 발현 분석을 포함한다.
- [0256] 면역 반응의 발생은 대조군과 비교하여 본 발명의 아데노바이러스 벡터가 투여된 피험체에서 표적 항원-특이적 CTL 활성의 1.5배 내지 5배의 증가를 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 면역 반응의 발생은 대조군과 비교하여 아데노바이러스 벡터가 투여된 피험체에서 표적 항원-특이적 CTL 활성의 약 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5,

5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 15, 16, 17, 18, 19, 20배 또는 그 이상의 증가를 포함한다.

[0257] 면역 반응의 발생은 적절한 대조군과 비교하여, 표적 항원을 코딩하는 핵산을 포함하는 본 발명의 아데노바이러스 벡터가 투여된 피험체에서 표적 항원-특이적 HTL 활성화, 예컨대 헬퍼 T-세포의 증식의 1.5배 내지 5배의 증가를 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 면역 반응의 발생은 대조군과 비교하여, 표적-특이적 HTL 활성화의 약 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 15, 16, 17, 18, 19, 20배 또는 그 이상의 증가를 포함한다. 이러한 맥락에서, HTL 활성화는 특정 사이토카인, 예컨대 인터페론- γ (IFN- γ), 인터루킨-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, 종양 괴사 인자- α (TNF- α), 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF), 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF) 또는 다른 사이토카인의 생성에서 상기 기재된 바와 같은 증가 또는 감소를 포함할 수 있다. 이러한 측면에서, 면역 반응의 발생은 Th2 타입 반응으로부터 Th1 타입 반응으로의 시프트를 포함할 수 있거나, 소정의 실시형태에서 Th1 타입 반응으로부터 Th2 타입 반응으로의 시프트를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 면역 반응의 발생은 주로 Th1 타입 반응 또는 Th2 타입 반응의 자극을 포함할 수 있다.

[0258] 면역 반응의 발생은 적절한 대조군과 비교하여, 본 발명의 아데노바이러스 벡터가 투여된 피험체에서 표적-특이적 항체 생성의 1.5배 내지 5배의 증가를 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 면역 반응의 발생은 대조군과 비교하여, 아데노바이러스 벡터가 투여된 피험체에서 표적-특이적 항체 생성의 약 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 15, 16, 17, 18, 19, 20배 또는 그 이상의 증가를 포함한다.

[0259] 따라서, 본 발명은, a) 복제 결함 아데노바이러스 벡터, 여기서, 아데노바이러스 벡터는 E2b 영역에 결실을 가짐, 및 b) 표적 항원을 코딩하는 핵산을 포함하는 아데노바이러스 벡터를 개체에게 투여하는 단계; 및 상기 아데노바이러스 벡터를 상기 개체에게 적어도 1회 재투여하는 단계; 이로써, 상기 표적 항원에 대한 면역 반응을 발생시키는 단계를 포함하는, 관심 표적 항원에 대한 면역 반응의 발생 방법을 제공한다. 소정의 실시형태에서, 본 발명은, 투여되는 벡터가 거티드 벡터가 아닌 방법을 제공한다. 특정한 실시형태에서, 표적 항원은 야생형 단백질, 이의 단편, 변이체 또는 변이체 단편일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 항원은 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L, 이의 단편, 변이체 또는 변이체 단편을 포함한다.

[0260] 추가의 실시형태에서, 본 발명은 a) 복제 결함 아데노바이러스 벡터, 여기서, 아데노바이러스 벡터는 E2b 영역에 결실을 가짐, 및 b) 표적 항원을 코딩하는 핵산을 포함하는 아데노바이러스 벡터를 개체에게 투여하는 단계; 및 상기 아데노바이러스 벡터를 상기 개체에게 적어도 1회 재투여하는 단계; 이로써, 상기 표적 항원에 대한 면역 반응을 발생시키는 단계를 포함하는, 개체에서 표적 항원에 대한 면역 반응의 발생 방법을 제공하며, 여기서, 상기 개체는 Ad에 대한 기존 면역을 가진다. 특정한 실시형태에서, 표적 항원은 야생형 단백질, 이의 단편, 변이체 또는 변이체 단편일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 항원은 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L, 이의 단편, 변이체 또는 변이체 단편을 포함한다.

[0261] Ad에 대한 기존 면역에 관하여, 이는 Ad 항체의 존재를 시험하기 위한 당업계에 알려진 방법, 예컨대 항체-기반 검정법을 사용하여 확인될 수 있다. 나아가, 소정의 실시형태에서, 본 발명의 방법은 우선, 개체가 Ad에 대한 기존 면역을 가진 것인지 확인한 다음, 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 E2b 결실된 아데노바이러스 벡터를 투여하는 단계를 포함한다.

[0262] 본 발명의 일 실시형태는, 아데노바이러스 벡터가 E2b 영역에 결실을 가진 복제 결함 아데노바이러스 벡터, 및 적어도 하나의 표적 항원을 코딩하는 핵산을 포함하는 제1 아데노바이러스 벡터를 개체에게 투여하는 단계; 아데노바이러스 벡터가 E2b 영역에 결실을 가진 복제 결함 아데노바이러스 벡터, 및 적어도 하나의 표적 항원을 코딩하는 핵산을 포함하는 제2 아데노바이러스 벡터를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 하나 이상의 표적 항원에 대한 면역 반응의 발생 방법을 제공하며, 여기서, 제2 아데노바이러스 벡터의 적어도 하나의 표적 항원은 제1 아데노바이러스 벡터의 적어도 하나의 표적 항원과 동일하거나 상이하다. 특정한 실시형태에서, 표적 항원은 야생형 단백질, 이의 단편, 변이체 또는 변이체 단편일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 항원은 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L, 이의 단편, 변이체 또는 변이체 단편을 포함한다.

[0263] 따라서, 본 발명은 동일한 E2b 결실된 아데노바이러스 벡터를 사용한 복수의 면역화, 또는 상이한 E2b 결실된 아데노바이러스 벡터를 사용한 복수의 면역화를 고려한다. 각각의 경우, 아데노바이러스 벡터는 본원 어디에서나 기재된 바와 같은 하나 이상의 표적 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 본 방법은 하나의 표적 항원을 코딩하는 E2b 결실된 아데노바이러스를 사용한 복수의 면역화, 및 동일한 아데노바

이러스 백터의 수회의 재투여를 포함하며, 이로써 표적 항원에 대한 면역 반응을 유도한다. 일부 실시형태에서, 표적 항원은 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L, 이의 단편, 변이체 또는 변이체 단편을 포함한다.

[0264] 추가의 실시형태에서, 본 방법은 하나 이상의 표적 항원을 코딩하는 제1 아데노바이러스 백터를 이용한 면역화, 및 그런 다음 제1 아데노바이러스 백터에 의해 코딩되는 항원과 동일하거나 상이할 수 있는 하나 이상의 표적 항원을 코딩하는 제2 아데노바이러스 백터를 이용한 투여를 포함한다. 이러한 측면에서, 코딩된 표적 항원들 중 하나가 상이할 수 있거나, 모든 코딩된 표적 항원들이 상이할 수 있거나, 일부는 동일할 수 있고 일부는 상이할 수 있다. 나아가, 소정의 실시형태에서, 본 방법은 제1 아데노바이러스 백터를 수회 투여하고, 제2 아데노바이러스 백터를 수회 투여하는 것을 포함한다. 이러한 측면에서, 본 방법은 제1 아데노바이러스 백터를 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15회 또는 그 이상 투여하고, 제2 아데노바이러스 백터를 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15회 또는 그 이상 투여하는 것을 포함한다. 투여 순서는, 제1 아데노바이러스를 1회 또는 연이어서 수회 투여한 다음, 제2 아데노바이러스를 1회 또는 연이어서 수회 투여하는 것을 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 본 방법은 제1 아데노바이러스 백터 및 제2 아데노바이러스 백터를 각각 하나의 투여로서, 각각 2개의 투여로서, 각각 3개의 투여로서 등으로 교대로 투여하는 것을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 제1 아데노바이러스 백터 및 제2 아데노바이러스 백터는 동시에 투여된다. 다른 실시형태에서, 제1 아데노바이러스 백터 및 제2 아데노바이러스 백터는 순차적으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 표적 항원은 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L, 이의 단편, 변이체 또는 변이체 단편을 포함한다.

[0265] 당업자에 의해 쉽게 이해될 바와 같이, 2개 초과인 아데노바이러스 백터가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 상이한 아데노바이러스 백터들이 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 본 방법은 1개 초과인 E2b 결실된 아데노바이러스 백터를 한꺼번에 투여하는 것을 포함한다. 이러한 측면에서, 다수의 관심 표적 항원들에 대한 면역 반응은 다수의 상이한 아데노바이러스 백터들을 동시에 투여함으로써 발생될 수 있으며, 각각의 백터는 하나 이상의 표적 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0266] 에볼라 증상을 치료하거나 완화하기 위한 방법이 또한, 제공된다. 치료 방법은 본원에 기재된 바와 같은 에볼라 감염을 앓고 있거나 에볼라 감염을 앓을 위험이 있는 개체에게 아데노바이러스 백터를 1회 이상 투여하는 단계를 포함한다. 이와 같이, 본 발명은 이러한 바이러스에 의해 감염될 위험이 있는 개체에서 에볼라에 대한 백신 접종 방법을 제공한다. 위험에 있는 개체는, 에볼라에 여러 차례 노출될 수 있거나, 또는 이전에 노출된 적이 있으나 아직은 에볼라 감염 증상을 갖고 있지 않거나, 에볼라 감염에 특히 취약한 개체일 수 있다. 에볼라 감염을 앓고 있는 개체는 표적 항원을 발현하고/거나 제시하는 것으로 확인될 수 있으며, 이러한 항원은 본원에서 치료법(요법)을 가이드하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 일례는 표적 항원을 발현하고/거나 제시하는 것으로 발견될 수 있고, 표적 항원, 이의 변이체, 단편 또는 변이체 단편을 코딩하는 아데노바이러스 백터가 후속해서 투여될 수 있다.

[0267] 본 발명은 표적 항원, 또는 이의 단편, 변이체 또는 변이체 단편을 코딩하는 핵산의 생체내 운반을 위한 아데노바이러스 백터의 용도를 고려한다. 일단 피험체에게 주사되면, 핵산 서열은 발현되어, 상기 서열에 의해 코딩된 항원에 대한 면역 반응을 초래한다. 아데노바이러스 백터 백신은 "유효량", 즉 본원 어디에서나 기재된 바와 같은 면역 반응을 이끌어내기 위해 선택된 경로 또는 투여 경로에서 효과적인 아데노바이러스 백터의 양으로 투여될 수 있다. 유효량은 표적 에볼라에 대한 숙주의 보호 또는 치료를 촉진하기에 효과적인 면역 반응을 유도할 수 있다. 각각의 백신 용량 내 백터의 양은, 일반적으로 전형적인 백신과 연관된 유의한 부작용 없이 면역 반응, 면역보호 반응 또는 다른 면역치료 반응을 유도하는 양으로서 선택된다. 일단 백신접종되면, 피험체는 백신 치료의 효능을 확인하기 위해 모니터링될 수 있다. 백신접종의 효능의 모니터링은 당업자에게 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체의 수준을 검출하기 위해 혈액 또는 체액 시료가 검정될 수 있다. 다른 실시형태에서, 순환하는 혈구 또는 림프양 조직 세포로부터 세포 매개성 면역 반응을 검출하기 위해 ELISPOT 검정법이 수행될 수 있다.

[0268] 본원에 기재된 치료 조성물의 투여 경로 및 빈도, 뿐만 아니라 투여량은 개체마다 그리고 질병마다 다를 수 있고, 표준 기술을 사용하여 쉽게 구축될 수 있다. 일반적으로, 약제학적 조성물 및 백신은 주사에 의해(예, 피내, 근육내, 정맥내 또는 피하), 비내로(예, 흡입에 의해), 알약 형태로(예, 삼킴, 질 또는 직장 운반용 좌제) 투여될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 1개 내지 10개의 용량이 52주의 기간에 걸쳐 투여될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 6개의 용량이 1개월 간격으로 투여되고, 이후에 추가의 부스터 백신접종이 정기적으로 주어질 수 있다. 교대 프로토콜이 개별 환자에게 적절할 수 있다. 이와 같이, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 용량이 1년이라는 기간에 걸쳐 또는 그보다 더 짧거나 더 긴 기간에 걸쳐, 예컨대 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100주라는 기간에 걸쳐

투여될 수 있다. 용량은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6주 간격 또는 그보다 더 긴 간격으로 투여될 수 있다.

[0269] 백신은 약 4시간 미만의 기간에 걸쳐, 보다 바람직하게는 약 3시간 미만의 기간에 걸쳐 주입될 수 있다. 예를 들어, 제1 25-50 mg은 30분 이내에, 바람직하게는 심지어 15분 이내에 주입될 수 있었으며, 나머지는 다음 2시간 내지 3시간에 걸쳐 주입될 수 있었다. 보다 일반적으로, 투여되는 백신 구축물의 투여량은 2주 또는 3주마다 하나의 투여량으로서 투여될 수 있으며, 적어도 총 3개의 투여량이 반복될 수 있다. 또는, 이러한 구축물은 4주 내지 6주 동안 1주 당 2회 투여될 수 있다. 투약 스케줄은 선택적으로, 다른 간격으로 반복될 수 있고, 투여량은 다양한 비경구 경로를 통해 주어질 수 있으며, 용량 및 스케줄은 적절히 조정된다. 본 발명의 조성물은 임의의 수의 관련 치료 양상과 함께(예, 이전에, 동시에 또는 이후에) 환자에게 투여될 수 있다.

[0270] 적합한 용량은, 상기 기재된 바와 같이 투여 시, 본원 어디에서나 기재된 바와 같은 표적 항원 면역 반응을 촉진할 수 있는 아데노바이러스 벡터의 양이다. 소정의 실시형태에서, 면역 반응은 기준(즉, 미치료) 수준보다 적어도 10% 내지 50% 높다. 소정의 실시형태에서, 면역 반응은 기준 수준보다 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 110, 125, 150, 200, 250, 300, 400, 500 또는 그 이상이다. 이러한 반응은, 환자에서 표적 항원(들) 항체의 측정, 또는 시험관내에서 환자-감염된 세포를 살해할 수 있는 세포용해 효과기 세포의 백신-의존적 발생, 또는 당업계에 알려진 면역 반응을 모니터링하기 위한 다른 방법에 의해 모니터링될 수 있다. 이러한 백신은 또한, 비-백신접종된 환자와 비교하여 백신접종된 환자에서 문제의 질병의 임상 결과의 개선을 초래하는 면역 반응을 유발할 수 있어야 한다. 일부 실시형태에서, 개선된 임상 결과는 질병의 치료, 질병의 증상의 감소, 질병의 진행의 변화, 또는 수명 연장을 포함한다.

[0271] 일반적으로, 적절한 투여량 및 치료 처방은 치료적 및/또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 양의 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 이러한 반응은 비-치료된 환자와 비교하여, 치료를 받는 환자에서 치료되는 특정 질병에 대한 개선된 임상 결과를 구축함으로써 모니터링될 수 있다. 모니터링 데이터는 시간 경과에 따라 평가될 수 있다. 시간 경과에 따른 질병의 진행은 변경될 수 있다. 임상 결과에 있어서의 이러한 개선은 치료 임상상에 의해 쉽게 인지될 것이다. 표적 단백질에 대한 기존 면역 반응의 증가는 일반적으로, 개선된 임상 결과와 상관관계가 있을 수 있다. 이러한 면역 반응은 일반적으로, 표준 증식, 세포독성 또는 사이토카인 검정법을 사용하여 평가될 수 있으며, 이러한 평가는 치료 이전 및 이후에 환자로부터 취득된 시료를 사용하여 수행될 수 있다.

[0272] 본 발명의 하나의 이점이 동일하거나 상이한 아데노바이러스 벡터를 사용한 복수의 백신접종을 특히 Ad에 대한 기존 면역을 가진 개체에서 투여하는 능력에 있는 하지만, 본 발명의 아데노바이러스 백신은 또한, 프라이밍 및 부스터 처방의 일부로서 투여될 수 있다. 혼합된 양상의 프라이밍 및 부스터 접종 계획은 면역 반응을 증강시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 측면은 플라스미드 백신을 적어도 1회 투여하여 예정된 길이의 시간이 지나게 한 다음, 아데노바이러스 벡터를 투여함으로써, 플라스미드 백신, 예컨대 관심 표적 항원을 포함하는 플라스미드 벡터를 이용하여 피험체를 프라이밍하는 방법이다. 다수의, 예를 들어 1 내지 4회의 프라이밍이 적용될 수 있긴 하지만, 더 많은 프라이밍도 사용될 수 있다. 프라이밍과 부스터 사이의 시간 길이는 전형적으로, 약 4개월 내지 1년으로 다양할 수 있으나, 다른 시간 프레임도 사용될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 피험체는 플라스미드 백신을 이용하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10회 또는 그 이상 프라이밍된 다음, 4개월 후에 아데노바이러스 벡터를 이용하여 부스팅될 수 있다.

[0273] 환자 선택

[0274] 본 발명의 다양한 실시형태는 선택된 환자 집단에서 하나 이상의 서열 번호1, 서열 번호2, 서열 번호4, 서열 번호5 또는 서열 번호6 항원에 대한 면역 반응을 상승시키기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본원에 제공된 조성물들 중 임의의 조성물은 개체에게 투여될 수 있다. "개체"는 "피험체" 또는 "환자"와 상호호환적으로 사용될 수 있다. 개체는 포유류, 예를 들어 인간 또는 동물, 예컨대 비-인간 영장류, 설치류, 토끼, 래트, 마우스, 말, 당나귀, 염소, 고양이, 개, 소, 돼지 또는 양일 수 있다. 실시형태에서, 개체는 인간이다. 실시형태에서, 개체는 태아, 배아 또는 아동이다. 일부 경우에, 본원에 제공된 조성물은 생체외에서 세포에 투여된다. 일부 경우에, 본원에 제공된 조성물은 에볼라 감염 치료 방법으로서 개체에게 투여된다.

[0275] 일부 경우에, 피험체는 에볼라 감염을 갖고 있지 않다. 일부 경우에, 본 발명의 치료제는 에볼라 감염 전에 투여된다. 피험체는 미검출된 에볼라 감염을 가질 수 있다. 피험체는 낮은 에볼라 감염 부담(burden)을 가질 수 있다. 피험체는 또한, 높은 에볼라 감염 부담을 가질 수 있다.

[0276] 일부 실시형태에서, 환자는 다른 치료를 통해 받고, 선택적으로 진행되었을 것을 필요로 할 수 있다. 일부 경우

에, 이러한 치료에 대한 개체의 허용 거절은 본 발명의 방법 및 조성물을 이용한 치료 가능 풀(eligible pool)에 환자가 포함될 수 있게 한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 치료를 받을 개체는 적어도, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 18, 21 또는 24개월의 추정된 기대 수명을 가져야 할 필요가 있을 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 치료를 받을 환자 풀은 연령에 의해 제한을 받을 수 있다. 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 25, 30, 35, 40, 50, 60세 초과 또는 그 이상의 개체가 본 발명의 방법 및 조성물을 이용한 치료를 받을 수 있다. 또 다른 예에서, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 40, 35, 30, 25, 20세 미만 또는 그보다 더 어린 개체가 본 발명의 방법 및 조성물을 이용한 치료를 받을 수 있다.

[0277] 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 치료를 받는 환자는 적절한 혈액학적 기능, 예를 들어 1 마이크로리터 당 적어도 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000개 또는 그 이상의 WBC 계수, 1 dL 당 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 g 또는 그 이상의 헤모글로빈 수준, 1 마이크로리터 당 적어도 50,000; 60,000; 70,000; 75,000; 90,000; 100,000; 110,000; 120,000; 130,000; 140,000; 150,000 개 또는 그 이상의 혈소판 계수 중 하나 이상; 0.8, 1.0, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.8, 2.0, 2.5, 3.0 이하 또는 그 이상의 이하의 PT-INR 값, 1.2, 1.4, 1.5, 1.6, 1.8, 2.0 X ULN 이하 또는 그 이상의 이하의 PTT 값을 가진 개체로 한정된다. 다양한 실시형태들에서, 혈액학적 기능 지표 한계는 상이한 성별 및 연령 군의 개체, 예를 들어 0세 내지 5세, 5세 내지 10세, 10세 내지 15세, 15세 내지 18세, 18세 내지 21세, 21세 내지 30세, 30세 내지 40세, 40세 내지 50세, 50세 내지 60세, 60세 내지 70세, 70세 내지 80세 또는 80세를 넘는 개체에 대해 상이하게 선택된다.

[0278] 다양한 실시형태들에서, 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 치료를 위한 개체 또는 후보물질 개체로부터의 시료, 예를 들어 혈청 또는 소변 시료가 수집될 수 있다. 시료는 치료 이전, 도중 및/또는 이후에, 예를 들어 치료의 시작 이전 2, 4, 6, 8, 10주 이내에, 치료의 시작으로부터 1주, 10일, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주 또는 12주 이내에, 치료의 시작 이전 2, 4, 6, 8, 10주 이전에, 치료의 시작으로부터 1주, 10일, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 9주 또는 12주 이내에, 치료의 도중 1주, 10일, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 9주 또는 12주 간격으로, 치료 후 1개월, 3개월, 6개월, 1년, 2년 간격으로, 치료 후 1개월, 3개월, 6개월, 1년, 2년 또는 그 이상 이내에, 6개월, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10년 또는 그 이상의 기간 동안 수집될 수 있다. 시료는 본원에 기재된 혈액학적 지표, 신장 기능 지표 또는 간 기능 지표 중 임의의 지표뿐만 아니라 당업계에 알려진 적합한 다른 것들, 예를 들어 임신 잠재성이 있는 여성에 있어서 β -HCG에 대해 시험될 수 있다. 이러한 측면에서, 상이한 PT, INR 및 PTT를 가진 혈구 계수, Na, K, Cl, CO_2 , BUN, 크레아틴, Ca, 총 단백질, 알부민, 총 빌리루빈, 알칼리 포스파타제, AST, ALT 및 글루코스를 측정하는 시험을 포함한 혈액학적 시험 및 생화학적 시험은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 일부 실시형태에서, HIV 항체, 간염 BsAg 또는 간염 C 항체의 존재 또는 양은 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 치료를 위한 개체 또는 후보물질 개체의 시료에서 확인된다. 생물학적 마커, 예컨대 서열 번호 1, 서열 번호2, 서열 번호4, 서열 번호5, 서열 번호6에 대한 항체, 또는 Ad5 백터에 대한 중화 항체가 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 치료를 위한 개체 또는 후보물질 개체의 시료, 예컨대 혈청에서 시험될 수 있다. 일부 경우에, 하나 이상의 시료, 예컨대 혈액 시료는 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 치료를 위한 개체 또는 후보물질 개체로부터 수집되고 보관될 수 있다. 수집된 시료는 면역학적 평가를 위해 검정될 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 치료를 위한 개체 또는 후보물질 개체는 영상 연구, 예를 들어 가슴, 복부 또는 골반의 CT 스캔 또는 MRI를 사용한 영상 연구에서 평가될 수 있다. 영상 연구는 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 치료 이전, 도중 또는 이후, 및/또는 치료 도중 및/또는 이후, 예를 들어 치료 시작 이전 2, 4, 6, 8, 10주 이내에, 치료 시작 후 1주, 10일, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주 또는 12주 이내에, 치료 시작 이전 2, 4, 6, 8, 10주 이내에, 치료 시작 후 1주, 10일, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 9주 또는 12주 이내에, 치료 동안 1주, 10일, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 9주 또는 12주의 간격으로, 치료 후 1개월, 3개월, 6개월, 1년, 2년의 간격으로, 치료 후 1개월, 3개월, 6개월, 1년, 2년 또는 그보다 긴 기간 이내에, 6개월, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10년 또는 그보다 긴 기간 동안 수행될 수 있다.

[0279] 투여량 및 투여

[0280] 본 발명의 조성물 및 방법은 치료 동안 다양한 투여량 및 투여 처방을 고려한다. 환자는 개체에서 본원에 기재된 표적 항원에 대한 면역 반응을 상승시킬 수 있는 하나 이상의 복제 결함 아데노바이러스 또는 아데노바이러스 백터, 예를 들어 Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호1, Ad5[E1-, E2b-]-서열 번호2, Ad5[E1-, E2b-]-서열 번호4, Ad5[E1-, E2b-]-서열 번호5, Ad5[E1-, E2b-]-서열 번호6, 예를 들어 서열 번호1, 서열 번호2, 서열 번호4, 서열 번호5 또는 서열 번호6을 제공받을 수 있다. 다양한 실시형태들에서, 복제 결함 아데노바이러스는 이러한 면

역 반응에 영향을 미치기에 적합한 용량으로 투여된다. 일부 경우에, 복제 결함 아데노바이러스는 1회 면역화 당 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 1.5×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} 개 이상 또는 그 이상의 이상인 바이러스 입자(VP)인 용량으로 투여된다. 일부 경우에, 복제 결함 아데노바이러스는 1회 면역화 당 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 1.5×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} 개 이하 또는 그 이상의 이하인 바이러스 입자인 용량으로 투여된다. 다양한 실시형태들에서, 본원에 기재된 요망되는 용량은 적합한 부피, 예를 들어 약 0.1-10 mL, 0.2-8mL, 0.3-7mL, 0.4-6 mL, 0.5-5 mL, 0.6-4 mL, 0.7-3 mL, 0.8-2 mL, 0.9-1.5 mL, 0.95-1.2 mL 또는 1.0-1.1 mL 부피의 제형 완충제 내에서 투여된다. 당업자는, 상기 부피는 이들 값(예, 약 0.5 mL 내지 약 1.1 mL) 중 임의의 값에 의해 경계가 지어지는 임의의 범위에 속할 수 있음을 이해할 것이다. 바이러스 입자의 투여는 여러 가지 적합한 운반 경로를 통해서 이루어질 수 있으며, 예를 들어 투여는 주사(예, 피내, 근육내, 정맥내 또는 피하), 비내(예, 흡입에 의한), 알약 형태(예, 삼킴, 질내 또는 직장 운반용 좌제)로 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 피하 운반이 바람직할 수 있고, 수지상 세포에의 더 큰 접근을 제공할 수 있다.

[0281] 개체에의 바이러스 입자의 투여는 반복될 수 있다. 바이러스 입자의 반복된 전달은 스케줄을 따를 수 있거나, 대안적으로는 필요에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 표적 항원, 예를 들어 서열 번호1, 서열 번호2, 서열 번호4, 서열 번호5 또는 서열 번호6에 대한 개체의 면역은 시험될 수 있고, 필요에 따라 부가적인 전달과 함께 보충될 수 있다. 일부 실시형태에서, 운반 스케줄은 정기적인 간격으로의 바이러스 입자의 투여를 포함한다. 조인트 운반 처방은 스케줄을 가진 기간 및/또는 투여 전 평가된 필요-기반 투여의 기간 중 하나 이상을 포함하도록 디자인될 수 있다. 예를 들어, 치료 처방은 사멸을 포함하는 임의의 이유로 치료로부터 배제될 때까지 투여, 예컨대 3주마다 1회 피하 투여, 및 그런 다음 3개월마다 또 다른 면역요법 치료를 포함할 수 있다. 또 다른 처방 예는 3주마다 3회의 투여, 및 그런 다음 3개월마다 3회의 면역요법 치료의 또 다른 세트를 포함한다. 또 다른 처방 예는 제1 빈도의 제1 투여 수로 이루어진 제1 기간, 제2 빈도로 제2 투여 수로 이루어진 제2 기간, 제3 빈도로 제3 투여 수로 이루어진 제3 기간 등, 및 선택적으로 필요에 따라 미정된 수의 투여로 이루어진 하나 이상의 기간을 포함한다. 각각의 기간에서 투여 수는 독립적으로 선택될 수 있고, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상일 수 있다. 각각의 기간에서 투여 빈도는 또한, 독립적으로 선택될 수 있고, 예를 들어 약 매일, 격일로, 3일마다, 1주에 2회, 1주에 1회, 격주에 1회, 3주마다, 매달, 6주마다, 격월로, 3개월마다, 4개월마다, 5개월마다, 6개월마다, 1년에 1회 등일 수 있다. 치료는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 30, 36개월 또는 그 이상의 총 기간이 소요될 수 있다. 면역화들 사이의 스케줄된 간격은 변형될 수 있어서, 면역화들 사이의 간격이 해당 간격의 최대 1/5, 1/4, 1/3 또는 1/2만큼 수정된다. 예를 들어, 3주간의 간격 스케줄에 있어서, 면역화는 20일 내지 28일(3주-1일 내지 3주+7일) 사이에서 반복될 수 있다. 처음의 3회 면역화 동안, 제2 면역화 및/또는 제3 면역화가 지연된다면, 후속적인 면역화가 시프트되어, 면역화들 사이에 최소량의 완충제를 허용할 수 있다. 예를 들어, 3주 간격의 스케줄에 있어서, 면역화가 지연된다면, 후속적인 면역화는 이전의 면역화 후 17일, 18일, 19일 또는 20일 지나서 발생하도록 스케줄될 수 있다.

[0282] 본 발명의 조성물, 예컨대 Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호1, Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호2, Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호4, Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호5 및 Ad5[E1-, E2B-]-서열 번호6 벡터 및 이들 벡터를 사용하여 생성되는 바이러스 입자는 다양한 상태, 예를 들어 실온에서, 얼음 상에서 또는 동결된 상태로 제공될 수 있다. 조성물은 적합한 크기의 용기, 예를 들어 2 mL 바이알의 바이알에서 제공될 수 있다. 일 실시형태에서, 1.0 mL의 추출 가능한 백신을 포함하는 1.2 mL 바이알은 5×10^{11} 개의 총 바이러스 입자/mL를 함유한다. 온도 및 습도를 포함한 저장 조건은 다양할 수 있다. 예를 들어, 치료에 사용되기 위한 조성물은 실온, 4°C 내지 20°C 또는 그보다 낮은 온도에서 저장될 수 있다.

[0283] 다양한 실시형태들에서, 일반적인 평가는 본 발명의 방법 및 조성물에 따른 치료를 받는 개체에서 수행된다. 하나 이상의 임의의 시험은 필요에 따라 또는 스케줄을 기반으로, 예컨대 0주, 3주, 6주 등을 기반으로 수행될 수 있다. 상이한 세트의 시험들은 면역화 없는 시점에서 대(vs) 면역화와 동시에 수행될 수 있다.

- [0284] 일반적인 평가는 의학적 이력, ECOG 수행 점수, 카르노프스키 수행 상태(Karnofsky performance status) 및 임상양의 의한 체중을 비롯한 완전한 신체 검사를 포함할 수 있다. 마지막 방문 이후 환자가 제공받는 중이거나 또는 제공받은 임의의 다른 치료, 약제, 생물제제 또는 혈액 제제는 기록될 수 있다. 환자는 백신 수여 후 임의의 부작용을 모니터링하기 위해 적합한 기간, 예를 들어 대략 30분 동안 클리닉에 머무를 수 있다. 각각의 용량의 백신 후 국소 및 전신 반응원성(reactogenicity)은 선택된 기간 동안, 예를 들어 3일 동안(면역화 당일 및 이후 2일) 매일 평가될 수 있다. 증상을 기록하기 위해 다이어리 카드가 사용될 수 있고, 국소 반응원성을 측정하기 위해 룰러가 사용될 수 있다. 면역화 주사 부위가 평가될 수 있다. 가슴, 복부 및 골반의 CT 스캔 또는 MRI가 수행될 수 있다.
- [0285] 다양한 실시형태들에서, 혈액학적 평가 및 생화학적 평가는 본 발명의 방법 및 조성물에 따른 치료를 받는 개체에서 수행된다. 하나 이상의 임의의 시험은 필요에 따라 또는 스케줄을 기반으로, 예컨대 0주, 3주, 6주 등을 기반으로 수행될 수 있다. 상이한 세트의 시험들은 면역화 없는 시점에서 대(vs) 면역화와 동시에 수행될 수 있다. 혈액학적 평가 및 생화학적 평가는 화학 및 혈액학을 위한 혈액 시험, 상이한 Na, K, Cl, CO₂, BUN, 크레아틴, Ca, 총 단백질, 알부민, 총 빌리루빈, 알칼리 포스파타제, AST, ALT, 글루코스 및 ANA를 가진 CBC 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0286] 다양한 실시형태들에서, 생물학적 마커는 본 발명의 방법 및 조성물에 따른 치료를 받는 개체에서 평가된다. 하나 이상의 임의의 시험은 필요에 따라 또는 스케줄을 기반으로, 예컨대 0주, 3주, 6주 등을 기반으로 수행될 수 있다. 상이한 세트의 시험들은 면역화 없는 시점에서 대(vs) 면역화와 동시에 수행될 수 있다.
- [0287] 생물학적 마커 평가는 적절한 부피, 예를 들어 약 5 mL의 혈청 시료로부터 서열 번호1, 서열 번호2, 서열 번호4, 서열 번호5, 서열 번호6 또는 Ad5 벡터에 대한 항체의 측정 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 바이오마커는 확인되고 입수 가능하다면 리뷰될 수 있다.
- [0288] 다양한 실시형태들에서, 면역학적 평가는 본 발명의 방법 및 조성물에 따른 치료를 받는 개체에서 평가된다. 하나 이상의 임의의 시험은 필요에 따라 또는 스케줄을 기반으로, 예컨대 0주, 3주, 6주 등을 기반으로 수행될 수 있다. 상이한 세트의 시험들은 면역화 없는 시점에서 대(vs) 면역화와 동시에 수행될 수 있다.
- [0289] 말초 혈액, 예를 들어 약 90 mL는, 연구 도중 및/또는 특정 수의 면역화 후 특정 시점에서 면역 반응에 미치는 효과가 존재하는지 확인하기 위해, 각각의 면역화 이전, 및 면역화 후 어느 정도의 시간이 지난 후에 채혈될 수 있다. 면역학적 평가는 ELISPOT을 사용한 서열 번호1, 서열 번호2, 서열 번호4, 서열 번호5 또는 서열 번호6에 대한 T-세포 반응에 대한 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 검정법, 증식 검정법, 멀티-파라미터 유세포 분석, 및 세포독성 검정법 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 각각의 채혈 유래의 혈청은 보관되고 보내지고, 확인될 수 있다.
- [0290] 다양한 실시형태들에서, 에볼라 감염 평가 또는 에볼라 복제 검정법은 본 발명의 방법 및 조성물에 따른 치료를 받는 개체에서 수행된다. 하나 이상의 임의의 시험은 필요에 따라 또는 스케줄을 기반으로, 예컨대 0주, 3주, 6주 등을 기반으로 수행될 수 있다. 상이한 세트의 시험들은 면역화 없는 시점에서 대(vs) 면역화와 동시에 수행될 수 있다. 에볼라 감염은 치료 이전, 면역화 후 어느 정도의 시간이 지난 때, 및 선택된 수, 예를 들어 제1 치료의 2, 3 또는 4회 후 대략 매주 내지 3개월, 및 예를 들어 치료가 중단될 때까지, 하나 이상의 에볼라 면역 특이적 시험을 포함할 수 있다.
- [0291] 본원에 기재된 표적 항원, 서열 번호1, 서열 번호2, 서열 번호4, 서열 번호5 또는 서열 번호6에 대한 면역 반응은 면역 반응에 대한 하나 이상의 적합한 시험, 예컨대 ELISPOT, 사이토카인 유세포 분석 또는 항체 반응을 사용하여 시료, 예컨대 개체의 말초 혈액 시료로부터 평가될 수 있다. 양성 면역 반응은 T-세포 반응을 측정함으로써 확인될 수 있다. T-세포 반응은, 항원을 함유한 6개 웰에서 백그라운드에 대해 조정된 스폿의 평균 수가 6개의 대조군 웰 내의 스폿의 수를 10배 초과하고 항원을 함유하는 6개 웰의 단일 값과 6개 대조군 웰 사이의 차이가 스튜던트 t-테스트를 사용하여 $p \leq 0.05$ 의 수준에서 통계학적으로 유의하다면, 양성인 것으로 간주될 수 있다. 면역원성 검정법은 각각의 면역화 이전, 및 치료 기간 동안 스케줄된 시점에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 치료의 대략 주 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 20, 24, 30, 36 또는 48에서 면역원성 검정법의 시점은 이러한 시점에서 스케줄된 면역화 없이도 스케줄될 수 있다. 일부 경우, 개체는, 적어도 최소 수의 면역화, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 그 이상의 면역화를 받는 경우, 면역 반응에 대해 평가 가능한 것으로 간주될 수 있다.
- [0292] 임상 반응의 확인

- [0293] 일부 실시형태에서, 질병 진행 또는 임상 반응 확인은 측정 가능한/평가 가능한 질병을 앓고 있는 환자 중에서 RECIST 1.1 기준에 따라 이루어진다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 치료는 치료를 받고 있는 개체에서 완전한 반응(CR; 모든 항원 또는 증상 표적 부위의 소멸 또는 모든 비-표적 부위의 소멸 및 비-표적 부위에 대한 항원 또는 증상 수준의 정상화)에 영향을 미친다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 치료는 치료를 받고 있는 개체에서 부분 반응(PR; 표적 부위에 대한 기준선 합계 LD를 참조로서 취하여, 표적 부위의 LD의 합계에서 적어도 30%의 감소)에 영향을 미친다.
- [0294] 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 치료는 치료를 받고 있는 개체에서 안정한 질병(SD; 표적 부위에 대해 시작한 치료 이후 최소의 LD 합계를 참조로서 간주하여, 항원 또는 증상이 PR에 대한 자격을 얻을 정도로 충분히 감소한 것도 아니며 PD의 자격을 얻을 정도로 충분히 증가한 것도 아님)에 영향을 미친다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 치료는 치료를 받고 있는 개체에서 불완전한 반응/안정한 질병(SD; 하나 이상의 비-표적 부위의 지속 및/또는 비-표적 부위에 대한 정상 한계를 초과한 항원 또는 증상의 유지)에 영향을 미친다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 치료는 치료를 받고 있는 개체에서 진행형 질병(PD; 치료 시작 이후 기록된 최소 LD 합계를 참조로서 취하여 항원 또는 증상의 LD 합계의 적어도 20% 증가, 또는 하나 이상의 새로운 항원 또는 증상의 출현 또는 하나 이상의 비-표적 항원 또는 증상의 지속 및/또는 치료를 받는 개체에서 정상 한계를 초과한 항원 수준의 유지)에 영향을 미친다.
- [0295] **키트**
- [0296] 조성물, 면역요법 또는 백신은 키트 형태로 공급될 수 있다. 본 개시내용의 키트는 치료 처방 정보를 포함한 투여량 및/또는 투여에 관한 지침을 추가로 포함할 수 있다.
- [0297] 일부 실시형태에서, 키트는 병용 다중-표적화된 에볼라 면역요법을 제공하기 위한 조성물 및 방법을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 에볼라 감염의 병용 다중-표적화된 치료에 대한 조성물 및 방법을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 키트 성분을 투여하는 데 유용한 성분, 및 이들 성분의 제조 방법에 관한 지침을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 치료 이전 및 치료 이후 적절한 실험실 시험을 이용한 환자의 모니터링을 수행하거나, 결과 및 환자 데이터를 의료진과 소통하기 위한 소프트웨어를 추가로 포함할 수 있다. 키트를 포함하는 성분들은 건조 형태 또는 액체 형태로 존재할 수 있다. 이들이 건조 형태인 경우, 키트는 건조된 물질을 용해시키기 위한 용액을 포함할 수 있다. 키트는 또한, 액체 형태 또는 건조 형태에 이동 요소를 포함할 수 있다. 이동 요소가 건조 형태인 경우, 키트는 이동 요소를 용해시키기 위한 용액을 포함할 것이다. 키트는 또한, 성분들의 혼합 및 제조를 위한 용기를 포함할 수 있다. 키트는 또한, 투여를 보조하기 위한 장비, 예를 들어 바늘, 튜브, 어플리케이터, 흡입제, 주사기, 파이펫, 포셉, 계량 스포, 점안기 또는 이러한 임의의 의학적으로 승인된 운반 비히클을 포함할 수 있다. 본 발명의 키트 또는 약물 운반 시스템은 또한 전형적으로, 상업적인 판매 및 유통을 위해 밀폐된 상태로 본 개시내용의 조성물을 함유하기 위한 수단을 포함할 것이다.
- [0298] **실시예**
- [0299] **실시예 1: Ad5Nu11 아데노바이러스 벡터의 복수 주사는 항-아데노바이러스 항체를 생성한다**
- [0300] 이 실시예는 Ad5-널을 복수 주사하면 주사를 받은 피험체에서 항-아데노바이러스 항체의 생성을 초래함을 보여준다.
- [0301] 임의의 이중성 핵산 서열을 함유하지 않는 Ad5-널 아데노바이러스 벡터는 마우스에서 중화 면역 반응을 발생시킨 것으로 나타났다. 하나의 실험에서, 5주령 내지 7주령의 암컷 Balb/c 마우스에게 Ad5-널 바이러스 입자를 14일 간격으로 면역화하였다. 항-아데노바이러스 항체의 존재를 확인하기 위해, 효소 연결된 면역흡착 검정법(ELISA)을 사용하였다. 이러한 ELISA에 있어서, 10^9 개 바이러스 입자를 100 μ L의 0.05 M 카르보네이트/비카르보네이트 완충제, pH 9.6에서 마이크로타이타 웰 상에 코팅하고, 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 표준 면역글로불린 G(IgG) 참조 곡선에 있어서, 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng 및 0 ng의 정제된 마우스 IgG를 상기 기재된 바와 같이 마이크로타이타 웰 상에 코팅시켰다. 인큐베이션 후, 모든 웰을 포스페이트 완충 식염수(PBS) 중 1% 소 혈청 알부민(BSA) 250 μ L, pH 7.4를 사용하여 3회 세척하였다. 세척 후, 250 μ L의 BSA/PBS를 모든 웰에 첨가하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하여, 비결합된 부위를 차단시켰다. 인큐베이션 후, 모든 웰을 250 μ L의 BSA/PBS로 3회 세척하였다. 세척 후, BSA/PBS 중 1/100 혈청 희석액 200 μ L를 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 양성 대조군의 경우, BSA/PBS 중 1/10000 희석의 항-아데노바이러스 항혈청 200 μ L를 웰에 첨가하였다. 대조군 웰은 BSA/PBS만 함유하였다. 인큐베이션 후, 모든 웰을 250 μ L의 BSA/PBS로 3회 세척하였다. 세척 후, BSA/PBS 중 1/10000 희석의 퍼옥시다제 컨쥬게이트된 γ -사슬 특이적 염소 항-마우스

IgG(Sigma Chemicals) 200 μ L를 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 모든 웰을 250 μ L의 BSA/PBS로 3회 세척하였다. 세척 후, 200 μ L의 발색 시약(0.06% 하이드로젠 퍼옥사이드를 함유하는, 0.2 M 포타슘 포스페이트 완충제 중 0.5 mg/mL 1,2-페닐렌-다이아민, pH 5.0)을 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 30분 내지 40분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 50 μ L 5 N HCl을 각각의 웰에 첨가함으로써 색상 반응을 중단시켰다. 그런 다음, 모든 웰을 마이크로웰 플레이트 판독기에서 492 nm에서 판독하였다. 판독값을 수득한 후, 미지 시료의 광학 밀도 판독값을 표준 IgG 곡선과 상관관계를 지어, 1개 웰 당 결합된 IgG의 ng를 수득하였다. 이를 INSTAT 통계학적 패키지를 사용하여 수행하였다.

[0302] EA에 대한 항체를 검출하기 위한 ELISA

[0303] ELISA 플레이트를 0.05 M 카르보네이트-비카르보네이트 완충제 pH 9.6 중 100 ng의 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L을 사용하여 코팅시킬 것이며, 실온에서 밤새 인큐베이션시킬 것이다. 플레이트를, 1% Tween-20(PBS-T)을 함유하는 포스페이트 완충 식염수로 3회 세척한 다음, 1% BSA를 함유하는 PBS를 사용하여 실온에서 60분 동안 차단시켰다. 부가적인 3회의 세척 후, PBS-T에서 1/50으로 희석된 혈청을 웰에 첨가할 것이고, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션할 것이다. 1:5000으로 희석된 퍼옥시다제 표지된 염소 항-마우스 면역글로불린(Ig) G(γ -사슬 특이적)(Sigma-Aldrich) 항체를 세척 후 웰에 첨가할 것이고, 플레이트를 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 3회 세척할 것이고, 1,2-페닐렌-다이아민 기질 용액을 각각의 웰에 첨가할 것이다. 10% 인산을 첨가함으로써 반응을 중단시킬 것이다. 흡광도를 SpectraMax 190 ELISA 판독기 상에서 492 nm에서 측정할 것이다. 1개 웰 당 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L에 결합된 IgG의 나노그램 당량을, 정제된 마우스 IgG를 사용하여 발생된 표준 곡선을 참조로 하여 수득하고, 이와 동시에 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L ELISA로서 발색시킬 것이다. 그 결과를 분석하고, SoftMax Pro 6.3 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다.

[0304] 항-아데노바이러스 IgG 항체의 유의 수준($P < 0.001$)을, 10^{10} 개 Ad5-널을 사용한 제1 주사 후 2주째에 마우스에서 검출하였다(도 1). 유의하게 더 높은 수준($P < 0.001$)을, 10^{10} 개 아데노바이러스를 사용한 제2 주사 후 2주째에 관찰하였다. 유의하게 더 높은($P < 0.001$) 항체 수준은 10^{10} 개 Ad5-널을 사용한 제3 주사 후 2주째에도 계속 관찰되었다. 각각의 값은 각각의 그룹에서 5마리의 마우스의 풀링된 혈청으로부터 삼중 확인의 평균을 나타낸다. Ad5-널을 복수 주사하면, 피험체에서 항-아데노바이러스 항체가 생성되었다.

[0305] Ad에 대한 중화 항체의 존재를 확인하기 위해, 하기 검정법을 이용하였다. HEK-293T-세포주를 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안, 1개 웰 당 2×10^3 개 세포의 세포 농도로 마이크로웰 조직 배양 플레이트에서 10% 태아 소 혈청(DMEM/FCS)을 함유하는 DMEM으로 이루어진 200 μ L 배양 배지에서 배양하였다. 인큐베이션 후, 100 μ L의 배양 배지를 삼중 웰로부터 제거하고, 바이러스 입자(VP)를 함유하는 20 μ L의 DMEM/FCS와 혼합하였다. 혼합 후, 120 μ L 혼합물을 각각의 마이크로웰에 다시 첨가하였다. 삼중 웰로 된 또 다른 세트에서, 100 μ L의 배양 배지를 제거하고, 이전에 실온에서 1시간 동안 VP와 함께 인큐베이션된 20 μ L의 열 불활성화된(56°C에서 1시간) Ad 면역 마우스 혈청과 혼합하였다. 혼합 후, 120 μ L 혼합물을 각각의 웰에 다시 첨가하였다. 삼중 세포 대조군 웰에서, 20 μ L의 DMEM/FCS를 총 배양 배지 부피에 대해 대조군에 첨가하였다. 삼중 배지-단독 대조군 웰은 220 μ L의 DMEM/FCS를 함유하였다. 조직 배양 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 3일 더 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 40 μ L의 PROMEGA 세포 생존력 시약(Owen's 시약)을 모든 웰에 첨가하고, 37°C, 5% CO₂에서 75분 동안 인큐베이션하였다. 이 검정법에서, Owen's 시약(MTS 테트라졸륨 화합물)을 생존가능한 세포에 의해, 조직 배양 배지에서 가용성인 유색 포르마잔 생성물로 생물환원시킨다. 490 nm에서 흡광도에 의해 측정되는 바와 같은 포르마잔 생성물의 양은 배양 중 살아 있는 세포의 수에 정비례한다. 인큐베이션 후, 150 μ L를 각각의 웰로부터 제거하고, 광학 밀도 판독을 위해 또 다른 마이크로웰 플레이트로 옮겼다. 후속해서, 492 nm에서의 광학 밀도 판독값을 마이크로웰 플레이트 판독기를 사용하여 수득하였다.

[0306] Ad에 대한 중화 항체의 존재를 검출하기 위해, 5마리로 된 그룹의 각각의 마우스에게 10^{10} 개 Ad5-널을 2주 간격으로 1회, 2회 또는 3회 주사하였다. 바이러스를 마지막으로 주사한 후 2주째에, 마우스에서 채혈하고, 풀링한 다음, 열 불활성화된 혈청과 함께 또는 없이 인큐베이션된 4×10^7 개 VP를 사용하여 상기 기재된 바와 같이 중화 항체에 대해 평가하였다. 단독 배양된 세포는 대조군으로서 역할을 하였다. 정상 마우스, 및 Ad5널을 1회 주사한 마우스는 유의한 수준의 중화 항체를 나타내지 않았다(도 2). Ad를 2회 주사 받은 마우스는 바이러스 단독으로 인큐베이션된 세포와 비교하여 유의한($P < 0.05$) 수준의 중화 항체를 나타내었다. Ad5-널을 3회 주사 받은 마

우스 또한, 바이러스 단독으로 인큐베이션된 세포와 비교하여 유의한($P < 0.01$) 수준의 증화 항체를 나타내었다.

[0307] **실시예 2: Ad5[E1-]-EA 벡터 백신은 Ad5 면역 마우스에서 재-면역화 시 EA 특이적인 면역 반응을 유도한다**

[0308] 이 실시예는 Ad5[E1-, E2b-] 벡터 플랫폼이 마우스에서 기존의 Ad5 면역의 존재 하에 에볼라 연관된 항원 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L에 대하여 CMI 반응을 유도함을 보여준다.

[0309] Ad5[E1-, E2B-]-GP, Ad5[E1-, E2B-]-NP, Ad5[E1-, E2B-]-VP40, Ad5[E1-, E2B-]-VP35, Ad5[E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24, 및/또는 [E1-, E2b-]-L은 구축되고 생성될 것이다. 간략하게는, 전이유전자는 상동성 재조합-기반 접근법을 사용하여 Ad5[E1-, E2b-] 벡터의 E1 영역 내로 서브클로닝될 것이다. 복제 결함 바이러스는 E.C7 패키징 세포주에서 증식되고, CsCl₂ 정제되며, 역가 확인될 것이다. 바이러스 감염성 역가는 E.C7 세포 단 일층 상에서 플라크-형성 단위(PFU)로서 확인될 것이다. VP 농도는 소듐 도데실 설페이트(SDS) 분해 및 260 nm 및 280 nm에서의 분광 광도법에 의해 확인될 것이다.

[0310] Ad5 CEA 벡터의 특징규명

[0311] 초기 연구를 수행하여, 2개의 Ad5-GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L 벡터 플랫폼의 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L 유전자 발현을 확인하였다. 처음에, 백신 벡터 플랫폼을 사용하여 형질감염된 세포 상에서 항원이 발현될 수 있는지 확인하였다. A549 세포를 ATCC로부터 수득하고, Ad5[E1-]-GP, Ad5[E1-]-NP, Ad5[E1-]-VP40, Ad5[E1-]-VP35, Ad5[E1-]-VP30, [E1-]-VP24, 및/또는 [E1-]-L; 또는 Ad5[E1-, E2B-]-GP, Ad5[E1-, E2B-]-NP, Ad5[E1-, E2B-]-VP40, Ad5[E1-, E2B-]-VP35, Ad5[E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24, 및/또는 [E1-, E2b-]-L을 사용하여 형질감염시켰다. 웨스턴 블롯 분석은, 벡터 플랫폼을 사용하여 형질감염된 세포가 지시된 항원을 발현하였음을 보여주었다.

[0312] 방법

[0313] A549 세포에 Ad5[E1-, E2B-]-GP, Ad5[E1-, E2B-]-NP, Ad5[E1-, E2B-]-VP40, Ad5[E1-, E2B-]-VP35, Ad5[E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24, 및/또는 [E1-, E2b-]-L을 555 VP/세포의 MOI로 하여 접종하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 48시간 후, 세포를 수확하고, PBS로 세척한 다음, 3회 동결/해동하였다. 전체 세포 용해물을 70°C에서 10분 동안 가열한 다음, 겔 상에 로딩하였다. 재조합 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L 대조군을 30 ng/레인으로 로딩하고, 제조된 용해물을 20 µL/레인으로 로딩하였다. 시료 로딩 완충제를 추가적인 음성 대조군으로서 포함시켰으며, 양성 대조군은 Magic Mark CP Western 마커 및 재조합 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및/또는 L이었다. 겔을 니트로셀룰로스 막으로 옮기고, SuperBlock 블라킹 용액을 사용하여 60분 동안 차단시켰다. 막을 마우스 모노클로날 항-GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L 1차 항체(1:1000) 및 2차 항-마우스 HRP(1:2500) 컨쥬게이트된 항체를 사용하여 프로브하였다. 막을 3회 세척한 다음, SuperSignal 화학발광 시약과 함께 인큐베이션하고, X-선 필름을 막에 노출시킨 다음 발색시켜, 밴드를 시각화하였다.

[0314] 마우스에서 Ad5 면역의 유도

[0315] 유도될 수 있는 Ad5 면역의 수준을 평가하기 위해, Ad5 네이브 C57Bl/6 마우스의 그룹에게 Ad5 벡터 플랫폼(V P)을 피하 주사할 것이다. 28일 내지 42일 후, 혈청 시료를 수집할 것이고, 종점 Ad5 NAb 역가에 대해 평가할 것이다. 미검출 가능한 Ad5 NAb 역가(종점 Ad5 NAb 역가 < 1/25)는 정상 대조군 마우스에서 관찰될 수 있다. Ad5 NAb(1/25 내지 1/50의 종점 역가)는 1회 주사 후 검출될 수 있으나, 10¹⁰ 개 Ad5의 3회 주사 후 급격히 증가할 수 있다. 따라서, 추가적인 Ad5 면역 연구에서, 마우스에게 10¹⁰ 개 Ad5 VP를 2회 주사하여, 동물을 Ad5 면역시킬 것이다.

[0316] Ad5[E1-]-EA 또는 Ad5[E1-, E2b-]-EA를 사용한 Ad5 면역 마우스의 면역화

[0317] 이들 실험은 Ad5 면역 마우스에서 Ad5[E1-]-EA 및 Ad5[E1-, E2b-]-EA 백신의 면역화 유도 잠재성을 확인하고 비교하도록 디자인될 것이다. 4주령 내지 8주령의 암컷 C57Bl/6 마우스의 그룹을 10¹⁰ 개 Ad5-널 VP를 사용하여 2주간격으로 2회 면역화할 것이다. 마지막 Ad5-널 면역화 후 2주째에, 마우스를 10¹⁰ 개 VP의 Ad5[E1-]-EA 또는 Ad5[E1-, E2b-]-EA를 사용하여 매주 간격으로 3회 면역화할 것이다. 마지막 면역화 후 2주째에, 마우스를 안락사시키고, 마우스의 비장 및 혈청을 분석을 위해 수확할 것이다.

[0318] CMI 반응을, 온전한 EA 항원에 노출된 비장세포 상에서 수행된 ELISPOT 검정법에 의해 평가할 것이다. Ad5 E1-

]EA 또는 Ad5[E1-, E2b-]-EA를 피하 면역화한 Ad5 면역 C57B1/6 마우스의 비장세포를 수확하고, IFN- γ 분비 세포 및 IL-2 분비 세포의 수에 대해 평가할 것이다. IFN- γ 분비 세포 및 IL-2 분비 세포 둘 다의 유의하게 상승된 수는 Ad5[E1-]-EA 면역화된 마우스와 비교하여 Ad5[E1-, E2b-]-EA 면역화된 마우스로부터 검정된 비장에서 관찰될 수 있다. Ad5[E1-, E2b-]-CEA를 이용한 Ad5 면역 마우스의 면역화는 유의하게 더 높은 CMI 반응을 유도하는 것으로 나타날 수 있다.

[0319] 면역화된 마우스에서 간 부작용의 결여

[0320] 독성 연구를, 상기 기재된 바와 같이 Ad5[E1-]-EA, Ad5[E1-, E2b-]-EA로 면역화된 Ad5 면역 암컷 C57B1/6 마우스의 혈청 상에서 수행할 것이다. Ad5 네이브, 또는 완충제 단독으로 주사된 Ad5 면역 마우스는 대조군으로서 역할을 할 것이다. 제3 면역화 후 3일째에, 치료로 인한 간 독성을 확인하기 위해, 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) 수준이 혈액 시료 상에서 평가될 것이다. AST 수준은 백터를 이용한 면역화 후 대조군을 능가하여 상승되지 않을 수 있다. 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 수준 또한, 평가될 것이고, 유사한 결과가 관찰될 수 있다.

[0321] Ad5 면역 에볼라 감염 마우스에서 Ad5[E1-, E2b-]-CEA 면역요법

[0322] 상기 관찰된 성공적인 면역학적 결과를 기반으로, 에볼라 감염이 마우스에서 구축된 다음 치료된 연구를 하기 기재된 바와 같이 수행하였다. 에볼라 감염 후, 마우스를 신규 Ad5[E1-, E2b-]-EA 벡터 플랫폼을 사용하여 치료할 것이다. Ad5 면역 에볼라 감염 마우스가 Ad5[E1-, E2b-]-EA 벡터를 사용하여 치료될 수 있는지 확인하기 위해, C57B1/6 마우스에게 10^{10} 개 Ad5[E1-]-널 VP를 14일 간격으로 2회 피하 주사하여, 마우스 Ad5 면역을 제공할 것이다. 마지막 주사 후 2주째에, 7마리의 C57B1/6 마우스로 된 2개의 그룹에게 10^6 개 EA 발현 세포를 피하 주사할 것이다. 7일 후, 에볼라 감염이 감지될 수 있다면, 하나의 마우스 그룹을 제7일, 제13일 및 제19일에 10^{10} 개의 Ad5[E1-, E2b-]-EA VP를 원위(distal) 피하 주사함으로써 치료할 것이다. 주사 완충제 단독으로 치료된 C57B1/6 마우스 그룹은 미치료 대조군으로서 역할을 할 것이다. 모든 마우스를 21일의 기간에 걸쳐 에볼라 감염 퇴행에 대해 모니터링할 것이고, 에볼라 바이러스 감염 역가를 확인할 것이다. 연구 종료 시, 비장을 마우스로부터 수집할 것이고, CEA 특이적 CMI 반응을 ELISpot 검정법에 의해 확인할 것이다.

[0323] ELISpot 검정법에 의한 CMI 반응의 분석

[0324] IFN- γ 분비 림프구에 대한 ELISpot 검정법이 수행될 것이다. 간략하게는, 개별 환자 시료로부터 단리된 PBMC(2×10^5 개 세포/웰)를 EA 펩타이드 풀과 함께 36시간 내지 40시간 동안 인큐베이션하여, IFN- γ 생성 세포를 자극할 것이다. 환자의 PBMC를 Ad5-널(빈 벡터)에 노출시킨 후 Ad5에 대한 CMI 반응을 확인할 것이다. 세포를, 양성 대조군으로서 역할을 하는 $0.25 \mu\text{g}/\text{well}$ 농도의 콘카나발린 A(concanavalin A)(Con A)를 사용하여 자극할 것이다. 유색 스폿-형성 세포(SFC)를 Immunospot ELISpot 플레이트 판독기를 사용하여 계수할 것이고, 음성 대조군을 제한 후 10^6 개 세포 당 50개 SFC가 검출되고 SFC가 음성 대조군 웰에서보다 2배 이상 더 높은 경우 반응은 양성인 것으로 간주될 것이다.

[0325] Ad5 중화 항체(NAb) 역가의 확인

[0326] 종점 Ad5 NAb 역가가 확인될 것이다. 간략하게는, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 $100 \mu\text{L}$ 의 DMEM 중 열 불활성화된 시험 혈청의 희석액을 4×10^7 개 VP의 Ad5[E1-]-널과 혼합하고, 실온에서 60분 동안 인큐베이션할 것이다. 시료를, 37°C , 5% CO_2 에서 24시간 동안 10% 열 불활성화된 소 혈청을 함유하는 DMEM에서 배양된 HEK293 세포를 2×10^3 개 세포/웰로 함유하는 마이크로웰에 첨가할 것이다. 혼합물을 37°C , 5% CO_2 에서 72시간 동안 더 인큐베이션할 것이다. MTS 테트라졸륨 생물환원 검정법을 사용하여, 세포 살해 및 종점 Ad5 NAb 역가를 측정할 것이다. 1:25 미만의 값을 가진 종점 역가는 0의 값으로 지정될 것이다.

[0327] 통계학

[0328] 면역 반응을 비교하는 통계학적 분석을, 만-휘트니(Mann-Whitney) 시험(PRISM, Graph Pad)을 이용하여 수행할 것이다. 생존율 비교는 카플란-마이어 플롯(PRISM, Graph Pad)을 이용하여 수행할 것이다. Ad5 NAb 역가 및 EA-특이적 CMI는 연속 변량으로서 분석될 것이다. Ad5 NAb 역가와 EA-특이적 CMI의 변화의 연관성을 스피어만 상관 계수를 이용하여 시험할 것이다. Ad5 NAb 역가와 생존율의 연관성을 비례 위험 모형의 왈드 시험(Wald test)을

이용하여 시험할 것이다.

[0329] 2차 목적은 생성물을 이용한 면역화 치료 후 EA 특이적인 면역 반응을 평가하는 것일 것이다.

[0330] 수지상 세포는 에볼라 감염된 피험체의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 발생될 것이며; 백신접종-후 이 환자의 PBMC를 사용하여, EA에 특이적인 개별 T-세포주를 구축하려고 할 것이다. 간략하게는, PBMC를 림프구 분리 배지 구배를 사용하여 분리하고, AIM-V 배지(2×10^7 개 세포)에 재현탁화한 다음, 6-웰 플레이트에 부착하도록 2 시간 동안 놔둘 것이다. 부착성 세포를 100 ng/mL의 재조합 인간(rh) GM-CSF 및 20 ng/mL의 rhIL-4를 함유하는 AIM-V 배지에서 5일 동안 배양할 것이다. 배양 배지를 3일마다 새 것으로 교환할 것이다.

[0331] **실시예 3: 임상 등급의 다중-표적화된 백신의 GLP 생성**

[0332] 이 실시예는 양호한 실험실 수행(GLP) 표준을 사용하여 임상-등급 다중-표적 백신의 생성을 보여준다. 이전에, Ad5[E1-, E2b-]-CEA(6D) 생성물을 양호한 제조 수행 표준에 따라 GLP 조건 하에 5 L 세포 생물반응기를 사용하여 생성하였다. 이 실시예는, Ad5[E1-, E2b-]-EA 생성물 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및 L이 유사한 접근법을 사용하여 5 L 세포 생물반응기에서 생성될 수 있음을 보여줄 수 있다.

[0333] 간략하게는, E.C7 제조 세포주의 바이알을 해동시키고, T225 플라스크로 옮긴 다음, 처음에는 10% FBS/4 mM L-글루타민을 함유하는 DMEM에서 37°C, 5% CO₂에서 배양할 것이다. 증식 후, E.C7 세포를 10-층 CELLTACKS(CS-10)를 사용하여 증식시키고, FreeStyle 혈청-무함유 배지(SFM)로 옮길 것이다. E.C7 세포를 SFM에서 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 세포 생물반응기 내 5×10^5 개 세포/mL의 표적 농도까지 배양할 것이다. 그런 다음, E.C7 세포를 각각 Ad5[E1-, E2B-]-GP, Ad5[E1-, E2B-]-NP, Ad5[E1-, E2B-]-VP40, Ad5[E1-, E2B-]-VP35, Ad5[E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24, 및/또는 [E1-, E2b-]-L을 사용하여 감염시키고, 48시간 동안 배양할 것이다.

[0334] 중간-스트림 공정을, 임상 등급 Ad5[E1-, E2B-]-GP, Ad5[E1-, E2B-]-NP, Ad5[E1-, E2B-]-VP40, Ad5[E1-, E2B-]-VP35, Ad5[E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24, 및/또는 [E1-, E2b-]-L 생성물을 제조하는 데 사용된 것과 동일한 방식으로 수행할 것이다. 수확 전 30분째에, 벤조나제 뉴클레아제를 배양물에 첨가하여, 농축을 위해 보다 양호한 세포 펠렛화를 촉진할 것이다. 원심분리에 의해 펠렛화한 후, 상층액을 폐기하고, 펠렛을 1% 폴리소르베이트-20을 함유하는 완충제에 실온에서 90분 동안 재현탁할 것이다. 그런 다음, 용해물을 벤조나제로 처리하고, 5 M NaCl을 첨가하여 반응을 중단시킬 것이다. 슬러리를 원심분리하고, 펠렛을 폐기할 것이다. 용해물을 여과에 의해 정제하고, 2-컬럼 이온 교환 절차로 처리할 것이다.

[0335] 백신 생성물을 정제하기 위해, 2-컬럼 음이온 교환 절차를 수행할 것이다. 제1 컬럼을 Q Sepharose XL 수지로 패킹하고, 살균한 다음, 로딩 완충제를 이용하여 평형화할 것이다. 정제된 용해물을 컬럼 상으로 로딩하고, 로딩 완충제로 세척할 것이다. 백신 생성물을 용리하고, Ad5[E1-, E2B-]-GP, Ad5[E1-, E2B-]-NP, Ad5[E1-, E2B-]-VP40, Ad5[E1-, E2B-]-VP35, Ad5[E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24, 및/또는 [E1-, E2b-]-L을 함유하는 주요 용리 피크(용리물)를 다음 단계로 수행할 것이다. 제2 컬럼에 Source 15Q 수지를 패킹하고, 살균한 다음, 로딩 완충제를 사용하여 평형화할 것이다. 제1 음이온 교환 컬럼 유래의 용리물을 제2 컬럼 상에 로딩하고, 백신 생성물을 100% 완충제 A(20 mM Tris, 1 mM MgCl₂, pH 8.0)에서 출발하여 50% 완충제 B(20 mM Tris, 1 mM MgCl₂, 2 M NaCl, pH 8.0)로 진행하는 구배에서 용리할 것이다. Ad5[E1-, E2B-]-GP, Ad5[E1-, E2B-]-NP, Ad5[E1-, E2B-]-VP40, Ad5[E1-, E2B-]-VP35, Ad5[E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24, 및/또는 [E1-, E2b-]-L을 함유하는 용리 피크를 수집하고 2°C 내지 8°C에서 밤새 저장할 것이다. 피크 용리 분획을 농축 및 제형 완충제(20 mM Tris, 25 mM NaCl, 2.5% (v/v) 글리세롤, pH 8.0)에 대한 투석여과를 위해 접선 유동 여과(tangential flow filtration; TFF) 시스템을 통해 처리할 것이다. 가공 후, 최종 백신 생성물을 멸균 여과하고, 분취물로 분배하고, -60°C 이하에서 보관할 것이다. 100% 순도로 근접하는 고도로 정제된 생성물이 전형적으로 생성되고, 이들 생성물에 대한 유사한 결과를 예측한다.

[0336] 생성된 VP 생성물의 농도 및 총 수를 분광 광도법에 의해 확인할 것이다. 생성물 순도를 HPLC에 의해 평가할 것이다. 감염성 활성을, 키트를 사용하여 감염성 입자에 대한 Ad5 핵소-염색 검정법을 수행함으로써 확인할 것이다.

[0337] 웨스턴 블롯을 벡터 형질감염된 세포로부터의 용해물을 사용하여 수행하여, EA 발현을 입증할 것이다. 품질 관리 시험을 수행하여, 최종 백신 생성물이 미코플라즈마-무함유이며 미생물 생물부담(bioburden)을 갖고 있지 않고 1 mL 당 2.5 내독소 단위(EU) 미만의 내독소 수준을 나타냄을 확인할 것이다. 면역원성을 확인하기 위해, 개

별 백터를 마우스에서 시험할 것이다.

[0338] **실시예 7: 단일-표적화된 및 다중-표적화된 GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24, L 바이러스 백터의 면역원성**

[0339] 암컷 C57BL/6 마우스에게 10^{10} 개 VP의 Ad5[E1-, E2B-]-GP, Ad5[E1-, E2B-]-NP, Ad5[E1-, E2B-]-VP40, Ad5[E1-, E2B-]-VP35, Ad5[E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24 또는 [E1-, E2b-]-L, 또는 1:1:1 비율의 2개 이상의 바이러스들의 10^{10} 개 VP의 조합을 피하 주사할 것이다. 대조군 마우스에게 3×10^{10} 개 VP의 Ad-닐(전이유전자 삽입물 없음)을 주사할 것이다. 용량을 25 μ L의 주사 완충제(3% 수크로스를 함유하는 20 mM HEPES)에서 투여할 것이고, 마우스를 14일 간격으로 3회 백신접종할 것이다. 마지막 주사 후 14일째에 비장 및 혈청을 수집할 것이다. 혈청을 -20°C 에서 동결시킬 것이다. 비장을 70 μ M 나일론 세포 여과기(BD Falcon, San Jose, CA)를 통해 부드럽게 으개어서, 비장세포 현탁액을 발생시킬 것이다. 적혈구 용해 완충제(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 첨가하여 적혈구를 제거할 것이고, 비장세포를 2회 세척하고, R10(L-글루타민(2 mM), HEPES(20 mM), 페니실린 100 U/mL 및 스트렙토마이신 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 및 10% 태아 소 혈청이 보충된 RPMI 1640)에 재현탁화할 것이다. 비장세포를 ELISPOT 및 유세포분석에 의해 사이토카인 생성에 대해 검정할 것이다.

[0340] 면역원성 연구:

[0341] 마지막 면역화 후 2주째에, 비장세포를 EA 펩타이드 풀에 노출시킨 후, CMI 활성을 IFN- γ 분비 세포(SFC)에 대한 ELISpot 검정법을 이용하여 확인할 것이다.

[0342] 간략하게는, IFN- γ 분비 비장세포(SFC)에 대한 ELISpot 검정법에 의해 평가된 바와 같이 EA에 대한 CMI 반응을 대조군 마우스(Ad5-닐 빈 백터가 주사됨)에서가 아니라 다중-표적화된 면역화된 마우스에서 검출될 것이다. ELISPOT 검정법 반응의 특이성은 SIV-nef 또는 SIV-vif 펩타이드 항원과 관계없이 반응성의 결여에 의해 확인될 것이다. 양성 대조군은 콘카나발린 A(Con A)에 노출된 세포를 포함할 것이다.

[0343] ELISPOT 검정법

[0344] GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L-특이적 IFN- γ -분비 또는 IL-2-분비 T 세포를 새로 단리된 마우스 비장세포로부터 ELISPOT 검정법에 의해 확인할 것이다. 간략하게는, 2×10^5 개 비장세포를, GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 또는 L로부터 유래된 단일 풀에서 오버래핑 15-량체 펩타이드 0.2 μg /웰을 사용하여 자극시킬 것이다. 세포를 양성 대조군으로서 1개 웰 당 0.0625 μg 농도의 Con A를 사용하여 자극시킬 것이고, SIV-Nef 및 SIV-Vif로부터 유래된 오버래핑 15-량체 완전 펩타이드 풀을 관계없는 펩타이드 대조군으로서 사용할 것이다. SFC의 수를, 면역스팟 ELISPOT 플레이트 판독기를 사용하여 확인할 것이고, 그 결과를 10^6 개 비장세포 당 SFC의 수로서 기록할 것이다. 보완 의존적 세포의 세포독성(CDCC)의 수준을 확인하기 위해, CDCC 시험을 EA 표적 세포를 사용하여 수행할 것이다.

[0345] 세포내 사이토카인 자극

[0346] 비장세포를 제조할 것이다. 자극 검정법을, 96-웰 U-바닥 플레이트에서 1개 웰 당 1×10^6 개의 살아 있는 비장세포를 사용하여 수행할 것이다. GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24 및 L의 전체 코딩 서열을 스패닝(spanning)하는 오버래핑 펩타이드의 풀을 11-아미노산 오버랩을 가진 15-량체로서 합성할 것이고, 동결된 펩타이드 풀을 DMSO에 용해시킬 것이다. SIV-Vif 및 SIV-Nef에 상응하는 유사하게 구축된 펩타이드 풀은 오프-표적 대조군으로서 역할을 할 것이다. R10 배지(RPMI 1640, 10% 태아 소 혈청 및 항생제) 내 비장세포를, 37°C 및 5% CO_2 에서 6 시간 동안 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ /펩타이드로 펩타이드 풀을 첨가함으로써 자극시킬 것이고, 단백질 수송 저해제(GolgiStop)를 2시간 동안 인큐베이션 내에 첨가할 것이다. 그런 다음, 자극된 비장세포를 림프구 표면 마커 CD8 α 및 CD4에 대해 염색하고, 고정하고, 침투시킨 다음, IFN- γ 및 TNF α 의 세포내 축적에 대해 염색할 것이다. 마우스 CD8 α , CD4, IFN- γ 및 TNF α 에 대한 항체를 사용할 것이고, 염색을 항-CD16/CD32의 존재 하에 수행하였다. 유세포 분석을 수행할 것이고, BD Accuri C6 소프트웨어에서 분석할 것이다.

[0347] 보완-의존적 세포독성 검정법(CDCC)

[0348] EA 세포를 96-웰 조직 배양 마이크로플레이트에서 1개 웰 당 2×10^4 개 세포의 밀도로 밤새 배양할 것이다. 폴링된 열 불활성화된 마우스 혈청을 1:50 희석으로 첨가하고, 37°C 에서 1시간 동안 인큐베이션할 것이다. 그런 다음, 토끼 혈청을 보완 소스로서 1:50 희석으로 첨가할 것이고, 세포를 37°C 에서 2.5시간 더 인큐베이션할 것이며, 세포 배양 상층액을 Promega Cytotox 96 비-방사성 세포독성 검정법을 제조업체의 지침에 따라 사용하여 검

정할 것이다. EA 세포의 용해%를 식 용해% = (실험적 - 표적 자발적) / (표적 최대 - 표적 자발적) x 100%에 의해 계산할 것이다.

[0349] 항-에볼라 면역요법 연구:

[0350] 연구를 수행하여, 에볼라 감염이 구축된 마우스에서 면역요법 연구에서 Ad5[E1-, E2b-]-기반 다중-백신의 항-에볼라 능력을 시험할 것이다. 이 연구에서, Ad5[E1-, E2b-]-기반 다중-백신의 개별 성분의 항-에볼라 활성을 평가할 것이다.

[0351] C57B1/6 마우스 그룹의 우측 옆구리에 5×10^5 개의 EA 발현 세포를 피하 주사할 것이다. 마우스를 각각 1×10^{10} 개 VP의 Ad5[E1-, E2b-]-널(전이유전자 없음, 예를 들어 빈 벡터), Ad5[E1-, E2B-]-GP, Ad5[E1-, E2B-]-NP, Ad5[E1-, E2B-]-VP40, Ad5[E1-, E2B-]-VP35, Ad5[E1-, E2b-]-VP30, [E1-, E2b-]-VP24 및 [E1-, E2b-]-L을 각각 3회 피하 주사함으로써 치료할 것이다.

[0352] **실시예 8: 백신 표적으로서 에볼라 바이러스 GP 및 NP의 용도.**

[0353] GP 및/또는 NP를 비롯한 에볼라 바이러스 유전자 성분을 함유하는 보다 이른 세대의 재조합 Ad5 기반 벡터 (Ad5[E1-]) 백신이 실험실 설정에서 구축, 생성 및 시험되어 왔다. 유망한 예비-임상 보호 효과가 마우스 및 비-인간 영장류(NHP)에서 이들 백신을 사용하여 획득되었으나, 동물이 아데노바이러스에 대한 기존 면역 또는 Ad5 벡터 유도된 면역을 나타낸 경우 그 효능은 무력화되었다.

[0354] 이 실시예에서, 에볼라 바이러스의 GP 및 NP 성분이 백신에 사용될 것이다. 자이르 균주 및 수단 균주가 대부분의 종-특이적인 사례 사망물에 책임이 있기 때문에, 이들 2개 균주의 바이러스 성분을 처음에 사용할 것이다. GP는, 이것이 표적화될 수 있는 표면 당단백질이기 때문에 이용될 것이다. 에볼라의 2개의 단리된 균주 유래의 GP 유전자가 에볼라에 대한 광범위한 반응성 면역 반응을 유도하는 데 사용될 것이다. NP는 VP35, VP30, 및 기능성 전사효소-레플리카제 복합체로의 RNA-의존적 RNA 폴리머라제에 연관이 있기 때문에, 이는 바이러스 복제를 방해하고/거나 예방하는 면역 반응을 유도하기 위한 백신에 사용될 것이다. 이러한 방식으로, 에볼라에 대해 체액성 면역 및 세포 매개성 면역(CMI) 반응을 유도할 Ad5[E1-, E2b-] 플랫폼을 기반으로 한 광범위하게 반응성인 백신이 개발될 것이다.

[0355] 백신으로서의 재조합 Ad5[E1-, E2b-]-기반 벡터의 용도

[0356] 백신은 항원-제시 세포(APC)에의 한정된 에볼라 항원의 노출을 위해 피하 주사에 의해 직접 전달되어, 강력한 면역 반응을 유도할 것이다.

[0357] Ad5[E1-, E2b-]-기반 벡터 에볼라 백신의 증폭

[0358] 4개의 Ad5[E1-, E2b-]-기반 백신을 구축하였다(도 8). 자이르 균주 백신에 있어서, 현재 발병된 GP 및 NP의 뉴클레오타이드 서열(자이르 에볼라 바이러스 단리물 H.sapiens-wt/GIN/2014/Gueckedou-C07, GeneBank accession # KJ660347)을 인간 코돈 사용빈도로 최적화하고, CMV 프로모터의 조절 하에 Ad5[E1-, E2b-] 벡터 내로 클로닝하였다. 아데노바이러스 E1 및 E2b 유전자를 안정하게 발현하는 E.C7 세포를 선형화된 Ad5[E1-, E2b-] 플라스미드 구축물로 형질감염시키고, Ad5[E1-, E2b-]-GP_{EZ} 생성물 및 Ad5[E1-, E2b-]-NP_{EZ} 생성물을 생성함으로써 바이러스 입자를 획득하였다.

[0359] 수단 균주 백신을 위해, 수단 균주의 에볼라 바이러스의 GP 및 NP의 뉴클레오타이드 서열(수단 에볼라 바이러스 단리물 EboSud-682 2012, 완전 게놈 GenBank: KC545392.1)을 인간 코돈 사용빈도로 최적화하고, CMV 프로모터의 조절 하에 Ad5[E1-, E2b-] 벡터 내로 클로닝하였다. 아데노바이러스 E1 및 E2b 유전자를 안정하게 발현하는 E.C7 세포를 선형화된 Ad5[E1-, E2b-] 플라스미드 구축물로 형질감염시키고, Ad5[E1-, E2b-]-GP_{ES} 생성물 및 Ad5[E1-, E2b-]-NP_{ES} 생성물을 생성함으로써 바이러스 입자를 획득하였다.

[0360] 재조합 Ad5[E1-, E2b-]-기반 백신의 생성, 정제 및 시험.

[0361] NP를 이용한 이후의 연구를 위해 부가적인 백신을 제조할 것이다. E.C7 세포주는 Ad5[E1-, E2b-] 벡터가 높고 재현 가능한 수율로 성장할 수 있도록 한다. Ad5[E1-, E2b-] 벡터는, Triton X-100을 사용하여 E.C7 인간 세포로부터의 방출, CsCl 구매 또는 이온 교환 크로마토그래피에 의한 정제, 및 5% 수크로스를 함유하는 20 mM HEPES(pH 7.4)에 대한 투석에 의해 제조되고 생성될 것이다. 정제된 재조합 Ad5[E1-, E2b-]-기반 바이러스 백신은 분취될 것이고, 건조 얼음-에탄올 배스에서 동결될 것이다. 바이러스 입자의 감염성은 플라크 검정법을 사용

하여 측정된다. 바이러스 입자(VP) 농도는 260 nm에서의 흡광도로부터 계산되고, 생체내 면역화를 위한 바이러스의 양을 확인하는 데 사용될 것이다. 형질감염된 A549 세포 용해물로부터의 웨스턴 블롯은 항원 전이유전자 발현을 입증할 것이다. Ad5[E1-, E2b-]-GP_{EZ}를 사용한 24시간 형질감염 후 E.C7 세포의 세포 용해물에서의 에볼라 GP(자이르 균주) 발현의 예가 도 9에 도시되어 있다.

[0362] 용량 확대 면역원성 연구

[0363] 이들 연구를 임상적으로 관련 있는 Ad5 면역 마우스 모델을 사용하여 수행할 것이다. BALB/c 마우스를 10¹⁰개 VP의 Ad5-넬을 2주 간격으로 2회의 피하 주사에 의해 Ad5-면역시킬 것이다. 제2 주사 후 2주째에, Ad5 중화 Ab(NAb)에 대해 혈청을 시험하여, 마우스가 Ad5-면역되었는지 입증할 것이다. 이러한 방식으로 시험된 마우스 및 원숭이는 1/100 내지 1/200의 Ad5 NAb 역가를 달성하고, 임상 시험에서, 모든 환자들 사이에서 기존의 Ad5 NAb 역가 평균은 1:189±1:71(평균 ± SEM)이었다. 증가하는 용량의 Ad5[E1-, E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ} 및 Ad5[E1-, E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES}(동등하게 조합된 혼합물)에 의한 면역화 후 유도되는 면역 반응을 평가할 것이다. Ad5 면역 마우스 그룹(n=5/그룹)은 상승하는 용량의 4x10⁸개, 4x10⁹개 또는 4x10¹⁰개 VP(동일한 양의 Ad5[E1-, E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ} 및 Ad5[E1-, E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES}를 함유하는 백신 혼합물)를 사용하여 2주마다 피하 경로에 의해 2회 면역화될 것이다. 대조군 마우스(n = 5)에게 4x10¹⁰개 VP의 Ad5[E1-, E2b-]-넬을 동일한 스케줄로 주사할 것이다. 최종 면역화 후 14일째에, 항체(Ab) 및 세포 매개성 면역(CMI) 반응을 평가할 것이다. CMI 평가를 위해, 개별 마우스의 비장세포를 이전에 기재된 ELISPOT 검정법을 사용하여 평가하여, GP 또는 NP 펩타이드 풀에 노출된 후의 인터페론-γ (IFN-γ) 및 IL-2-분비 림프 세포의 수를 측정할 것이다. 혈청 시료를 상업적으로 입수 가능한 정제를 사용하여 Ab 활성에 대해 평가할 것이다.

[0364] 최고 면역원성 용량을 사용하여, 1개 또는 2개의 피하 면역화를 이용하는 연구를 수행하여, 1개 또는 2개의 용량이 효과적인 백신접종에 필요한지 확인할 것이다. 마우스 그룹(n=5/그룹)에게 가장 효과적인 용량의 백신을 사용하여 2주마다 1회 또는 2회 면역화할 것이다. 대조군 마우스(n = 5)에게 Ad5[E1-, E2b-]-넬(백신과 동일한 양의 VP)을 동일한 스케줄로 주사할 것이다. 최종 면역화 후 14일째에, Ab 및 CMI 반응을 상기 기재된 바와 같이 평가할 것이다. 이들 연구는, 1개 또는 2개의 면역화가 유의한 면역 반응을 유도하는 데 필요한지 또는 필요하지 않은지 확인시켜 줄 수 있다.

[0365] Ad5 면역 마우스에서 ELISA, ELISpot 및 유세포 분석에 의한 면역원성 연구

[0366] 이들 연구를 위해, 상기 확인된 백신접종의 가장 효과적인 용량 및 빈도가 사용될 것이다. 원숭이에서 인플루엔자 백신을 이용한 개념 증명 연구에서, 혈구응집 저해(HAI) 검정법에 의해 평가된 바와 같은 Ab 반응은 최대 수준을 발달시키는 데 최대 30일이 필요할 것으로 관찰되었다(도 9). 따라서, 피하 백신접종 후 2주, 30일 및 60일째에 Ad5-면역 BALB/c 마우스(n=5/그룹)에서 Ab 활성 및 CMI 반응이 백신접종(동일한 양의 Ad5[E1-, E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ} 및 Ad5[E1-, E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES}를 함유하는 백신 혼합물)의 가장 효과적인 용량 및 빈도와 함께 평가될 것이다. 대조군 마우스에게 Ad5[E1-, E2b-]-넬(백신과 동일한 VP 양)을 동일한 스케줄로 주사할 것이다. 백신접종 후 2주, 30일 또는 60일째에, 혈청 및 비장 세포를 개별 마우스로부터 수집할 것이다. 개별 마우스의 비장세포를, ELISPOT 검정법을 사용하여 CMI 반응에 대해 평가하여, GP 또는 NP 펩타이드 풀에 노출 후 IFN-γ 및 IL-2 분비 림프 세포의 수를 측정할 것이다. 세포독성 T 림프구(CTL) 반응이 또한, 백신 평가에 중요할 수 있기 때문에, 그랜자임 B 분비를 GP 또는 NP 펩타이드 풀에 노출된 후의 비장세포 상에서 ELISPOT 검정법에 의해 CTL 활성에 대해 분석할 것이며, 이러한 ELISPOT 검정법은 CD8 기능성 CTL 활성을 측정하기 위한 양호한 검정법이기 때문이다. 혈청 시료는 ELISA 기술을 이용하는 상업적으로 입수 가능한 정제된 에볼라 바이러스 단백질에 대한 Ab 활성에 대해 평가될 것이다. 바이러스 중화 활성에 있어서, 플라크 환원 중화 검정법 또한, 개별 마우스 유래의 혈청 상에서 수행될 것이다.

[0367] 최고 CMI 반응이 관찰되는 상기 연구를 기반으로, 유세포 분석 연구 또한 수행되어, 백신을 이용한 면역화에 의해 유도되는 T-세포 면역 반응을 특징구명할 것이다. Ad5-면역 BALB/c 마우스(n = 5)는 백신접종의 가장 효과적인 용량 및 빈도를 사용하여 백신에 의해 면역화될 것이다. 대조군 마우스(n = 5)에게 Ad5[E1-, E2b-]-넬(백신과 동일한 VP 양)을 동일한 스케줄로 주사할 것이다. 백신접종 후 최적의 시간을 기반으로, 비장을 수집할 것이고, GP 또는 NP 펩타이드 풀에 노출된 후 IFN-γ 분비 세포 및/또는 TNF-α 분비 세포에 대한 유세포 분석에 의해 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포를 확인할 것이다. 간략하게는, 면역화된 마우스 및 대조군 마우스 유래의 비장

세포를 수집하고, 단백질 수송 저해제인 GolgiStop의 존재 하에 0.5 mg/ml의 GP 또는 NP 펩타이드 풀과 함께 5 시간 동안 인큐베이션할 것이다. 그런 다음, CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포를 고정하고, 침투시킨 다음, IFN- γ 또는 TNF- α 에 대해 염색한 다음, 유세포 분석에 의해 분석할 것이다.

[0368] 바이러스 시도에 대한, 백신접종된 Ad5 면역 마우스의 보호

[0369] 원리 증명 시험에서, 시도 연구를 마우스에서 수행할 것이다. 2개 그룹의 BALB/c 마우스(n=15/그룹)을 상기 기재된 바와 같이 Ad5-면역화시킬 것이다. 백신접종의 가장 효과적인 용량 및 빈도를 사용하여, 하나의 그룹을 백신(동일한 양의 Ad5[E1-, E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ} 및 Ad5[E1-, E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES}를 함유하는 백신 혼합물)을 사용하여 면역화시킬 것이다. 대조군에게 Ad5[E1-, E2b-]-널(백신과 동일한 VP 양)을 동일한 스케줄로 주사할 것이다. 유도된 바이러스 중화 역가가 달성되는 경우, 마우스는 치사 마우스 적응된 균주의 에볼라를 접종함으로써 시도될 것이다. 종점에 대하여 체중 감량 및 사망까지의 시간을 모니터링할 것이다. 시도 후 21일에 걸쳐 이환율의 임상 징후에 대해 마우스를 매일 관찰할 것이다.

[0370] 2기 연구

[0371] 2기 연구에서, NHP에서 에볼라 백신의 면역원성을 평가할 것이다. 적절한 면역화 용량, 부스팅 스케줄 및 살아 있는 에볼라 시도 잠재성이 확인될 것이다. 또한, 자이르 및 수단 균주의 에볼라 바이러스 유래의 융합된 GP 유전자 및 NP 유전자를 함유하는 Ad5[E1-, E2b-]-기반 플랫폼을 평가할 것이다. 이러한 방식으로, 2개의 제조합 벡터, Ad5[E1-, E2b-]-GP_{EZ}/NP_{EZ} 생성물 및 Ad5[E1-, E2b-]-GP_{ES}/NP_{ES} 생성물이 생성될 것이다. 다수의 유전자들을 하나의 제조합 Ad5[E1-, E2b-]-기반 벡터 내에 도입함으로써, 요구되는 바이러스 입자의 수는 4개의 개별 제조합 벡터를 각각 생성하고 조합하는 것과 비교하여 상당히 감소될 것이다.

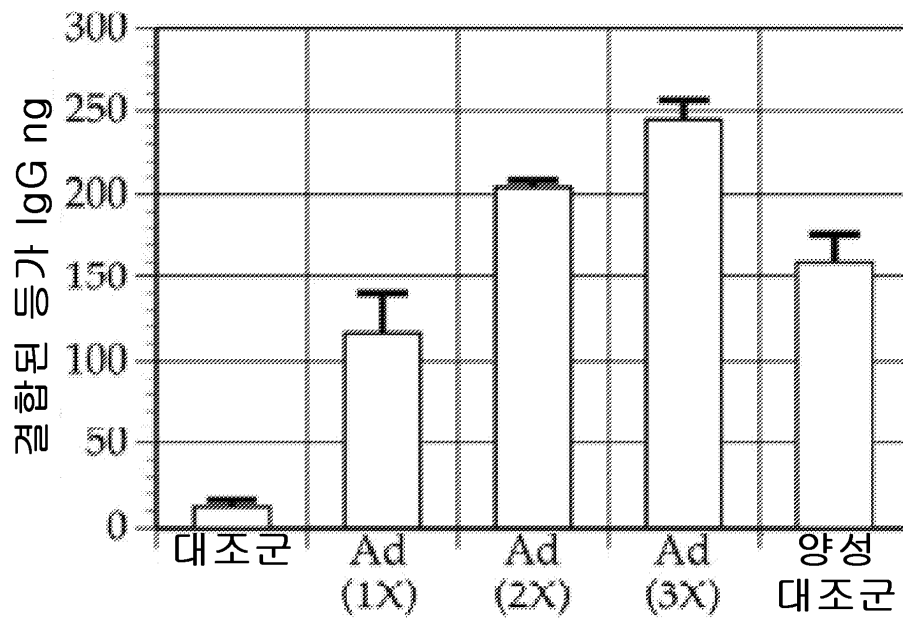
[0372] 상기 기재된 다양한 실시형태들은 조합되어, 추가의 실시형태를 제공할 수 있다. 본 명세서에서 지칭되고/거나 출원 데이터 시트에 열거된 모든 미국 특허, 미국 특허 출원 공개, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및 비-특허 공개는, 각각의 개별 공개, 특허 또는 특허 출원이 인용에 의해 구체적으로 그리고 개별적으로 지시된 바와 동일한 범위로 그 전체가 인용에 의해 본 명세서에 포함되어 있다.

[0373] 실시형태의 양태는, 보다 추가의 실시형태를 제공하기 위해 다양한 특허, 출원 및 공개들의 개념을 이용하기 위해 필요하다면 변형될 수 있다.

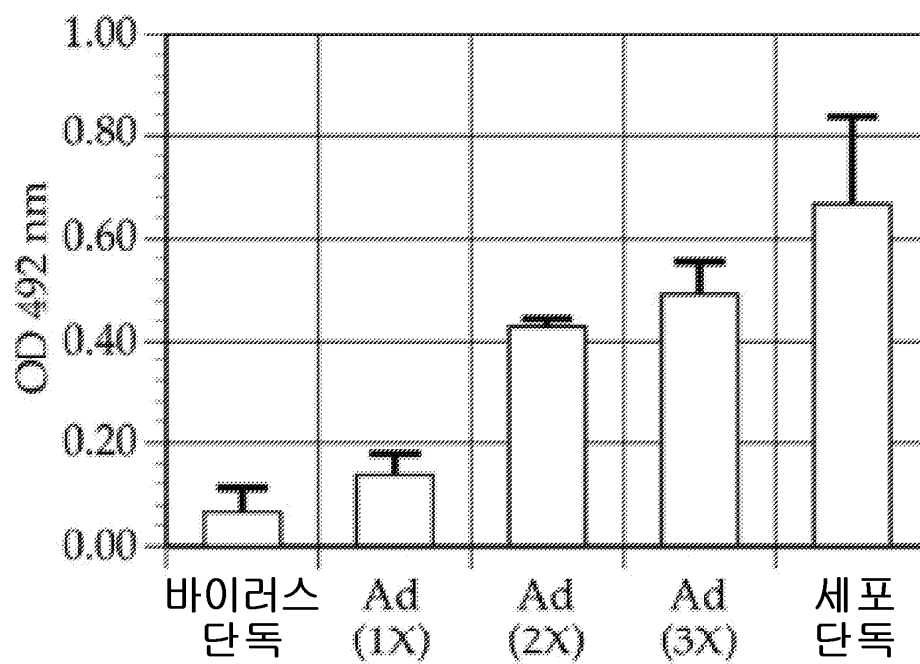
[0374] 이들 변화 및 다른 변화들은 상술한 설명의 측면에서 실시형태에 이루어질 수 있다. 일반적으로, 하기 청구항에서, 사용된 용어는 청구항을 명세서 및 청구항에서 개시된 특정 실시형태로 제한하는 것으로 간주되어서는 안 되며, 그보다는 이러한 청구항이 나타내는 증가물의 전체 범위와 함께 모든 가능한 실시형태들을 포함하는 것으로 간주되어야 한다. 이에, 청구항은 개시내용에 의해 제한되지 않는다.

도면

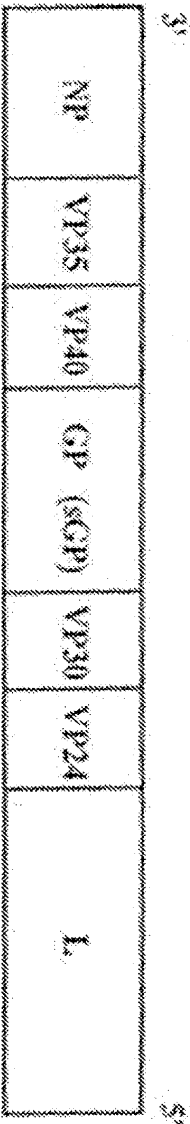
도면1



도면2



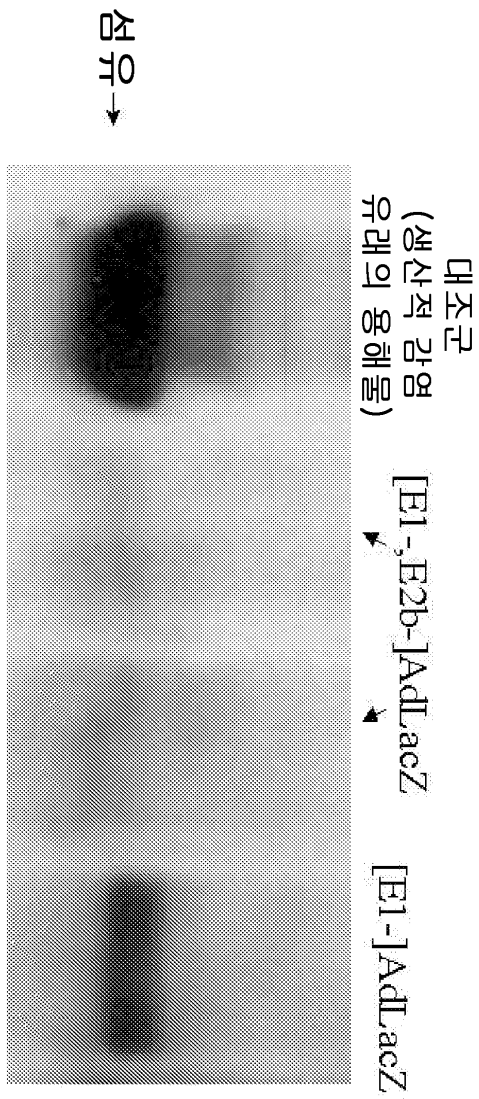
에볼라 바이러스 게놈의 구성



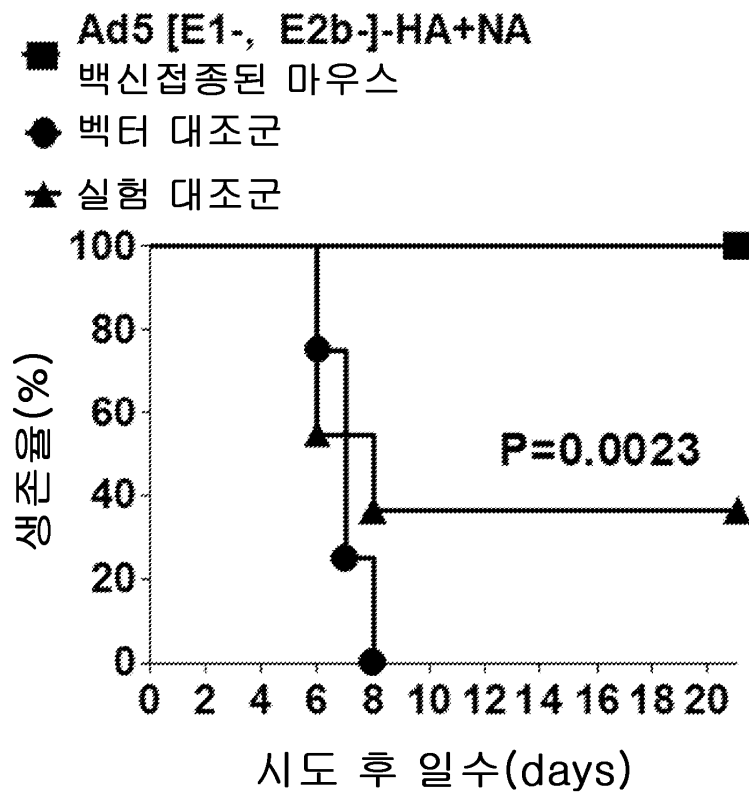
- NP 주요 뉴클레오타이드 단백질
- VP35 인단백질
- VP40 막-연관 기질 단백질
- GP 막관통 당단백질
- SGP 분비된 당단백질
- VP30 연관된 리보뉴클레오타이드 단백질 (부(minor))
- VP24 막-연관된 단백질 (부)
- L RNA-의존적 RNA 폴리머라제

도면3

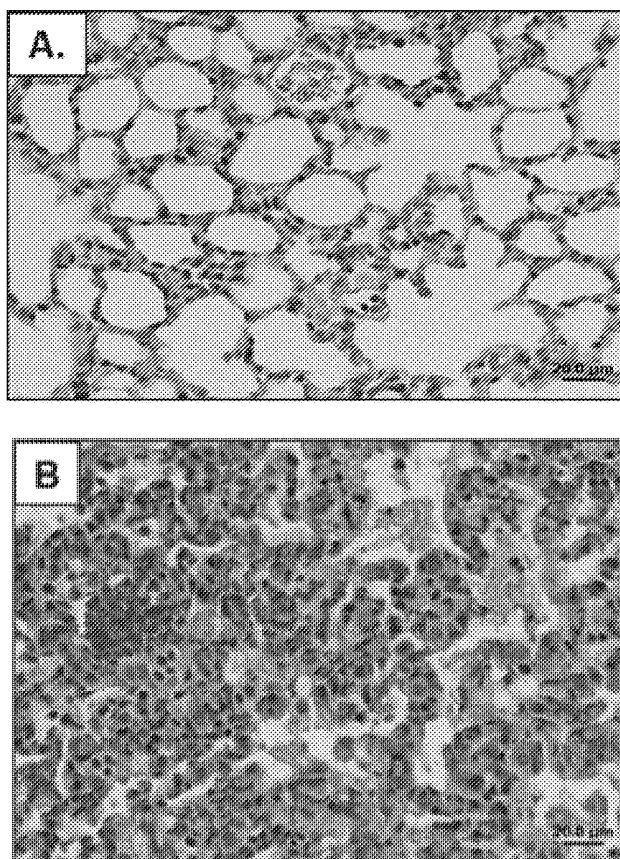
도면4



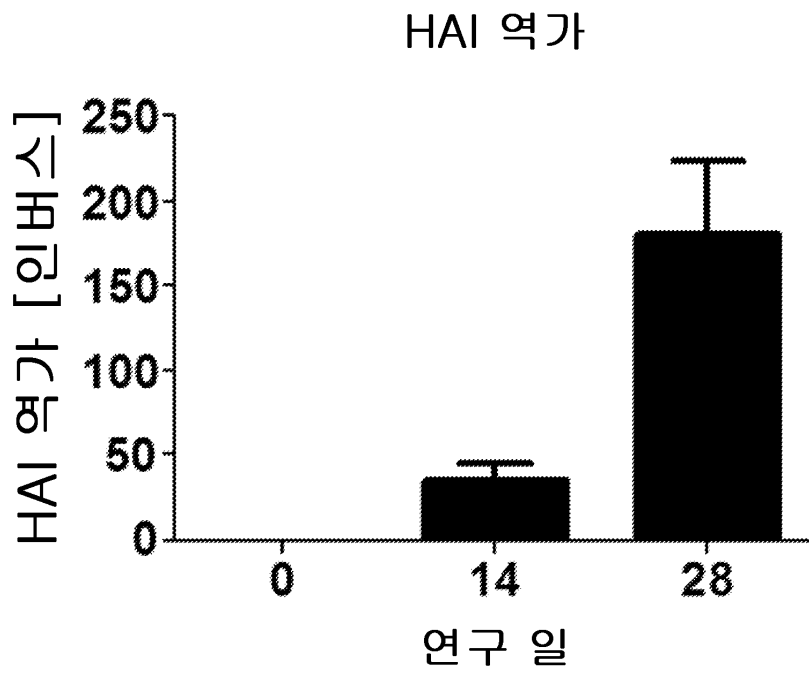
도면5



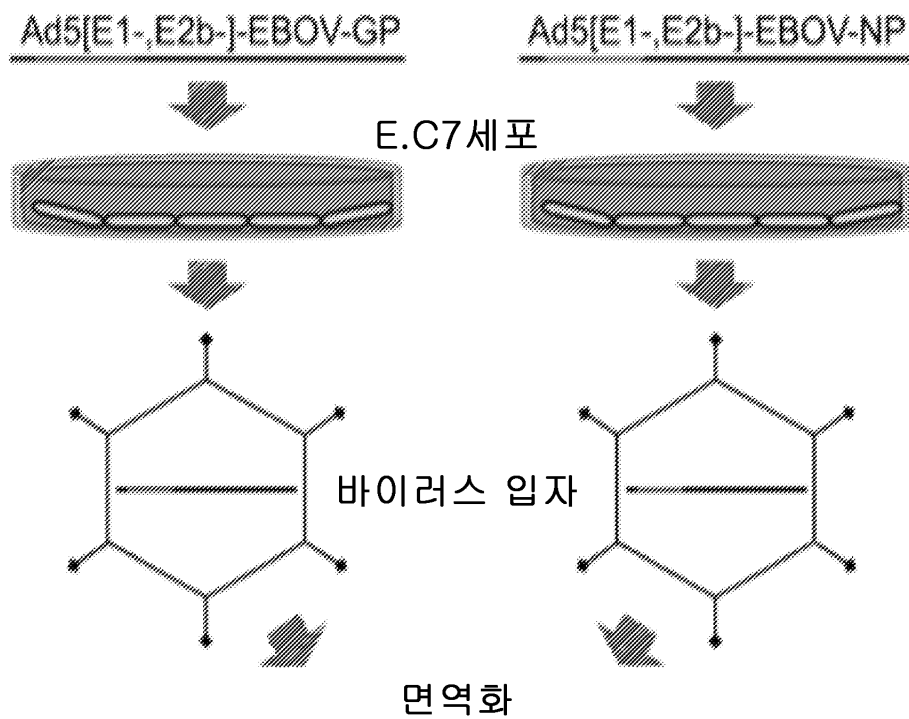
도면6



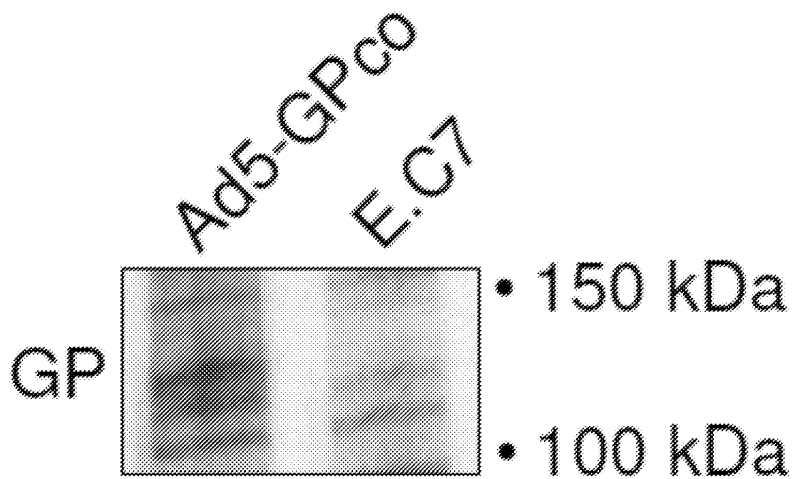
도면7



도면8



도면9



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ETUBICS CORPORATION

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR EBOLA VIRUS VACCINATION

<130> 39891-715.601

<140> PCT/US2016/012482

<141> 2016-01-07

<150> 62/101,968

<151> 2015-01-09

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18959

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 1

cggacacaca aaaagaaaga agaattttta ggatcttttg tgtgcgaata actatgagga 60

agattaataa ttttcctctc attgaaattt atacggaat ttaaattgaa attgttactg 120

taatcatacc tggtttggtt cagagccata tcaccaagat agagaacaac ctaggtctcc 180

ggagggggca agggcatcag tgtgctcagt tgaaaatccc ttgtcaacat ctaggcctta 240

tcacatcaca agttccgcct taaactctgc agggatgatcc aacaacctta atagcaacat	300
tattgttaaa ggacagcatt agttcacagt caaacaagca agattgagaa ttaactttga	360
ttttgaacct gaacaccagc aggactggag actcaacaac cctaaagcct ggggtaaaac	420
attagaaata gtttaaagac aaattgctcg gaatcacaaa attccgagta tggattctcg	480
tcctcagaaa gtctggatga cgccgagtct cactgaatct gacatggatt accacaagat	540
cttgacagca ggtctgtccg ttcaacaggg gattgttcgg caaagagtca tcccagtgt	600
tcaagtaaac aatcttgagg aaatttgcca acttatcata caggcctttg aagctgggt	660
tgattttcaa gagagtgcgg acagtttctt tctcatgctt tgtcttcac atgcgtacca	720
aggagattac aaacttttct tggaaagtgg cgcagtcaag tatttggaag ggcacgggt	780
ccgttttgaa gtcaagaagc gtgatggagt gaagcgctt gaggaattgc tgccagcagt	840
atctagtggg agaaacatta agagaacact tctgcatatg ccggaagagg agacgactga	900
agctaatagcc ggtcagttcc tctcctttgc aagtctattc cttccgaaat tggtagtagg	960
agaaaaggct tgccttgaga aggttcaaag gcaaatcaa gtacatgcag agcaaggact	1020
gatacaatat ccaacagctt ggcaatcagt aggacacatg atggtgattt tccgtttgat	1080
gcgaacaaat tttttgatca aatttcttct aatacaccaa gggatgcaca tggttgccgg	1140
acatgatgcc aacgatgctg tgatttcaaa ttcagtggct caagctcgtt tttcaggtct	1200
attgattgtc aaaacagtac ttgatcatat cctacaaaag acagaacgag gatttcgtct	1260
ccatcctctt gcaaggaccg ccaaggtaaa aaatgaggtg aactccttca aggtgcact	1320
cagctccctg gccaaagcatg gagagtatgc tcttttcgcc cgacttttga acctttctgg	1380
agtaataat ctigagcatg gtcttttccc tcaactgtcg gcaattgcac tcggagtgcg	1440
cacagccac gggagcacc tcgcaggagt aaatgttga gaacagtatc aacagctcag	1500
agaggcagcc actgaggtcg agaagcaact ccaacaatat gcggagtctc gtgaacttga	1560
ccatcttga ctigatgatc aggaagaa aattcttatg aacttccatc agaaaagaa	1620
cgaaatcagc ttccagcaaa caaacgcgat ggtaactcta agaaaagagc gcctggccaa	1680
gtgacagaa gctatcactg ctgcatcact gcccaaaaca agtggacatt acgatgatga	1740
tgacgacatt ccctttccag gacctatcaa tgatgacgac aatcctggcc atcaagatga	1800
tgatccgact gactcacagg atacacat tcccgatgtg gtagttgatc ccgatgatgg	1860
aggctacggc gaatacaaaa gttactcgga aaacggcatg agtgcaccag atgacttgg	1920
cctattcgat ctagacgagg acgacgagga caccaagcca gtgcctaaca gatcgaccaa	1980
gggtggacaa cagaaaaaca gtcaaaaggg ccagcataca gagggcagac agacacaatc	2040
cacgccaact caaacgtca caggccctcg cagaacaatc caccatgcca gtgtccact	2100

cacggacaat gacagaagaa acgaaccctc cggctcaacc agccctcgca tgctgacccc	2160
aatcaacgaa gaggcagacc cactggacga tgccgacgac gagacgtcta gccttcgccc	2220
cttagagtca gatgatgaag aacaggacag ggacggaact tctaaccgca caccactgt	2280
cgccccaccg gctcccgtat acagagatca ctccgaaaag aaagaactcc cgcaagatga	2340
acaacaagat caggaccaca ttcaagaggc caggaaccaa gacagtgaca acaccagcc	2400
agaacattct tttagaggaga tgtatcgcca cattctaaga tcacaggggc catttgatgc	2460
cgttttgtat tatcatatga tgaaggatga gcctgtagtt ttcagtacca gtgatggtaa	2520
agagtacacg tatccggact ccttgaaga ggaatatcca ccatggctca ctgaaaaga	2580
ggccatgaat gatgagaata gatttgttac actggatggt caacaatttt attggccagt	2640
aatgaatcac aggaataaat tcatggcaat cctgcaacat catcagtga tgagcatgta	2700
ataatgggat gatttaacg acaaatagct aacattaaat agtcaaggaa cgcaaacagg	2760
aagaattttt gatgtctaag gtgtgaatta ttatcacaat aaaagtgatt cttagttttg	2820
aatttaaagc tagcttatta ttactagccg tttttcaaag ttcaatttga gtcttaatgc	2880
aaataagcgt taagccacag ttatagccat aatggtaact caatatctta gccagcgatt	2940
tatctaaatt aaattacatt atgcttttat aacttaccta ctagcctgcc caacatttac	3000
acgatcgttt tataattaag aaaaaactaa tgatgaagat taaaaccttc atcatcctta	3060
cgtcaattga attctctagc actagaagct tattgtcttc aatgtaaaag aaaagctggc	3120
ctaacaagat gacaactaga acaaagggca ggggccatac tgtggccacg actcaaacg	3180
acagaatgcc aggccctgag ctttcgggct ggatctctga gcagctaag accggaagga	3240
ttcctgtaaa cgacatcttc tgtgatattg agaacaatcc aggattatgc tacgcatccc	3300
aatgcaaca aacgaagcca aaccgaaga tgcgcaacag tcaaaccaa acggaccaa	3360
tttgcaatca tagttttgag gaggtagtagt aaacattggc ttcatggct actgttgtgc	3420
aacaacaaac catcgcatca gaatcattag aacaacgcat tacgagtctt gagaatggc	3480
taaagccagt ttatgatatg gcaaaaacaa tctctcatt gaacagggtt tgtgctgaga	3540
tggttgcaaa atatgatctt ctgggatga caaccggtcg ggcaacagca accgctgcgg	3600
caactgagge ttattgggct gaacatggc aaccaccacc tggacatca ctttatgaag	3660
aaagtgcgat tcggggtaag attgaatcta gagatgagac tgtccctcaa agtgtaggg	3720
aggcattcaa caatctagac agtaccactt cactaactga ggaaaatttt gggaaacctg	3780
acatttcggc aaaggatttg agaaacatta tgtatgatca cttgcctggt ttggaactg	3840

ctttccacca attagtacaa gtgatttgta aattgggaaa agatagcaat tcattggaca	3900
ttattcatgc tgagttccag gccagcctgg ctgaaggaga ctcccctcaa tgtgccctaa	3960
ttcaaattac aaaaagagtt ccaatcttcc aagatgctgc tccacctgic atccacatcc	4020
gtctctgagg tgacattccc cgagcttgcc agaagagctt gcgtccagtc ccaccatcac	4080
ccaagattga tcgaggttgg gtatgtgttt ttcagcttca agatggtaaa acacttggac	4140
tcaaaatttg agccaatctc ttttccctcc gaaagaggca actaatagca gaggttcaa	4200
ctgctgaact atagggtatg ttacattaat gatacacttg tgagtatcag ccctagataa	4260
tataagtcaa ttaacaacc aagataaaat tgttcatac ccgctagcag ctttaaagat	4320
aaatgtaata ggagctatac ctctgacagt attataatta attgttatta agtaacccaa	4380
accaaaaatg atgaagatta agaaaaacct acctcgactg agagagtgtt ttttcattaa	4440
ccttcactct gtaaacgttg agcaaaattg ttaaaaatat gaggcgggtt atattgccta	4500
ctgtcctcc tgaatatatg gaggccatat accctgccag gtcaaattca acaattgcta	4560
ggggtggcaa cagcaatata ggcttctga caccggagtc agtcaatgga gacactccat	4620
cgaatccact caggccaatt gctgatgaca ccatcgacca tgccagccac acaccaggca	4680
gtgtgtcatc agcattcatc ctggaagcta tggatgaatgt catatcgggc cccaaagtgc	4740
taatgaagca aattccaatt tggcttctc taggtgtcgc tgatcaaaag acctacagct	4800
ttgactcaac tacggccgcc atcatgcttg ctctatatac tatcacccat ttcggcaagg	4860
caaccaatcc gcttgtcaga gtcaatcggc tgggtcctgg aatcccggat cccccctca	4920
ggctcctgcg aattggaaac caggctttcc tccaggagtt cgttcttcca ccagtccaac	4980
tacccagta tttcaccttt gatttgacag cactcaaact gatcactcaa ccactgcctg	5040
ctgcaacatg gaccgatgac actccaactg gatcaaatgg agcgttgctt ccaggaattt	5100
catttcatcc aaaacttgc cccattcttt tacccaacaa aagtgggaag aagggaaca	5160
gtgccgatct aacatctccg gagaaaatcc aagcaataat gacttcactc caggacttta	5220
agatcgttcc aattgatcca accaaaaata tcatgggtat cgaagtgcc gaaactctgg	5280
tccacaagct gaccggtaag aaggtagctt ccaaaaatgg acaaccaatc atccctgttc	5340
ttttgcaaaa gtacattggg ttggaccggg tggtccagg agacctcacc atggtaatca	5400
cacaggattg tgacacgtgt catttctctg caagtcttcc agctgtggtt gagaagtaat	5460
tgcaataatt gactcagatc cagttttaca gaatcttctc agggatagtg ataacatctt	5520
tttaataatc cgtctactag aagagatact tctaattgat caatatacta aagggtcttt	5580
acaccattgt ctcttttctc tctaaatgt agagcttaac aaaagactca taatatacct	5640
gtttttaaaa gattgattga tgaaagatca tgactaataa cattacaaac aatcctacta	5700

taatcaatac ggigattcaa atgtcaatct ttctcattgc acatactctt tgccttatac	5760
ctcaaattgc ctacatgctt acatctgagg acagccagtg tgacttggat tggagatgtg	5820
gaggaaaaat cggggcccat ttctaagttg ttcacaatct aagtacagac attgctcttc	5880
taattaagaa aaaatcggcg atgaagatta agccgacagt gagcgtaatc ttcattcttc	5940
ttagattatt tgccttccag agtaggggtc atcaggtcct tttcaattgg ataacaaaaa	6000
taagcttcac tagaaggata ttgtgaggcg acaacacaat ggggtttaca ggaatattgc	6060
agttacctcg tgatcgattc aagaggacat cattctttct ttgggtaatt atccttttcc	6120
aaagaacatt ttccatcccg cttggagtta tccacaatag tacattacag gttagtgatg	6180
tcgacaaact agtttgcgt gacaaactgt catccacaaa tcaattgaga tcagttggac	6240
tgaatctcga ggggaatgga gtggcaactg acgtgccatc tgcgactaaa agatggggct	6300
tcaggtccgg tgtcccacca aaggtgggtca attatgaagc tggatgaatgg gctgaaaact	6360
gctacaatct tgaatcaaa aaacctgacg ggagtgagtg tctaccagca gcgccagacg	6420
ggattcgggg cttcccccg tgccggtatg tgcacaaagt atcaggaacg ggaccatgtg	6480
ccggagactt tgccttccac aaagaggggtg ctttcttct gtatgatcga cttgcttcca	6540
cagttatcta ccgaggaacg actttcgtg aaggtgtcgt tgcatcttctg atactgcccc	6600
aagctaagaa ggacttcttc agctcacacc ccttgagaga gccggtcaat gcaacggagg	6660
accctgcag tggtattat tctaccacaa ttagatatca ggctaccgtt ttggaacta	6720
atgagacaga gtacttgctc gaggttgaca atttgaccta cgtccaactt gaatcaagat	6780
tcacaccaca gtttctgctc cagctgaatg agacaatata tgcaagtggg aagaggagca	6840
acaccacggg aaaactaatt tggaagggtca accccgaaat tgatacaaca atcggggagt	6900
gggccttctg ggaactaaa aaaacctcac tagaaaaatt cgagtgag agttgtcttt	6960
cacagctgta tcaaacggac caaaaacat cagtgggtcag agtcgggcgc gaacttcttc	7020
cgaccagag accaacacaa caaatgaaga ccacaaaatc atggcttcag aaaattcctc	7080
tgcaatggtt caagtgcaca gtcaaggaag gaaagctgca gtgtcgcatc tgacaacct	7140
tgccacaatc tccacgagtc ctcaacctcc cacaacaaa acaggtccgg acaacagcac	7200
ccataatata cccgtgtata aacttgacat ctctgaggca actcaagttg gacaacatca	7260
ccgtagagca gacaacgaca gcacagctc cgacactccc cccgccacga ccgcagccgg	7320
acccttaaaa gcagagaaca ccaacacgag taagagcgct gactccctgg acctgccac	7380
cacgacaagc ccccaaaact acagcgagac tgctggcaac aacaacactc ataccaaga	7440
taccggagaa gagagtgcc gacgcgggaa gctaggttta attaccaata ctattgctgg	7500
agtagcagga ctgatcacag gcgggagaag gactcgaaga gaagtaattg tcaatgctca	7560

acccaaatgc aaccccaatt tacattactg gactactcag gatgaagggtg ctgcaatcgg	7620
attggcctgg ataccatatt tcgggccagc agccgaagga atttacacag aggggctaata	7680
gcacaaccaa gatggtttaa tctgtgggtt gaggcagctg gccaacgaaa cgactcaagc	7740
tctccaactg ttcttgagag ccacaactga gctgcgaacc ttttcaatcc tcaaccgtaa	7800
ggcaattgac ttctgtctgc agcgatgggg tggcacatgc cacattttgg gaccggactg	7860
ctgtatcgaa ccacatgatt ggaccaagaa cataacagac aaaattgatc agattattca	7920
tgattttgtt gataaaaccc ttccggacca gggggacaat gacaattggt ggacaggatg	7980
gagacaatgg ataccggcag gtattggagt tacagggttt ataattgcag ttatcgcttt	8040
attctgtata tgcaaatgtg tcttttagtc tttcttcaga ttgtttcacg gcaaaactca	8100
acctcaaac aatgaaacta ggatttaatt atatgaatca cttgaatcta agattacttg	8160
acaaatgata acataatata ctggagcttc aaacatagcc aatgtgatc taactccttt	8220
aaactcacag ttaatcataa acaaggtttg acatcaatct agctatatct ttaagaatga	8280
taaacttgat gaagattaag aaaaaggtaa tctttcgatt atcttttagtc ttcaccttg	8340
attctacaat catgacagtt gtctttaatg aaaaaggaaa aaagcctttt tattaagttg	8400
taataatcag atctgcaaac cggtagaatt tagttgtaac ctaacacaca caaagcattg	8460
gtaaaaaagt caatagaaat ttaaacagtg agtgcagaca actcttaaat ggaagcttca	8520
tatgagagag gacgccccg agctgccaga cagcattcaa gggatggaca cgaccacat	8580
gttcgagcac gatcatcatc cagagagaat tatcgagggtg agtaccgtca atcaaggagc	8640
gcctcacaag tgcgcgttcc tactgtatct cataagaaga gagttgaacc attaacagtt	8700
cctccagcac ctaaagacat atgtccgacc ttgaaaaaag gatttttgtg tgacagtagt	8760
ttttgcaaaa aagaccacca gttagaaagt ttaactgata gggaattact cctactaatc	8820
gcccgtgaaga ctgtggatc agtagaacia caattaaata taactgcacc caaggactcg	8880
cgcttagcaa atccaacggc tgatgatttc cagcaagagg aaggtcacaa aattaccttg	8940
ttgacactga tcaagacggc agaactctgg gcgagacaag acatccgaac catagaggat	9000
tccaaattaa gggcattgtt aactctatgt gctgtgatga cgaggaaatt ctcaaaatcc	9060
cagctgagtc ttttgttga gacacaccta aggcgcgaag ggcttgggca agatcaggca	9120
gaacccttc tcgaagtata tcaacgatta cacagtata aaggaggcag ttttgaagct	9180
gcactatggc aacaatggga ccgacaatcc ctaattatgt ttatcactgc attcttgaat	9240
atcgctctcc agttaccgtg tgaaagtctt gctgtcgttg tttcagggtt aagaacattg	9300

gttcctcaat cagataatga ggaagcttca accaaccggg ggacatgctc atggtctgat	9360
gagggtaccc ctttaataagg ctgactaaaa cactatataa ccttctactt gatcacaata	9420
ctccgtatac ctatcatcat atatttaatc aagacgatat cctttaaaac ttattcagta	9480
ctataatcac ttcatttca aattgataag atatgcataa ttgccttaat atataaagag	9540
glatgatata acccaaacat tgaccaaaga aaatcataat ctcgatcgcg tcgcaatata	9600
acctgccaag catacctctt gcacaaagtg attcttgtac acaaataatg ttgactcta	9660
caggaggtag caacgatcca tctcatcaaa aaataagtat tttatgattt actaatgatc	9720
tcttaaaata ttaagaaaaa ctgacggaac ataaattctt tctgcttcaa gttgtggagg	9780
aggtctatgg tattcgctat tgttatatta caatcaataa caagcttgta aaaatatgt	9840
tcttgtttca ggaggtatat tgtgaccgga aaagctaaac taatgatgaa gattaatgcg	9900
gaggtctgat gagaataaac ctcatatttc agattaggcc ccaagaggca ttcttcatct	9960
ccttttagca aaatactatt tcaggatagt ccagctagtg acacgtcttt tagctgtata	10020
ccagttgccc ctgagatagc ccacaaaagt gtctctgagc taaagtggtc tgtacacatc	10080
tcatacattg tattaggggc aataatatct aattgaactt agccatttaa aatttagtgc	10140
ataaatctgg gctaactcca ccaggtcaac tccattggct gaaaagaagc ccacctaca	10200
cgaacattac tttgagcgcc ctcaacaata aaaaataaga gcgtcggtcc aacaatcgag	10260
cgcaaggtta caaggttgaa ctgagagtgt ctagacaaca aaatatcgat actccagaca	10320
ccaagcaaga cctgagaaaa aaccatggcc aaagctacgg gacgatacaa tctaataatcg	10380
cccaaaaagg acctggagaa aggggttgtc ttaagcgacc tctgtaactt cttagttagt	10440
caaaactattc aagggtggaa agtttattgg gctggatttg agtttgatgt gactcacaaa	10500
ggaatggccc tattgcatag actgaaaact aatgactttg cccctgcatg gtcaatgaca	10560
aggaacctat ttccccattt atttcaaaat ccgaattcca ctattgaatc accgctgtgg	10620
gcactgagag tcatccttgc agcagggata caggaccagt taattgacca gtctttgatt	10680
gaacccttag caggagccct tggctctgac tctgattggc tgctaacaac caacactaac	10740
catttcaaca tgcgaacaca acgtgtcaag gaacaattga gcctaaaaat getgtcgttg	10800
attcgatcca atatttcaa gtttattaac aaattggatg ctctacatgt cgtgaactac	10860
aatggattat tgagcagtat tgaaattgga actcaaaatc atacaatcat cataactcga	10920
actaacatgg gttttctggg ggagctccaa gaacccgaca aatcggaat gaaccgcaag	10980
aagcctgggc cggcgaaatt ttccctctt catgagtcca cactgaaagc atttacacaa	11040
gggtcctcga cacgaatgca aagtttaatt ctggaattca atagctctct tgctatctaa	11100
ctaagatgga atacttcata ttgggctaac tcatatatgc tgactcaata gtttaactga	11160

catctctgcc ttcataatca gatatataag cataataaat aaatactcat atttcttgat	11220
aatttgttta accacagata aatcctcact gtaagccagc ttccaagttg acacccttac	11280
aaaaaccagg actcagaatc cctcaataa gagattccaa gacaacatca tagaattgct	11340
ttattatatt aataagcatt ttatcactag aaatccaata tacgaaatgg ttaattgtaa	11400
ctaaacccgc aggtcatgtg tgtaggtttt cacaaattat atatattact aactccatac	11460
tcgtaactaa cattagataa gtaggttaag aaaaaagctt gaggaagatt aagaaaaact	11520
gcttattggg tctttccgtg ttttagatga agcagttgac attcttcctc ttgatattaa	11580
atggctacac aacataccca ataccagac gccaggttat catcaccaat tgtattggac	11640
caatgtgacc ttgtcactag agcttgcggg ttgtattcat catactccct taatccgcaa	11700
ctacgcaact gtaaaactccc gaaacatata taccgtttaa aatatgatgt aactgttacc	11760
aagttcttaa gtgatgtacc agtggcgaca ttgcccatag atttcatagt cccaattctt	11820
ctcaaggcac tatcaggcaa tgggttctgt cctgttgagc cgcggtgcc aagttctta	11880
gatgaaatta ttaagtacac aatgcaagat gctctcttcc tgaaatatta tctcaaaaat	11940
gtgggtgctc aagaagactg tgttgatgac cactttcaag aaaaaatctt atcttcaatt	12000
cagggcaatg aatttttaca tcaaatgttt ttctggtatg acctggctat tttactcga	12060
aggggtagat taaatcgagg aaactctaga tcaacgtggt ttgttcatga tgatttaata	12120
gacatcttag gctatgggga ctatgttttt tggaagatcc caatttact gttaccactg	12180
aacacacaag gaatcccca tgctgctatg gattggtatc agacatcagt attcaaagaa	12240
gcggttcaag ggcatacaca cattgtttct gtttctactg ccgatgtctt gataatgtgc	12300
aaagatttaa ttacatgtcg attcaacaca actctaactt caaaaatagc agaggttgag	12360
gaccagttt gctctgatta tccaatttt aagattgtgt ctatgcttta ccagagcgga	12420
gattacttac tctccatatt agggctgat gggtataaaa tcattaagtt tctcgaacca	12480
ttgtgcttgg ctaaaattca attgtgctca aagtacaccg agaggaaggg ccgattctta	12540
acacaaatgc atttagctgt aaatcacacc ctggaagaaa ttacagaaat acgtgcacta	12600
aagccttcac aggttcacaa gatccgtgaa ttccatagaa cattgataag gctggagatg	12660
acgccacaac aacttttga gctattttcc atacaaaaac actgggggca tctgtgcta	12720
catagtgaag cagcaatcca aaaagttaaa aaacatgcta cgggtgctaaa agcattacgc	12780
cctatcgtga ttttcgagac atatgtgtt tttaaataata gcattgcaa acattatttt	12840
gatagtcaag gatcttggtg cagtgttacc tcagatagaa atctaacacc aggtcttaat	12900
tcttatatca aaagaaatca attccctccg ttgccaatga ttaaagaact gctatgggaa	12960
ttttaccacc ttgaccatcc tccacttttc tcaacaaaaa ttattagtga cttaagtatt	13020

tttataaaag acagagctac tgcagtagaa aggacatgct gggatgcagt attcgagcct	13080
aatgttcttg gatataatcc acctcacaaa ttcagtagca aacgtgtacc ggaacaattt	13140
ttagagcaag aaaacttttc tattgagaat gttctttcct acgcgcaaaa actcgagtat	13200
ctactaccac aatatcggaa tttttctttc tcattgaaag agaaagagtt gaatgtaggt	13260
agaactttcg gaaaattgcc ttatccgact cgcaatgttc aaacactttg tgaagctctg	13320
ttagctgatg gtcttgctaa agcatttccct agcaatatga tggtagttac ggaacgtgaa	13380
caaaaagaaa gcttatttga tcaagcatca tggcaccaca caagtgatga tttcggtagag	13440
catgccacag ttagagggag tagctttgta actgatttag agaaatacaa tcttgcattt	13500
aggtatgagt ttacagcacc ttttatagaa tattgcaacc gttgctatgg tgtaagaat	13560
gtttttaatt ggatgcatta tacaatcca cagtgttata tgcatgtcag tgattattat	13620
aatccaccgc ataacctcac actggaaaat cgaacaaccc cccctgaagg gcctagtcca	13680
tacaggggtc atatgggagg gattgaagga ctgcaacaaa aactctggac aagtatttca	13740
tgtgctcaaa tttctttagt tgaaattaag actggtttta agttgcgctc agctgtgatg	13800
ggtgacaatc agtgcattac cgttttatca gtcttccctc tagagactga tgcagacgag	13860
caggaacaga gcgccgagga caatgcagcg aggggtggccg ccagcctagc aaaagttaca	13920
agtgcctgtg gaatcttttt aaaacctgat gaaacatttg tacattcagg ttttatctat	13980
tttgaaaaa aacaatatct gaatggggtc caattgcctc agtcccttaa aacggctaca	14040
agaatggcac cattgtctga tgcaattttt gatgatcttc aagggaccct ggctagtata	14100
ggtactgctt ttgagcgatc catctctgag acacgacata tctttccttg cagaataacc	14160
gcagctttcc atacgtttct ttcggtgaga atcttgcaat atcatcacct cggatttaat	14220
aaaggttttg accttgaca gttaacactc ggcaaacctc tggatttcgg aacaatatca	14280
ttggcactag cggtagcgca ggtgcttga gggttatcct tcttgaatcc tgagaaatgt	14340
ttctaccgga atctaggaga tccagttacc tcaggtttat tccagttaaa aacttatctc	14400
cgaatgattg agatggatga tttattctta cttttaattg cgaagaaccc tgggaactgc	14460
actgccattg actttgtgct aaatcctagc ggattaaatg ttcctgggtc gcaagactta	14520
acttcatttc tgcgccagat tgtacgtagg actatcacc taagtgcgaa aaacaaactt	14580
attaatacct tatttcatgc atcagctgac ttcgaagacg aaatggtttg taagtggctc	14640
ttatcatcaa ctctgttat gagtcgtttc gcagccgata tattttcacg cacgccgagc	14700
gggaagcgat tgcaaatctt aggatacttg gaaggaacac gcacattatt agcctctaag	14760

atcatcaaca ataatacaga gacgccggtt ttggacagac tgaggaagat aacattgcaa	14820
aggtggagtc tatggtttat ttatcttgat cattgtgata atacctggc ggaggcttta	14880
acccaaataa cttgcacagt tgatttagca cagatcctga gggaatatc atgggcacat	14940
attttagagg ggagacctct tattggagcc acactcccat gtatgattga gcaattcaaa	15000
gtggtttggc tgaaaccta cgaacaatgt ccgcagtgtt caaatgcaa gcaacctggt	15060
gggaaacat tcgtgtcagt agcagtcaag aaacatattg ttagtgcattg gccaaatgca	15120
tcccgaataa gctggactat cggggatgga atccataca ttggatcaag gacagaagat	15180
aagatagggc aacctgctat taaacaaaa tgccttccg cagccttaag agaggccatt	15240
gaattggcgt cccgtttaac atgggtaact caaggcagtt cgaacagtga cttgctaata	15300
aaaccathtt tggaagcacg agtaaattha agtgttcaag aaatacttca aatgaccctt	15360
tcacattact cgggaaatat gtgtcatagg tacaacgac aatacagtc tcattctttc	15420
atggccaatc gtatgagtaa ctacagcaac cgattgattg tttctacaaa cactttaggt	15480
gagttttcag gaggtggcca atcggcacgc gacagcaata ttattttcca gaatgtata	15540
aattatgcag ttgcactgtt cgatatataa tttagaaaca ctgaggctac agatatccag	15600
tataatcgtg ctacacttca tctaactaag tgttgcaccc gggaggtacc agctcagtat	15660
ttaacataca catctacatt ggatttagat ttaacaagat accgagaaaa tgaattgatt	15720
tatgacaata atcctctaaa aggaggactc aattgcaata tctcatttga taaccatttt	15780
ttccaaggca aacagctgaa cattatagaa gatgacctta ttgactgcc tcacttatct	15840
ggatgggagc tagctaagac catcatgcaa tcaattatht cagatagcaa taattcgtct	15900
acagacccaa ttagcagttg agaacaaga tcattcacta cccattttctt aacttatccc	15960
aagataggac ttctgtacag ttttggggcc ttgttaagtt attatcttgg caatacaatt	16020
cttcggacta agaaattaac acttgacaat tttttatatt acttaactac ccaaattcat	16080
aatctaccac atcgctcatt gcgaatactt aagccaacat tcaaacatgc aagcgttatg	16140
tcacgattaa tgagtattga tccccatttt tctatttaca taggcggtgc tgcaggtagc	16200
agaggactct cagatgcggc caggttatht ttgagaacgt ccatttcac ttttcttaca	16260
tttgtaaagg aatggataat taatcgcgga acaattgtcc ctttatggat agtatatcca	16320
ttagagggtc aaaaaccaac acctgttaat aatttcttcc atcagatcgt agaactgctg	16380
gtgcatgatt catcaagaca ccaggctttt aaaactacca taaatgatca tgtacatcct	16440
cacgacaatc ttgtttacac atgtaagagt acagccagca atttcttcca tgcgtcattg	16500
gcgtactgga ggagcaggca cagaaacagc aaccgaaaag acttgacaag aaactcttca	16560
actggatcaa gcacaaacaa cagtgatggt catattaaga gaagtcaaga acaaaccacc	16620

agagatccac atgatggcac tgaacggagt ctagtcctgc aaatgagcca tgaataaaaa	16680
agaacgacaa ttccacaaga gaacacgcac cagggtccgt cgttcagtc atttctaagt	16740
gactctgctt gcggtacagc aaacccaaaa ctaaatttcg atagatcgag acacaatgtg	16800
aaatctcagg atcataactc agcatccaag agggaaggtc atcaaataat ctcacatcgt	16860
ctagtcctac ctttctttac attatctcaa gggacacgcc aattaacgtc atccaatgag	16920
tcacaaacce aagatgagat atcaaagtac ttacggcaat tgagatccgt cattgatacc	16980
acagtttatt gtaggtttac cggatatagtc tcgtccatgc attacaaact tgatgaggtc	17040
ctttgggaaa tagagaattt taagtcggct gtgacgctgg cagagggaga aggtgctggt	17100
gccttactat tgattcagaa ataccaagtt aagacctat tttcaacac gctagctact	17160
gagtccagta tagagtcaga aatagtatca ggaatgacta ctctaggat gcttctacct	17220
gttatgtcaa aattccataa tgaccaaat gagattattc ttaacaactc agcaagccaa	17280
ataacagaca taacaaatcc tacttggttt aaagaccaa gagcaaggct acctaggcaa	17340
gtcgaggtta taaccatgga tgcagagacg acagagaata taaacagatc gaaattgtac	17400
gaagctgtac ataaattgat cttacacat gttgatccca gcgtattgaa agcagtggtc	17460
cttaaagtct ttctaagtga taccgagggt atgttatggc taaatgataa tctagccccg	17520
ttttttgcca ctgggtattt aattaagcca ataacgtcaa gtgccaggtc tagtgagtgg	17580
tatctttgtc tgacgaactt cttatcaact acacgtaaga tgccacacca aaacctctc	17640
agtttgaagc aggtaatact tacggcattg caactgcaa ttcaacggag ccatactgg	17700
ctaagtcatt taactcagta tgctgactgc gatttacatt taagctatat ccgccttgg	17760
tttccatcat tagagaaagt actataccac aggtataacc ttgtcgattc aaaaagggt	17820
ccactagtct ctgtcactca gcacttagca catcttaggg cagagattcg agaattgacc	17880
aatgattata atcaacagcg acaaagtcgg actcaaacat atcactttat tcgtactgca	17940
aaaggacgaa tcacaaaact agtcaatgat ttttaaaat tctttcttat tgtacaagca	18000
ttaaaacata atgggacatg gcaagctgag ttaagaaat taccagagt gattagtgtg	18060
tgcaataggt tctatcatat tagagattgt aattgtgaag aacgtttctt agttcaaacc	18120
ttatatattac atagaatgca ggattctgaa gttaaagctta tcgaaaggct gacagggtt	18180
ctgagtttat ttccagatgg tctctacagg ttcgattgaa taaccgtgca tagtattttg	18240
atacttgtaa aggttgggtta tcaacataca gattataaaa aactcataaa ttgctctcat	18300
acatcatctt gatctgattt caataaataa ctatttagat aacgaaagga gtccttacat	18360
tatacactat atttggcctc tctccctgcg tgataatcaa aaaattcaca atacagcatg	18420
tgtgacatat tactgctgca atgagtctaa cgcaacataa taaactccgc actctttata	18480

attaagcttt aacgataggt ctgggctcat attgttattg atatagtaat gttgtatcaa 18540

tatcttgcca gatggaatag tgctttgggt gataacacga cttcttaaaa caaaactgat 18600

ctttaagatt aagtttttta taattgtcat tgctttaatt tgtcgattta aaaatggtga 18660

tagccttaat ctttgtgtaa aataagagat taggtgtaat aactttaaca tttttgtcta 18720

gtaagctact attccattca gaatgataaa attaaaagaa aagacatgac tgtaaaatca 18780

gaaatacctt ctttacaata tagcagacta gataataatc ttcgtgttaa tgataattaa 18840

ggcattgacc acgctcatca gaaggctcac tagaataaac gttgcaaaaa ggatccctgg 18900

aaaaatggtc gcacacaaaa atttaaaaat aaatctatctt cttctttttt gtgtgtcca 18959

<210> 2

<211> 18874

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 2

cggacacaca aaaagaaaga aaagtttttt agactttttg tgtgcgaata actatgagga 60

agattaatca ttttctcaa actcaaaacta atattaacat tgagattgat ctcattcattt 120

accaattgga gacaatttaa ctagtcaatc cccattttgg gggcattcct aaagtgttgc 180

aaaggtatgt gggtcgtatt gttttgcctt ttcctaacct ggctcctcct acaattctaa 240

cctgcttgat aagtgtgatt acctgagtaa tagactaatt tcgtcctggt aattagcatt 300

ttctagcaaa accaatacta tctcaagtcc taagagaagg tgagaagagg gtcccagggt 360

atccctccag tcacaaaaat ctagctaatt ttagctgagt ggactgatta ctctcatcac 420

acgctaacta ctaagggttt acctgagagc ctacaacatg gataaacggg tgagaggttc 480

atgggccctg ggaggacaat ctgaagttga tcttgactac caaaaatat taacagccgg 540

gctttcggtc caacaaggga ttgtgcgaca aagagtcac cgggtatatg ttgtgagtga 600

tcttgagggt atttgtcaac atatcattca ggcttttgaa gcaggcgtag attccaaga 660

taatgctgac agcttctttt tacttttatg ttacatcat gcttaccaag gagatcatag 720

gctcttcctc aaaagtgatg cagtccaata cttagagggc catggtttca ggtttgaggt 780

ccgagaaaag gagaatgtgc accgtctgga tgaattgttg cccaatgtca ccggtggaaa 840

aaatcttagg agaacattgg ctgcaatgcc tgaagaggag acaacagaag ctaatgctgg 900

tcagttttta tcctttgcca gtttgtttct acccaaactt gtcgttgggg agaaagcgtg 960

tctggaaaaa gtacaaaggc agattcaggt ccatgcagaa caagggctca ttcaatatcc	1020
aacttcctgg caatcagttg gacacatgat ggtgatcttc cgtttgatga gaacaaactt	1080
tttaatcaag ttctactaa tacatcaggg gatgcacatg gtcgcaggcc atgatgcgaa	1140
cgacacagta atatctaatt ctgttgccca agcaaggttc tctggcttc tgattgtaaa	1200
gactgttctg gaccacatcc taaaaaaac cgatcttgga gtacgacttc atccactggc	1260
caggacagca aaagtcaaga atgaggtcag ttcatccaag gcagctcttg gtcacttgc	1320
caagcatgga gaatatgctc catttgcacg tctctcaat ctttctggag tcaacaactt	1380
ggaacatggg ctttatccac aactctcagc cattgctttg ggtgttgcaa ctgccacgg	1440
gagcacgctg gctgggtgta atgtagggga gcaatatcag caactgcgtg aggctgtac	1500
tgaagctgaa aagcaactcc aacaatatgc tgagacacgt gagttggaca accttgggt	1560
tgatgagcag gaaaagaaga ttctcatgag ctccaccag aagaagaatg agatcagctt	1620
ccagcaaact aacgcaatgg taaccttgag gaaagagcgg ctggccaaac tgaccgaagc	1680
catcacgact gcatcaaaga tcaaggttgg agatcggtat cctgatgaca atgatattcc	1740
atttccggg ccatctatg atgaaacca cccaaccct tctgatgata atcctgatga	1800
ttcacgtgat acaactatcc caggtgggtg tgttgaccg tatgatgatg agagtaataa	1860
ttatcctgac tacgaggatt cggctgaagg caccacagga gatcttgatc tcttcaattt	1920
ggacgacgac gatgacgaca gccaaccagg accaccagac agggggcaga gcaaggagag	1980
agcggctcgg acacatggcc tccaagatcc gaccttggac ggagcgaaaa aggtgccgga	2040
gttaacccca ggttcccacc aaccaggcaa cctccacatc accaagccgg gttcaaacac	2100
caaccaacca caaggcaata tgtcatctac tctccagagt atgacccta tacaggaaga	2160
atcagagccc gatgatcaga aagatgatga tgacgagagt ctacatccc ttgactctga	2220
aggtgacgaa gatgttgaga gcgtatcagg ggagaacaac ccaactgtag ctccaccagc	2280
accagtctac aaagatactg gagtagacac taatcagcaa aatggaccaa gcaatgctgt	2340
agatggtcaa ggttctgaaa gtgaagctct ccaatcaac ccgaaaaga gatctgcact	2400
ggaagaaaca tattatcatc tcctaaaaac acagggtcca tttgaggcaa tcaattatta	2460
tcacctaatt agttagtagc ccattgcttt tagcactgaa agtggcaagg aatatctctt	2520
cccagattct cttaagaag cctaccgcc ttggttgagt gagaaggagg ccttagagaa	2580
agaaaatcgt tatctggta ttgatggcca gcaattcttc tggccagtaa tgagcctaca	2640
ggacaagttc ctgtctgttc ttcaacatga ctgaggaccc atgattagta gatcttctt	2700
attctgagct tgattataat tgttttgata attcaagtat gagcacccaa cccgaaatat	2760

aaaccctatt ttagttatga ggaaattaaa taaataatct gtaagttgta ggactatgaa 2820

gagctgcttg tgtcaattta tcacgggtta ataccatac cgcaagaata attatttagt 2880

aattttgatc agcttatgat atgtaccaat aggaaaacat tatagcatta aaacataaag 2940

tatccttcga tgagcttagg aggataatat cctgatgaat tctatagaac ttaggattaa 3000

gaaaaaatc atgatgaaga ttaaaacctt catcatcctt taaaaagaga gctattcttt 3060

atctgaatgc ccttattaat gtctaagagc tattattttg taccctctta gcctagacac 3120

tgcccaacat ataatcatg cagcaggata ggacttatag acatcatgga cccgaagtgt 3180

ctggctggtt ttctgagcaa ttaatgaccg gcaaaatacc gctaacagag gtgtttgttg 3240

atgttgaaaa caaaccaagt cctgccccga taaccattat tagtaagaat cccaagacaa 3300

cacgtaaaag tgataagcaa gtccaaacag atgatgccag tagcttattg acagaagaag 3360

tcaaggctgc cataaattcg gtgatatcag ctgtgcgtcg gcaaaccaat gctattgaat 3420

cactagaagg tcgagtaaca actcttgagg ccagcttaaa accagttcaa gacatggcaa 3480

agaccatata atccctgaat cgcagctgtg ccgaaatggt tgcaaaatac gacctactgg 3540

tgatgaccac tgggcgagca actgccactg ctgcagcaac agaagcatat tggaatgaac 3600

atggacaagc acctccagc ccatcattgt acgaggatga tgctattaag gctaaattga 3660

aagatccgaa cggaaggtt ccagaaagtg tcaaacaggc ctacacaaat ctagatagca 3720

caagtgccct caatgaggaa aatttcgggc gaccttacat ttcagcaaaa gatctcaagg 3780

aaatcatcta tgaccatctc ccaggatttg ggacagcttt tcatcagttg gtgcaggtta 3840

tctgcaaaat tggttaaggat aataatatcc tagacataat tcatgcagaa ttccaagcaa 3900

gcttggctga gggagactcc cccagtggtg cattaatcca gataacaaaa cggatccctg 3960

ctttccaaga tgcctctcct ccaattgtgc atatcaagtc tcgaggagat atacccaaag 4020

cctgtcagaa aagcctccgg ccggtccgc cgtcaccaaa gatcgataga ggttgggtct 4080

glatTTTTca attccaagac gggaaggccc ttgggctaaa aatatgatac agaagcaagg 4140

taagctcatt ttgcgatggc caaatgatac ttatgactgt ttaaaatcaa gttagactaa 4200

tagtctatca tgcataagc ttataagtca gttttaaat tccccctat cctaatcaat 4260

tgataatgct gtcaatagga aaattcccct gtattgtaat aagacctcat taacacattt 4320

cctctgctta gtactatgca gaaacccccg agcaaattaa aattgatgaa gattaagaaa 4380

aagagggatt ttctcaggaa aaatcttttt ccttaccttc atctcattta aacaaattta 4440

ggactcagga aaaatgaaaa gggtcactgt gccgactgca ccacctgcct atgctgacat 4500

tggtatcct atgagcatgc ttcccatcaa gtcaagcagg gctgtgagtg gaattcaaca	4560
gaaacaagag gtctttcctg gaatggatac accatcaaat tctatgagac ctgttgctga	4620
tgataacatt gatcatacaa gtcatacccc gaacggagtg gcctcagcat tcatcttgga	4680
ggcaactgtc aatgtgatct cggggcccaa agtctcatg aaacaaatcc ctatttggtt	4740
gccactcgga attgctgacc aaaaaacgta cagttttgac tcaacaacag cagcaattat	4800
gctcgcatct tatacgaatc cccatttttg aaaggccaac aacccctcg ttagagtga	4860
tcgacttggc cagggaatac cggatcacc actcagattg ctcaggatgg ggaaccaggc	4920
tttcttcaa gaggttgtgc taccaccagt tcaactgccg caatatttca cttttgatct	4980
gactgcactc aaattagtga cacagcctct cctgtctgac acatggacag atgagactcc	5040
gagcaacctt tcaggagcac ttctgtcccg gctttcattt caccctaaagc tgagaccgt	5100
tctacttcca ggcaaaacgg gaaagaaagg gcatgtttct gatctgactg ctccagacaa	5160
aattcagaca attgtgaacc tgatgcaaga ttcaaaatc gtgccaattg atccagctaa	5220
gagtatcatt gggatcgagg ttccagaatt gctgtgtccac aagctcactg ggaagaaaat	5280
gagtcagaag aatggacagc ctataattcc tgtcttactt ccaaaatata ttgggctaga	5340
tccaatctca cctggagacc tgactatggt cataacacca gattatgatg attgtcattc	5400
acctgccagt tgctcttacc tcagtgaata gtgattctca caaagtgaga gaaacacctc	5460
cagtaagaa atcaaatctt atctatagca actcaatga cttttaggaa gctagcagta	5520
catatactat gggacaactc aacctcttg ttaaaatgta ctaatcgggt caaagaactc	5580
tactgatca agcctgaatc caagatagaa ccagcccaaa gggcctcccc agagtctctt	5640
acaaacttag ccaatcaatt aacatgata agcgatccat acttcacca atcagtgtcc	5700
gatgttcacc cttcaagcc tcttcctag caaattgaac tagctgtacc aagaggttcc	5760
ctcagcctcc ttctcaaata acctgatect tgagggttac accttcacca ctctatgctc	5820
atttcacca aacataaat gaaatgtctt aacatgattg caccattaag aaaaacaaat	5880
ctgatgaaga ttaagcctga ttaaggccca accttcactt tttaccata atcttgttct	5940
cagtaccatt tgataagggt acacttgcca aaacgcccc atcctaagggt tctcgcaatg	6000
gggggtctta gcctactcca attgcccagg gacaagtctc ggaaaagctc tttctttgtt	6060
tgggtcatca tcttattcca aaaggccttt tccatgcctt tgggtgttgt gactaacagc	6120
actttagaag taacagagat tgaccagctc gtctgcaagg atcatcttg atctactgac	6180
cagctgaaat cagttggctt caacctcgag gggagcggag tatctactga tatcccatct	6240
gcaacaaagc gttggggctt cagatctggt gttcttccca aggtgggtcag ctatgaagcg	6300
ggagaatggg ctgaaaattg ctacaatctt gaaataaaga agccggacgg gagcgaatgc	6360

ttacccccac cgccagatgg tgtcagaggc ttccaaggt gccgctatgt gcacaaagcc	6420
caaggaaccg ggccctgccc aggtgactac gcctttcaca aggatggagc tttctttctc	6480
tatgacaggc tggtttcaac tgtaatttac agaggagtca attttgctga gggggtgatt	6540
gcattcttga tattggctaa accaaaagaa acgttccttc agtcaccccc cattcgagag	6600
gcagtaaaact acactgaaaa tacatcaagt tattatgcca catcctactt ggagtatgaa	6660
atcgaaaatt ttggtgctca acactccacg acccttttca aaattgacaa taatactttt	6720
gttcgtctgg acaggcccca cagcctcag ttcttttcc agctgaacga caccattcac	6780
cttcaccaac agttgagtaa tacaactggg agactaattt ggacactaga tgctaataac	6840
aatgctgata ttggtgaatg ggctttttgg gaaaataaaa aaatctctcc gaacaactac	6900
gtggagaaga gctgtctttc gaagctttat cgctcaacga gacagaagac gatgatgcgg	6960
catcgtcgag aattacaaag ggaagaatct ccgaccgggc caccaggcag tattcggacc	7020
tggtttcaaa gaatccccct gggatgggtc cattgcacat accagaaggg gaaacaacat	7080
tgccgtctca gaattcgaca gaaggtcgaa gagtaagtgt gaacactcag gagaccatca	7140
cagagacagc tgcaacaatt ataggcacta acggcaacca tatgcagatc tccaccatcg	7200
ggataagacc gagctccagc caaatcccga gtctctcacc gaccacggca ccaagccctg	7260
aggctcagac cccacaaacc cacacatcag gtccatcagt gatggccacc gaggaaccaa	7320
caacaccacc gggaagctcc cccggcccaa caacagaagc acccactctc accaccccag	7380
aaaatataac aacagcgggtt aaaactgtcc tgccacagga gtccacaagc aacgggtctaa	7440
taacttcaac agtaacaggg attcttggga gtcttgggct tcgaaaacgc agcagaagac	7500
aaactaacac caaagccacg ggtaagtga atcccaactt aactactgg actgcacaag	7560
aacaacataa tgctgtctgg attgcttga tccgtactt tggaccgggt gcggaaggca	7620
tataactga aggcctgatg cataacaaa atgccttagt ctgtggactt aggcaacttg	7680
caaatgaaac aactcaagct ctgcagcttt tcttaagagc cacaacggag ctgcggacat	7740
ataccatact caacaggaag gccatagatt tccttctgcg acgatggggc gggacatgca	7800
ggatcctggg accagattgt tgcattgagc cacatgattg gacaaaaaac atcactgata	7860
aatcaacca aatcatccat gatttcacg acaaccctt acctaactag gataatgatg	7920
ataattggtg gacaggctgg agacagtgga tcctgcagg aataggcatt actggaatta	7980
ttattgcaat tattgctctt ctttgcgttt gcaagctgct ttgctgaata tcaatttgaa	8040
tcatcaattt aagcttgata catttctagc attttaaat ataaaccgat actgatactt	8100
gaaaatcagg ctaatgccaa gtctgtgca aaacttgaaa gtaagcttac aaaaatcctt	8160
tgaactggaa tgctttgata ctctttctca atactatata agttccttcc caagaataat	8220

attgatgaag attaagaaaa agtgacattg tgcccacttt tgtaatcttc atccacctac	8280
acattcatal ttaggaatct ttgaattaac cctcacactt gcttaggaaa gaggctatcc	8340
tctacaagaa tcccaggcgg gcaattcagt taatttcata tcaagataac atccatttcc	8400
aagaccacag ataactatat tattaatctt taccacaaat atggagaggg gtcgtgagcg	8460
cgggagatca aggaattcac gtgccgacca gcaaaattca acaggctctc aatttaggac	8520
aagatccatt tcccgggata agacaacaac agactaccgt agtagtcgaa gtacttcgca	8580
agtttagagtc cctacggitt tccataagaa aggtactggg acccttactg tccctccagc	8640
acctaaggat atttgccta ctctcagaaa aggatttcta tgtgacagta atttctgtaa	8700
aaaggacat caacttgaag gcctaaccga cgggagctc ctacttctta tagcacggaa	8760
gacctgtgga tcaactgatt catcgcttaa tatagctgct cctaaagacc taagactagc	8820
aatcctacg gctgatgact tcaagcaaga cggcagctca aaattaaccc taaaattact	8880
agtcgagact gctgagtttt gggccaatca gaataatga gaagtagatg atgcaaaact	8940
ccgtgctctc ttgacgttga gtgctgtctt agtgcggaaa ttctctaagt cacagcttag	9000
tcaattatgt gagagtcac ttaggaggga aaacttagga caagaccaag ctgaatcagt	9060
tctcgagggt tatcaacgtt tacatagtga taaaggaggt gcttttgagg cagcactatg	9120
gcaacagtgg gatagacaat cattaactat gtttatatct gctttctcc atgtagcatt	9180
gcaactttcc tgtgagagct ccactgtagt gatatcaggc ctacgcttac ttgcccccc	9240
aagcgttaat gaagggtccc ctctgcacc aggggaatat acttggtcag aagatagtag	9300
aacttagcct ataggaggga caagtaaac aagatgccct tatcctctat agatggtatt	9360
tttaagagg gggacaggat aggaataaag ataataacta aagccaatat aaagatagca	9420
acacaagtag aaattaaaa agaaatcaaa acaatctccc cttgttcaat atgaaatata	9480
atagttagta ttgtttcat gatgtcaatc atttatgtt aaaaataaac aaagttagta	9540
agagtgttag gatcgttata ttgcaaggat cctccctaga agcgttgaat catctcaagt	9600
agcctagaac aagaacagca gaggattaaa ttgaaataga taataaggat attgcttgtt	9660
tttaagatag ttttaggaag tttaaaatta agaaaaagaa cccatggaca cactctagca	9720
ttgaggatgg ggttcccttg atgatagtag agtcttaggt atagggtagt cctacacgtc	9780
ctatattata cagtctaac ttgtaaaatt aaactacaag aacatgatga aaattaatga	9840
gaaggttcca agattgactt caatccaaac acctgtctct gccaatcttc atctccttaa	9900
gatatatgat ttgttcctg cgagataagg ttatcaata gggtgtgtat ctcttttaca	9960

tatttgggct cccactaggc tagggtttat agttaaggaa gaticatcac atttttaatt	10020
gaactagtct actcgcagaa tcctaccggg aatagaaatt agaacatttg tgatactttg	10080
actataggaa ataattttca aactacctg agatcagggt attcttccaa cttattctgc	10140
aagtaattgt ttagcatcat aacaacaacg ttataattta agaatcaagt cttgtaacag	10200
aaataaagat aacagaaaga acctttatta tacgggtcca ttaattttat aggagaagct	10260
ccttttaca gctaagatt ccattagaga taaccagaat ggctaaagcc acaggccggt	10320
acaacttggg aacacaaaa cgggagctag agcaaggagt tgtgttttagc gacctatgca	10380
acttcctagt gactccaact gtgcaaggat ggaaggttta ctgggctgga cttgagtttg	10440
atgtcaacca aaagggtatt acctgttaa atcgtcttaa agtgaatgat ttgtctcctg	10500
catgggcgat gacccggaac ctcttccac acttgttcaa aaaccaacag tctgaagtc	10560
aaactcccat ttgggcctta agggtaattc ttgccgccg gattcttgac caattaatgg	10620
atcattccct cattgagccg ctatcagggg cctgaacct aattgctgat tggttactaa	10680
caacatctac taatcattc aacatgagaa ctcaacgagt aaaggaccaa ctgagtatga	10740
ggatgttacc tcttataagg tcaaatatta ttaactttat aaataagctc gagactcttc	10800
atgtcgttaa ttacaaggga cttctaagca gtgttgagat aggaacacca agctatgcaa	10860
tcacattac caggactaat atgggttacc ttgtcgaagt tcaggaacca gataaatctg	10920
caatggatat acgacacctt ggtctgtca aattctccct actacatgaa tcgacactta	10980
aacctgttgc cactcctaaa ccgtcaagca ttacttcatt gatcatggag ttcaacagtt	11040
ctttggcaat ttaattgccg taataacaat tgtacgatag ggctaacatt gattccataa	11100
tccatcgtag gacagaatca ttttctgtta tgatcttagt ttaatctctc ttatataaat	11160
gattaataag gagcttgttt agaattgtac aaaagtatac tgtttgacct cctagtatcc	11220
ctgtaaatat cctcattcaa ttttttgcct ttacatgtgt agtcacctgt atagcatgac	11280
cctagtcatg cctttaatta atacttaatc taacagttaa tataatgtat aactttccat	11340
gttcaaagag tagtcaaaac aatgtgagat ccagtttcac tcacagcatc tattcactat	11400
ttacagtatg atgagcccaa attaacacag tagaggctca gatttattaa tagaatgagg	11460
aagattaaga aaaagtccat aatgctgggg aggcaatcct tgccaccata ggactttttc	11520
aattcctcta ttttatgatg gctaccaaac atacacaata tctgatgca agattgtctt	11580
ccccaattgt cttagaccaa tgtgacctag tgacaagagc ttgtggactt tactctgagt	11640
attcgtgaa ccctaaacta aggacatgcc gtttaccgaa acatatctac agattaaaat	11700
atgacactat tgttttacga tttatcagt atgtccctgt agctacaatc ccaatagact	11760
acattgctcc gatgttaata aatgttctgg cagatagtaa aaatgtacca ttggaacctc	11820

cctgcttgag ttctttggat gaaatagtca attataccgt gcaggatgca gcatttcctta	11880
attattacat gaatcagatt aaaacacagg aaggagtaat tacagatcaa ttgaaacaga	11940
acattcgtag ggtcattcac aaaaacagat atctatctgc tctattcttc tggcatgac	12000
ttgccatcct caccgcgcga gggagaatga accgaggaaa tgtgcgctct acttggtttg	12060
taacgaatga ggttgttgac attctaggat atggtgatta tatcttctgg aagatcccta	12120
ttgctctatt accaatgaac acagetaatg ttccacatgc atcaactgac tggtagcaac	12180
ctaatatctt caaggaggct attcaaggac acacacatat tatttcagtc tctacagccg	12240
aggtccttat tatgtgtaag gatcttgtca caagtcgttt taataccctt ctgattgctg	12300
agttagccag gttggaagat ccagtgctcg ctgattatcc actagtagat aatattcaat	12360
ctctgtatga cgcaggagac tacctgttgi ccatattggg atcagagggg taaaaataa	12420
tcaaatatct cgaacctctg tgtttggcta agattcaact atgttccaa tatacagaac	12480
gaaaagggcg gtttttaacc cagatgcac ttgcagtat tcagacattg cgtgaactcc	12540
tccttaatat agggttgaaa aaatcacaat tgtctaaaat ccgcgagttt caccaactgt	12600
tgtctcagact ccgacttaca ccacaacaat tatgtgaatt attttcaatc caaaaacact	12660
ggggccacc agttctgcat agtgaagagg ccatccaaa ggtaaaaaat catgcaacag	12720
ttctaaaggc attgcggccg attatcatct ttgaaacgta ttgtgtgttc aagtatagt	12780
ttgcaaaaca ttctttgat agtcaaggca ctgggtacag tgtgatatca gaccgatgtt	12840
taacgccggg attgaattcc tacattaggc gaaatcaatt cctccactt ccaatgatca	12900
aagatctttt atgggaattt taccatttgg atcatctcc attattctcc acgaagatca	12960
ttagtgacct cagcattttc attaaagacc gcgcaacagc agtgaacag acctgttggg	13020
atgcagtttt ttagcctaac gttttgggct acagtcacc ttatcgattc aataccaaac	13080
gtgtacctga acaattcctg gagcaagagg atttttctat tgagagtgtc ttacaatacg	13140
ccaagaact taggtactta ttgccccaga atcgaaattt ttctttttca ttgaaggaaa	13200
aagaattaaa tgttggtagg acatttggaa aattgcctta tttaaccagg aatgtccaaa	13260
ccctctgcga agcattactt gcagatggtt tggctaaagc cttccaagc aatatgatgg	13320
tggtcacaga gaggaacaa aaggagagcc tccttcacca agcatcctgg caccatacaa	13380
gtgatgattt cggagagcat gccacagttc gtggaagtag tttgtcaca gacctggaaa	13440
aatacaatct ggccttcagg tatgaattca cagctccctt catcaaatat tgcaaccaat	13500
gctatggggt tcgcaatgtc tttgattgga tgcacttctt aattccacag tgttacatgc	13560
atgttagtga ttattataac ccaccacata atgtaacctt agagaatagg gaatatcccc	13620
ccgaaggacc aagtgcctat agaggccacc ttggcggtat tgaggggctt caacaaaagt	13680

tatggactag tatctcatgt gctcaaatct cattggtaga gatcaagacc gggttcaaat	13740
tgcgatcagc agtcatgggg gataatcaat gtattacagt attatcagtc tttccactag	13800
aatctagtcc gaatgagcag gagagatgcg cagaagacaa tgcagccaga gtggctgcta	13860
gcttggccaa agtcacaagt gcctgtggga tattcctcaa gcctgatgag actttcgtac	13920
actcaggett tatctatfff ggcaaaaagc aatacttgaa cggaattcaa ttacctcaat	13980
cactcaagac agcagctagg atggcccttc tctcagatgc aatttttgat gacttgcaag	14040
gtacacttgc tagtatagga actgcctttg agcgatcaat ctccgaaact agacatattt	14100
taccatgtcg tgttgcagct gcctttcata catatttctc tgttcggatc ttacaacatc	14160
atcaccttgg tticcataag gggtcagacc ttggacaatt ggcaatcaat aaacctcttg	14220
atttcgggac cattgcacta tccctagcag ttctcaggt attgggtgga ttatccttcc	14280
taaatccaga aaagtgcctt tatcgcaact tgggtgatcc tgtaacttca ggcctattcc	14340
agttgaagca ttatctgtca atgggtggga tgagtgatat ctttcatgca cttgttgcaa	14400
aaagcccagg gaattgtagc gcgattgact ttgttctaaa cccaggcggg ttaaatgtcc	14460
ctggatcaca ggatttaaca tctttccttc gtcagattgt cagaaggagt atcacacttt	14520
cggcaaggaa caagttaatc aacacgttat ttcacgcttc tgcagatctt gaagacgaat	14580
tagtatgtaa atggttactt tcttcaacgc ccgtgatgag tegtctcgca gccgatattt	14640
tctcacgaac accaagcggg aaaagattac aaatcttggg atacctcgag ggaaccagaa	14700
ctttattagc atctaaaatg ataagcaata atgcagagac accaatcttg gagaggtca	14760
gaaaaataac acttcaaaga tggaatctat ggtttagtta cctagacatc tgtgaccag	14820
ctttaatgga agcaattcaa ccaattaagt gtactgttga tattgctcaa attcttagag	14880
aatactcctg ggctcatatt cttgatggta gacagttaat aggggcaaca ctgcatgta	14940
tacctgagca gttccaaacc acatgggttaa aaccttacga gcaatgtgtg gaatgttcat	15000
ccacaaacaa tactagtcca tatgtatcag ttgcattaaa aaggaacgtg gttagtgtt	15060
ggcctgatgc atctagattg ggggtggacga ttggtgatgg gattccctac ataggctcaa	15120
gaactgagga caagataggt cagcccgcta ttaagccgag gtgcccata gctgcattaa	15180
gagaagctat tgaattgacc tctaggttga cctgggtcac tcaaggtagt gcaaacagcg	15240
atcagttaat tcgccctttt cttgaggcaa gaggtaactt gagggtacaa gagattcttc	15300
aatgacccc ctcacattac tccgtaata ttgtgcatcg gtataatgat cagtatagcc	15360
ctcactcctt tatggctaac cgcatgagta acacagcaac gcgcttgatg gtatctacca	15420

acacactagg agagttttcc ggagggggc aggctgcacg tgatagcaac attatatttc	15480
aaaatgtgat taacttttga gtggccttgi atgacattag gtttcggaac acttgtacat	15540
cttctattca atatcacagg gcccatattc acctgacgaa ttgttgtacg agggaagtac	15600
cggcccaata cttaacatac acaaccacgc taaatctaga tttgagtaag taccgtaata	15660
atgaactgat ttatgattca gagccactaa gaggaggtct caactgcaac ttatcgattg	15720
acagtccttt gatgaagggc ccacgtttaa atattattga ggatgactta atacggttgc	15780
cacatttatc cggctgggaa ttagcaaaaa cagtcttgca atcaataatc tctgatagta	15840
gcaattcadc aacagatccc attagcagcg gtgaaacaag atccttcaca acccacttct	15900
taacgtatcc caaaataggg ctccatatac gttttggagc cctcataagt ttttatttgg	15960
gtaatactat tctgtgcacg aaaaagatcg gactcacaga atttctatac tatctccaga	16020
atcagatcca caacttatca catagatccc ttgcaatctt caaacgcaca tttagacact	16080
caagtgtcat gtccaggttg atggatatag accccaactt ctcaatatat attggtggga	16140
ctgcaggtga ccgtggatta tccgacgtg caagattatt tctccgaatt gcaatttcaa	16200
ctttcttgag ctttgttgag gagtgggtta tctttaggaa ggcaaacatc ccactatggg	16260
ttatctatcc tctcgaaggc caacgccctg atcctcctgg cgaatttttg aaccgagtaa	16320
aatctctaata tgttgggact gaagatgata aaaataaagg ctctatactt tcaagatctg	16380
gagagaaatg ctcttcaaat ctagtttata attgcaagag tacagcaagc aattttttcc	16440
atgcatcatt ggcttattgg agaggtcgac acagacctaa gaagactata ggtgcaacca	16500
acgcgacaac agctccacac atcatcctgc caccaggaaa ctctgatcga ccgcctggcc	16560
tagaccttaa taggaacgat gatactttca ttccctaccag aattaaacag atagtccaag	16620
gagactctag aaacgacaga acgaccacca cgagatttcc acccaaaagt aggtccactc	16680
caacatcagc aaccgagcct cctacaaaaa tgtatgaggg ttgcacaacc caccaaggga	16740
aattaacaga tacacatttg gatgaggatc acaatgcaa agagttcca tccaatccgc	16800
atcgtttagt agtaccattc tttaaatata caaaagatgg ggaatacagt atcgaacctt	16860
ctactgaaga aagccgcagt aatataaaaag ggttacttca acatttaaga accatggttg	16920
atactacat atattgtcgc ttacttgaa ttgtttcatc aatgcattat aagttagatg	16980
aagtactatg ggaatataat aaatttgaat cagctgtaac cctagcagaa ggggagggtt	17040
caggtgcctt actactgac caaaaatacg gcgttaagaa gttatttttg aatacacttg	17100
ctactgaaca tagtattgag agtgaagtta tatcaggtta caccactcca aggatgctac	17160
tctcaattat gcctaaaaca catcgtggtg agctagaggt catattaaat aactcagcta	17220
gtcaataaac tgacattaca caccgagatt ggttttcaaa tcaaaaaaat aggtattcaa	17280

atgatgctga tattattacc atggatgctg aaactacaga aaacttagat cgttcagat 17340
tatatgaagc agtatatacg attatttgta atcatatcaa tcctaaaact ttgaaagtgg 17400
tcatcttaaa agtcttcctc agcgatttgg atgggatgtg ctggattaac aattatcttg 17460
ctcctatgtt tggatcagga tatttaatca aacctataac atcaagtga aagtcaagtg 17520

agtggtatTT atgcttatct aatctacttt caaccttgag aactactcag catcaaacc 17580
aggcaaaactg tctccatgtc gtacaatgtg ctcttcaaca gcaagtacaa agagggtcat 17640
actggctaag tcatcttacc aaatacacca caagtagatt gcacaatagt tatatcgat 17700
ttggttttcc ttcattagag aaggctctat atcataggta taacctcgtt gattcgagaa 17760
acggaccatt agtttctata acgagacacc ttgccctcct ccaaactgag atccgggagt 17820
tggttaactga ttataatcag ctgcgacaaa gtcgaacca gacttatcat ttcataaaaa 17880
catccaaggg acggataact aaactagtga atgattatct aagatttgag ttggttatac 17940

gggctcttaa aaataattct acatggcacc atgagttata ctgctacca gaacttatag 18000
gtgtttgcc tcatTTaT catacacgta actgtacatg cagtgaagg ttcctggttc 18060
aaactttata tctacacga atgagtgatg ctgagataaa acttatggac cggctcacca 18120
gcctagtcaa taTgtttct gaaggtttca ggtctagtTc agtctaattc taactgcacc 18180
aaaggctcta gaaatTTTT aaataaccag gtgtatatca aagtcaatac aagtgtaaaa 18240
acaatatgca agggaccaca tttaggatca gtttatTgac tcttccaata cacagagttg 18300
gaagcaccga ttcaaggttt ctaagacgct ctatcaatta tgttgataat gtaaataata 18360

gtttttctg tctattatga cttaaataaa catatctata acgaccatca cagctaagtc 18420
gttgccctag ttcataatT aaattaaaa ttggaagcta ggttaactct aattacataa 18480
gtattaagaa aaaattacta agactaatac tctcatgcca agaactagta atgtgtttca 18540
catgacagat tatttctaac actaaattgc aatttcaatt ttaaagctaa gtttaacacc 18600
tatacagcca aaatatttca tagggccgat gggaataaca taagaggaa atgatcaatg 18660
aaccttttat tccaactagg cagttgattg ataatctaca aattccataa gatgttctta 18720
cgatatcttt ttgtttttaa tctcaatgtc aatgatttaa taagtaataa taaaaaaatc 18780

acattaaaga tgcaggaaga tcttgacctc gccaggaaaa ttaagcgac acaaataaat 18840
taaaaaatct gtattttctc ttttttgtgt gtcc 18874

<210> 3

<211> 32315

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 3

catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt	60
ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt	120
gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg	180
gltgtgcgcg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgtttag	240
taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga	300
agtgaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tactgtaata gtaatcaatt	360
acggggtcat tagttcatag cccatataat gagttccgcg ttacataact tacggtaaat	420
ggcccgctg gctgaccgcc caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt	480
cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta ttacggtaa	540
actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc	600
aatgacggta aatggccgcg ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg ggactttcct	660
acttggcagt acatctacgt attagtcac gctattacca tggatgatgcg gttttggcag	720
tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccacccatt	780
gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac	840
aactccgcc cattgacga aatgggcggg aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc	900
agagctggtt tagtgaaccg tcagatccgc tagagatctg gtaccgtcga cgcggccgct	960
cgagcctaag ctgtgtaccg agctcggatc cactagtaac ggccgccagt gtgctggaat	1020
tcggcttaaa ggtaccaga gcagacagcc gccacatgg agtctccctc ggccctccc	1080
cacagatggt gcatccctg gcagaggtc ctgctcacag cctcattct aaccttctgg	1140
aaccgcccc cactgccaa gctcactatt gaatccagc cgttcaatgt cgcagagggg	1200
aaggaggtgc ttctacttgt ccacaatctg cccagcacc tttttggcta cagctggtac	1260
aaagtgaaa gagtggatgg caaccgtcaa attataggat atgtaatagg aactcaaaa	1320
gctacccag ggccgcata cagtggcga gagataatat accccaatgc atccctgctg	1380
atccagaaca tcatccagaa tgacacagga ttctacacc tacacgtcat aaagtcagat	1440
cttgtgaatg aagaagcaac tggccagttc cgggtatacc cggagctgcc caagccctcc	1500
atctccagca acaactcaa acccgtggag gacaaggatg ctgtggcctt cacctgtgaa	1560
cctgagactc aggacgcaac ctacctgtgg tgggtaaaca atcagagcct cccggtcagt	1620
cccaggctgc agctgtccaa tggcaacagg accctcactc tattcaatgt cacaagaaat	1680

gacacagcaa gctacaaatg tgaaacccag aaccagtgat gtgccaggcg cagtgtattca	1740
gtcatcctga atgtcctcta tggcccgat gccccacca tttccctct aaacacatct	1800
tacagatcag gggaaaatct gaacctctcc tgccacgcag cctctaacc accgtcacag	1860
tactcttggg ttgtcaatgg gactttccag caatccacc aagagctctt tatccccaac	1920
atcactgtga ataatagtgg atcctatacg tgccaagccc ataactcaga cactggcctc	1980
aataggacca cagtccagac gatcacagtc tatgcagagc cacccaaacc ctccatcacc	2040
agcaacaact ccaaccccggt ggaggatgag gatgctgtag ccttaacctg tgaacctgag	2100
attcagaaca caacctacct gtgggtgggta aataatcaga gcctcccggt cagtcccagg	2160
ctgcagctgt ccaatgacaa caggaccctc actctactca gtgtcacaag gaatgatgta	2220
ggaccctatg agtgtggaat ccagaacgaa ttaagtgttg accacagcga cccagtcac	2280
ctgaatgtcc tctatggccc agacgacccc accatttccc cctcatacac ctattaccgt	2340
ccaggggtga acctcagcct ctccctgcat gcagcctcta acccaccctgc acagtattct	2400
tggctgattg atgggaacat ccagcaacac acacaagagc tctttatctc caacatcact	2460
gagaagaaca gcggactcta tacctgccag gccaaataact cagccagtgg ccacagcagg	2520
actacagtca agacaatcac agtctctgcg gagctgccc agccctccat ctccagcaac	2580
aactccaaac ccgtggagga caaggatgct gtggccttca cctgtgaacc tgaggctcag	2640
aacacaacct acctgtggtg ggtaaatggt cagagcctcc cagtcagtcc caggctgcag	2700
ctgtccaatg gcaacaggac cctcactcta ttcaatgtca caagaaatga cgcaagagcc	2760
tatgtatgtg gaatccagaa ctcaagtgtg gcaaaccgca gtgaccagc caccctggat	2820
gtcctctatg ggccggacac ccccatcatt tccccccag actcgtctta cctttcgga	2880
gcggacctca acctctcctg ccactgggcc tctaaccat ccccgagta ttcttgccgt	2940
atcaatggga taccgcagca acacacacaa gtctcttcta tcgcaaaat cagccaaat	3000
aataacggga cctatgcctg tttgtctct aacttggtta ctggccgcaa taattccata	3060
gtcaagagca tcacagtctc tgcactgga acttctcctg gtctctcagc tggggccact	3120
gtcggcatca tgattggagt gctggttggg gttgctctga tatagcagcc ctggtgtagt	3180
ttcttcattt caggaagact gacagttgtt ttgcttctc cttaaagcat ttgcaacagc	3240
tacagtctaa aattgcttct ttaccaagga tattacaga aaagactctg accagagatc	3300
gagaccatcc tctagataag atatccgac caccgatct agataactga tcataatcag	3360
ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctccacacc tccccgaa	3420
cctgaaacat aaaaatgaatg caattgttgt tgttaacttg tttatgacg cttataatgg	3480

ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc	3540
tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttaacgc ggatctgggc gtggttaagg	3600
gtgggaaaga atatataagg tgggggtctt atgtagtitt gtatctgttt tgcagcagcc	3660
gccgccgcca ttagcaccaa ctctttgat ggaagcattg tgagctcata ttgacaacg	3720
cgcgcgccc catgggccgg ggtgcgtcag aatgtgatgg gctccagcat tgatgtcgc	3780
cccgctctgc ccgcaaactc tactaccttg acctacgaga ccgtgtctgg aacgccgttg	3840
gagactgcag cctccgccgc cgcttcagcc gctgcagcca ccgccgcgg gattgtgact	3900
gactttgctt tctgagccc gcttgcaagc agtgcagctt ccgcttcac cgccccgat	3960
gacaagtga cggctctttt ggcacaattg gattctttga cccgggaact taatgtcgtt	4020
tctcagcagc tgttgatct gcgccagcag gtttctgccc tgaaggcttc ctccctccc	4080
aatgcggttt aaaacataaa taaaaacca gactctgttt ggatttggat caagcaagt	4140
tcttgcgtgc ttattttagg ggttttgcgc gcgcggtagg cccgggacca gcggtctcgg	4200
tcgttgaggg tctgtgtat ttttccagg acgtggtaaa ggtgactctg gatgttcaga	4260
tacatgggca taagcccgct tctggggtgg aggtagcacc actgcagagc ttcattctgc	4320
ggggtggtgt tglagatgat ccagtcgtag caggagcgct gggcgtggtg ctaaaaatg	4380
tctttcagta gcaagctgat tgccaggggc aggcccttgg tgtaagtgtt tacaaagcgg	4440
ttaagctggg atgggtgcat acgtggggat atgagatgca tcttgactg tattttagg	4500
ttggctatgt tcccagccat atccctcgg ggattcatgt tgtgcagaac caccagcaca	4560
gtgtatccgg tgcacttggg aaatttgtca tglagcttag aaggaaatgc gtggaagaac	4620
ttggagacgc ccttgtgacc tccaagattt tccatgcatt cgtccataat gatggcaatg	4680
ggcccacggg cgccggcctg ggcgaagata tttctgggat cactaacgtc atagtgtgt	4740
tccaggatga gatcgtcata ggccattttt acaaagcgcg ggccgagggt gccagactgc	4800
ggtataatgg ttccatccgg ccaggggcg tagttacct cacagatttg catttccac	4860
gctttgagtt cagatggggg gatcatgtct acctgcgggg cgatgaagaa aacggtttcc	4920
ggggtagggg agatcagctg ggaagaaagc aggttctga gcagctgcga ctaccgcag	4980
ccggtgggcc cgtaaatcac acctattacc ggctgcaact ggtagttaag agagctgcag	5040
ctgccgtcat cctgagcag gggggccact tcgttaagca tgtccctgac tcgcatgttt	5100
tcctgacca aatccgccag aaggcgctcg ccgccagcg atagcagttc ttgcaaggaa	5160
gcaaagtttt tcaacggttt gagaccgtcc gccgtaggca tgcttttgag cgtttgacca	5220

agcagttcca ggcgggtccca cagctcggtc acctgctcta cggcatctcg atccagcata 5280
 tctcctcggt tgcggggttg gggcggcttt cgtgttacgg cagtagtcgg tgctcgtcca 5340
 gacgggccag ggtcatgtct ttccacgggc gcagggtcct cgtcagcgta gtctgggtca 5400
 cgggtgaaggg gtgcgctccg ggctgcgcgc tggccagggt gcgcttgagg ctggctctgc 5460
 tgggtgtgaa gcgctgccgg tcttcgccct gcgcgtcggc caggtagcat ttgacatgg 5520
 tgtcatagtc cagccccctc gggcggtggc ccttggcgcg cagcttgccc ttggaggagg 5580
 cgccgcacga ggggcagtcg agacttttga gggcgtagag cttgggcgcg agaaataccg 5640

 attccgggga gtaggcattc gcgccgcagg ccccgagac ggtctcgcat tccacagacc 5700
 aggtgagctc tggccgttcg gggtaaaaa ccaggtttcc cccatgcttt ttgatgcgtt 5760
 tcttacctct ggtttccatg agccgggtgtc cacgctcggg gacgaaaagg ctgtccgtgt 5820
 ccccgatac agacttgaga ggctgtcct cgagcggtgt tcccggttcc tctcgtata 5880
 gaaactcgga ccaactctgag acaaaggctc gcgtccaggc cagcacgaag gaggctaagt 5940
 gggaggggta gcggtcgttg tccactaggg ggtccactcg ctccagggtg tgaagacaca 6000
 tgtcgccctc ttcggcatca aggaagggtga ttggtttgta ggtgtaggcc acgtgaccgg 6060

 glgttctga aggggggcta taaaaggggg tgggggcgcg ttcgtcctca ctctcttccg 6120
 catcgtgtc tgcgagggcc agctgttggg gtgagtactc cctctgaaaa gcgggcatga 6180
 ctctgcgct aagattgtca gtttcaaaa acgaggagga tttgatattc acctggcccc 6240
 cggatgatcc tttaggggtg gccgcatcca tctggtcaga aaagacaatc tttttgttgt 6300
 caagcttggg ggcaaacgac ccgtagaggg cgttggacag caacttggcg atggagcgca 6360
 gggtttgggt ttgtcgcga tcggcgcgct ccttggccgc gatgtttagc tgcacgtatt 6420
 cgcgcgcaac gcaccgccat tcgggaaaga cgttggtgcg ctctcgggc accaggtgca 6480

 cgcgccaacc gcggttgtgc agggtgacaa ggtcaacgct ggtggctacc tctcccgta 6540
 ggcgctcgtt ggtccagcag aggcggccgc ccttgcgcga gcagaatggc ggtagggggt 6600
 ctactgcgt ctctccggg gggctctcgt ccacggtaaa gaccccggc agcaggcgcg 6660
 cgtcgaagta gtctatcttg catcttgca agtctagcgc ctgctgcat gcgcgggcgg 6720
 caagcgcgcg ctctatggg ttgagtgggg gaccccatgg catggggtgg gtgagcgcg 6780
 aggcgtacat gccgcaaat tcgtaaacgt agaggggctc tctgagtatt ccaagatatg 6840
 tagggtagca tcttccaccg cggatgctgg cgcgcacgta atcgtatagt tcgtgcgagg 6900

 gagcgaggag gtcgggaccg aggttgctac gggcgggctg ctctgctcgg aagactatct 6960
 gcctgaagat ggcatgtgag ttggatgata tggttggacg ctggaagacg ttgaagctgg 7020
 cgtctgtgag acctaccg cgacgcacga aggaggcgta ggagtcgcgc agcttgttga 7080

ccagctcggc ggtgacctgc acgtctaggg cgagtagtc cagggtttcc ttgatgatgt	7140
catacttata ctgtcccttt tttttccaca gctcgcggtt gaggacaaac tcttcgcggt	7200
ctttccagta ctcttggatc ggaaacccgt cggcctccga acggtaaagag cctagcatgt	7260
agaactgggt gacggcctgg taggcgcagc atcccttttc tacgggtagc gcgtatgcct	7320
gcgcggcctt ccggcatgac cagcatgaag ggcacgagct gcttccaaa ggccccatc	7380
caagtatagg tctctacatc gtaggtgaca aagagacgct cggtcgagg atgcgagccg	7440
atcgggaaga actggatctc ccgccaccaa ttggaggagt ggctattgat gtggtgaaag	7500
tagaagtccc tgcgacgggc cgaacactcg tgcctggcttt tgtaaaaacg tgcgcagtac	7560
tggcagcggg gcacgggctg tacatcctgc acgaggttga cctgacgacc gcgcacaagg	7620
aagcagagtg ggaattttag cccctcgcct ggccgggttg gctgggtggtc ttctacttcg	7680
gctgcttgtc cttgaccgtc tggctgctcg aggggagtta cggtggtatcg gaccaccacg	7740
ccgcgcgagc ccaaagtcca gatgtccgcg cgcggcggtc ggagcttgat gacaacatcg	7800
cgcagatggg agctgtccat ggtctggagc tcccgcggcg tcaggtcagg cgggagctcc	7860
tgcaggttta cctcgcatac acgggtcagg gcgcgggcta gatccaggtg atacctaatt	7920
tccaggggct ggttgggtgc ggcgtcgatg gcttgcaaga ggccgcatcc ccgcggcgcg	7980
actacggtac cgcgcggcgg gcggtgggcc gcgggggtgt ccttggatga tgcactaaa	8040
agcggtgacg cgggcgagcc cccggaggta gggggggctc cggaccgcc gggagagggg	8100
gcaggggcac gtcggcgccg cgcgcgggca ggagctggtg ctgcgcgct aggttgctgg	8160
cgaacgcgac gacgcggcgg ttgatctcct gaatctggcg cctctcgctg aagacgacgg	8220
gcccgttag ctigaacctg aaagagagt cgacagaatc aatttcggtg tcgttgacgg	8280
cggcctggcg caaaatctcc tgcacgtctc ctgagttgtc ttgataggcg atctcgcca	8340
tgaactgctc gatctcttcc tcctggagat ctccgctcc ggctcgctcc acggtggcgg	8400
cgaggtcgtt ggaaatgcgg gccatgagct gcgagaaggc gttgagcct ccctcgttcc	8460
agacgcggct gtagaccacg ccccttcgg catcgcgggc gcgcatgacc acctgcgca	8520
gattgagctc cacgtgccgg gcgaagacgg cgtagtctcg caggcgctga aagagtagt	8580
tgagggtggt ggcggttgt tctgccacga agaagtacat aaccagcgt cgcaactgg	8640
attcgttgat aattgttgt taggtactcc gccgccgagg gacctgagcg agtcgcac	8700
gaccggatcg gaaaacctct cgagaaaggc gtctaaccag tcacagtcgc aaggtaggct	8760
gagcaccgtg gcgggcggca gcgggcggcg gtcggggttg tttctggcgg aggtgctgct	8820
gatgatgtaa ttaaagtagg cggctcttag acggcggtat gtcgacagaa gcacatgtc	8880
cttgggtccg gcctgctgaa tgcgcaggcg gtcggccatg ccccggtt cgttttgaca	8940

tcggcgagg tcttttagt agtcttgcg gacgtttct accggcactt cttcttctcc	9000
ttctctttgt cctgcatctc ttgcatctat cgtgcggcg gcggcgaggt ttggccgtag	9060
gtggcgccct cttctccca tgcgtgtgac ccgaagccc ctcacggct gaagcagggc	9120
taggtcggcg acaacgcgt cggctaataat ggctgtctgc acctgcgtga gggtagactg	9180
gaagtcatcc atgtccaca agcgtgtgta tgcgccgtg ttgatggtt aagtgcagtt	9240
ggccataacg gaccagttaa cggctgtgtg acccggtgc gagagctcgg tgtacctgag	9300
acgcgagtaa gccctcaggt caaatcgtg gtctgtgcaa gtccgcacca ggtactggtg	9360
tcccacaaa aagtgcggcg gcggctggcg gtagaggggc cagcgtaggg tggccggggc	9420
tccggggcg agatcttcca acataaggcg atgatatccg tagatgtacc tggacatcca	9480
ggtgatgccg gcggcggttg tggaggcgcg cggaaagtc cggacgcggt tccagatgtt	9540
gcgcagggc aaaaagtgt ccatggtcgg gacgtcttg ccggtcaggc gcgcgcaatc	9600
gttgacgtc tagcgtgcaa aaggagagcc tgtaagcggg cactcttccg tggctgtgtg	9660
gataaatcgc caagggtatc atggcgagc accggggttc gagccccgta tccggccgtc	9720
cgccgtgac catgcgtta ccgcccggt gtgaaccca ggtgtgcgac gtcagacaac	9780
gggggagtg tcttttggc ttcttccag gcgcggcggc tgcgtcgcta gcttttttg	9840
ccactggcg gcgcagcgt aagcgttag gctggaaagc gaaagcatta agtggctcgc	9900
tcctgtagc cggagggtta tttccaagg gttgagtcgc gggacccccg gttcagttct	9960
cggaccggcc gactgcgc gaacgggggt ttgcctccc gtcattgcaag accccgcttg	10020
caaatctct cggaaacagg gacgagcccc tttttgctt ttcacagatg catccggtgc	10080
tgcggcagat gcgccccct cctcagcagc ggcaagagca agagcagcgg cagacatgca	10140
gggcaccct cctctctct accgcgtcag gaggggcgac atccgcggtt gacgcggcag	10200
cagatggtga ttacgaacc ccgcggcgcc ggccccggca ctacctggac ttggaggagg	10260
gcgaggccct ggcgcgcta ggagcgccct ctctgagcg gcaccaagg gtgcagctga	10320
agcgtgatac gcgtgaggcg tacgtgccgc ggcagaacct gtttcgcgac cgcgaggag	10380
aggagcccga ggagatgcgg gatcgaaagt tccacgcagg gcgcgagctg cggcatggcc	10440
tgaatcgca gcggttgctg cgcgaggagg actttgagcc cgacgcgca accgggatta	10500
gtcccgcg cgacacgtg gcggccgccc acctggtaac cgcatagag cagacggtga	10560
accaggagat taactttcaa aaaagcttta acaaccacgt gcgtacgtt gtggcgcgcg	10620
aggaggtggc tataggactg atgcatctgt gggaattgt aagcgcgctg gagcaaac	10680

caaataagcaa gccgctcatg gcgagctgt tccttatagt gcagcacagc agggacaacg	10740
aggcattcag ggatgcgctg ctaaacatag tagagcccga gggccgctgg ctgctcgatt	10800
tgataaacat cctgcagagc atagtgggtgc aggagcgag cttgagcctg gctgacaagg	10860
tggccgccat caactattcc atgcttagcc tgggcaagtt ttacgcccgc aagatatacc	10920
ataccctta cgttccata gacaaggagg taaagatcga ggggttctac atgcgcatgg	10980
cgctgaaggt gcttaccttg agcgacgacc tgggcgttta tcgcaacgag cgcatccaca	11040
aggccgtgag cgtgagccgg cggcgcgagc tcagcgaccg cgagctgatg cacagcctgc	11100
aaagggccct ggctggcacg ggcagcggcg atagagaggc cgagtcctac tttgacgcgg	11160
gcgctgacct gcgctgggcc ccaagccgac ggccttgga ggcagctggg gccggacctg	11220
ggctggcggg ggcacccgcg cgcgctggca acgtcggcgg cgtggaggaa tatgacgagg	11280
acgatgagta cgagccagag gacggcgagt actaagcggg gatgtttctg atcagatgat	11340
gcaagacgca acggaccgg cggtgcgggc ggcgctgcag agccagccgt ccggccttaa	11400
ctccacggac gactggcgcc aggtcatgga ccgcatcatg tcgctgactg cgcgcaatcc	11460
tgacgcgttc cggcagcagc cgcaggccaa ccggctctcc gcaattctgg aagcggtggt	11520
cccggcgcg cgaacccca cgcacagaaa ggtgctggcg atcgtaaacg cgctggccga	11580
aaacagggcc atccggcccg acgaggccgg cctggtctac gacgcgctgc ttcagcgct	11640
ggctcgttac aacagcggca acgtgcagac caacctggac cggctggtgg gggatgtgcg	11700
cgaggccgtg ggcagcgtg agcgcgcgca gcagcagggc aacctgggct ccatggttgc	11760
actaaacgcc ttctgagta cacagcccg caactgccc cggggacagg aggactacac	11820
caactttgtg agcgactgc ggctaattgt gactgagaca ccgcaaagt aggtgtacca	11880
gtctgggcca gactatttt tccagaccag tagacaaggc ctgcagaccg taaacctgag	11940
ccagctttc aaaaacttgc aggggctgtg gggggtgcgg gctcccacag gcgaccgcgc	12000
gaccgtgtct agcttgctga cgcccaactc ggcctgttg ctgctgctaa tagcgccctt	12060
cacggacagt ggcagcgtgt cccgggacac atacctaggt cacttgctga cactgtaccg	12120
cgaggccata ggtcaggcgc atgtggacga gcatacttcc caggagatta caagtgtcag	12180
ccgcgcgctg gggcaggagg acacgggcag cctggaggca accctaaact acctgtgac	12240
caaccggcgg cagaagatcc cctcgttgca cagtttaaac agcgaggagg agcgcatttt	12300
gcgtacgtg cagcagagcg tgagccttaa cctgatgcgc gacggggtaa cgcccagcgt	12360
ggcgtggac atgaccgcgc gcaacatgga accgggcatg tatgcctcaa accggccgtt	12420
tatcaaccgc ctaatggact acttgcacgc cgcggccgcc gtgaaccccg agtatctcac	12480
caatgccatc ttgaaccgc actggctacc gccccctggt ttctacaccg ggggattcga	12540

gggtccccgag ggtaacgatg gattcctctg ggacgacata gacgacagcg tgttttcccc	12600
gcaaccgcag accctgctag agttgcaaca gcgcgagcag gcagaggcgg cgtgcgaaa	12660
ggaaagcttc cgcaggccaa gcagcttctc cgtatctaggc gctgcggccc cgcggtcaga	12720
tgctagtagc ccatttccaa gcttgatagg gtctcttacc agcactcgca ccaccgccc	12780
gcgcctgctg ggcgaggagg agtacctaaa caactcgtg ctgcagccgc agcgcgaaaa	12840
aaacctgcct cgggcatttc ccaacaacgg gatagagagc ctatgggaca agatgagtag	12900
atggaagacg tacgcgcagg agcacaggga cgtgccaggc ccgcgcccgc ccaccgtcg	12960
tcaaaggcac gaccgtcagc ggggtctggt gtgggaggac gatgactcg cagacgacag	13020
cagcgtcctg gatttgggag ggagtggcaa cccgtttgcg caccttcgcc ccaggctggg	13080
gagaatgttt taaaaaaaa aaagcatgat gcaaaataaa aaactcacca aggccatggc	13140
accgagcgtt ggttttcttg tattccctt agtatgcggc gcgcggcgat gtataggaa	13200
ggtcctctc cctcctacga gagtgtgtg agcgcggcgc cagtggcggc ggcgctgggt	13260
tctccttcg atgtccctt ggaccgcgcg ttgtgcctc cgcggtacct ggcgcctacc	13320
ggggggagaa acagcatccg ttactctgag ttggcacccc tattcgacac caccgtgtg	13380
tacctggtgg acaacaagtc aacggatgtg gcatccctga actaccagaa cgaccacagc	13440
aactttctga ccacggtcat tcaaaacaat gactacagcc cgggggaggc aagcacacag	13500
accatcaatc ttgacgaccg gtcgactgg ggcggcgacc tgaaaacct cctgcatacc	13560
aacatgcaa atgtgaacga gttcatgtt accaataagt ttaaggcgcg ggtgatggtg	13620
tcgcgttgc ctactaagga caatcagggt gagctgaaat acgagtgggt ggagttcacg	13680
ctgcccagg gcaactactc cgagaccatg accatagacc ttatgaacaa cgcgatcgtg	13740
gagcactact tgaagtggg cagacagaac ggggttctgg aaagcgacat cggggtaaag	13800
tttgacacc gcaacttcag actggggttt gacccgtca ctggtcttgt catgcctggg	13860
gtatatacaa acgaagcctt ccatccagac atcattttgc tgccaggatg cggggtggac	13920
ttcacccaca gccgcctgag caactgttg ggcacccgca agcggcaacc cttccaggag	13980
ggcttttaga tcacctacga tgatctggag ggtggtaaca ttccgcact gttggatgtg	14040
gacgcctacc aggcgagctt gaaagatgac accgaacagg gcgggggtgg cgcaggcggc	14100
agcaacagca gtggcagcgg gcggaagag aactccaacg cggcagccgc ggcaatgcag	14160
ccggtggagg acatgaacga tcatgccatt cgcggcgaca cctttgccac acgggctgag	14220
gagaagcgcg ctgaggccga agcagcggcc gaagctgccg cccccgtgc gcaaccgag	14280
gtcgagaagc ctcagaagaa accggtgatc aaacctga cagaggacag caagaaacgc	14340
agttacaacc taataagcaa tgacagcacc ttaccagat accgcagctg gtacctgca	14400

tacaactacg gcgaccctca gaccggaatc cgctcatgga ccctgctttg cactcctgac	14460
gtaacctgcg gctcggagca ggtctactgg tcgttgccag acatgatgca agaccccgtg	14520
accttccgct ccacgcgcca gatcagcaac ttcccggtgg tgggcgccga gctgttgccc	14580
gtgcactcca agagcttcta caacgaccag gccgtctact cccaactcat cggccagttt	14640
acctctctga cccacgtgtt caatcgcttt cccgagaacc agattttggc ggcgccgcca	14700
gccccacca tcaccacgt cagtgaatac gtctctgctc tcacagatca cgggacgcta	14760
ccgctgcgca acagcatcgg aggagtccag cgagtgaaca ttactgacgc cagacgccgc	14820
acctgcccct acgtttacaa ggccctgggc atagtctgc cgcgctcct atcgagccgc	14880
actttttgag caagcatgtc catccttata tcgcccagca ataacacagg ctggggcctg	14940
cgcttcccaa gcaagatgtt tggcggggcc aagaagcgct ccgaccaaca cccagtgcgc	15000
gtgcgcgggc actaccgcgc gccctggggc gcgcacaaac gcggccgcac tgggcgcacc	15060
accgtcgatg acgccatcga cgcggtggtg gaggaggcgc gcaactacac gccacgccg	15120
ccaccagtgt ccacagtgga cgcgccatt cagaccgtgg tgcgcggagc ccggcgctat	15180
gctaaaaatga agagacggcg gaggcgcgta gcacgtcgcc accgccgcgc acccggcact	15240
gccgccaac gcgcggcggc ggccctgctt aaccgcgcac gtgcgaccgg ccgacgggcg	15300
gccatcgagg ccgctcgaag gctggccgcg ggtattgtca ctgtgcccc caggtccagg	15360
cgacgagcgg ccgccgcagc agccgcggcc attagtgtta tgactcaggg tcgcaggggc	15420
aacgtgtatt gggctgcgca ctcggttagc ggccctgcgcg tgcccgctgcg ccccccccc	15480
ccgcgcaact agattgcaag aaaaaactac ttagactcgt actgttgtat gtatccagcg	15540
gcggcggcgc gcaacgaagc tatgtccaag cgcaaatca aagaagagat gctccaggtc	15600
atcgcgccgg agatctatgg cccccgaag aaggaagagc aggattaca gccccaaaag	15660
ctaaagcggg tcaaaaagaa aaagaaagat gatgatgatg aacttgacga cgaggtggaa	15720
ctgtgcacg ctaccgcgcc caggcgacgg gtacagtgga aaggtcgacg cgtaaacgt	15780
gttttgacg ccggcaccac cgtagtcttt acgcccgtg agcgctccac ccgcacctac	15840
aagcgctgt atgatgaggt gtacggcgac gaggacctgc ttgagcaggc caacgagcgc	15900
ctcggggagt ttgcctacgg aaagcggcat aaggacatgc tggcgttgcc gctggacgag	15960
ggcaacccaa cacctagcct aaagcccgta aactgcagc aggtgctgcc cgcgcttgca	16020
ccgtccgaag aaaagcgcg cctaagcgc gactctgtg acttggcacc caccgtgcag	16080
ctgatggtac ccaagcgcca gcgactggaa gatgtcttgg aaaaaatgac cgtggaacct	16140

gggctggagc ccgaggtccg cgtgcggcca atcaagcagg tggcgccggg actgggcgtg	16200
cagacctgg acgttcagat acccactacc agtagcacca gtattgccac cgccacagag	16260
ggcatggaga cacaacgtc cccggttgcc tcagcgggtg cggaatgccgc ggtgcaggcg	16320
gtcgtcggg ccgctccaa gacctctacg gaggtgcaaa cggacccgtg gatgtttcgc	16380
gtttcagccc cccggcgccc gcgcggttcg aggaagtacg gcgccgccag cgcgctactg	16440
cccgaatatg cctacatcc ttccattgcg cctacccccg gctatcgtgg ctacacctac	16500
cgccccagaa gacgagcaac taccgcagc cgaaccacca ctggaaccg cgccgccgt	16560
cgccgtcgcc agcccggtct ggccccgatt tccgtgcga ggggtggctcg cgaaggaggc	16620
aggacctgg tgctgccaac agcgcgctac caccacagca tcgtttaaaa gccggtcttt	16680
gtggttcttg cagatatggc cctcacctgc cgcctccgtt tcccggtgcc gggattccga	16740
ggaagaatgc accgtaggag gggcatggcc ggccacggcc tgacggcgcg catgcgtcgt	16800
gcgcaccacc ggcgcgcgcg cgcgtcgac cgtcgcatgc gcggcggtat cctgcccctc	16860
cttattccac tgatcgccgc ggcgattggc gccgtgccc gaattgcatc cgtggccttg	16920
caggcgcaga gacactgatt aaaaacaagt tgcatgtgga aaaatcaaaa taaaaagtct	16980
ggactctcac gtcgcttg tctgttaact atttttaga atggaagaca tcaactttgc	17040
gtctctggcc ccgcgacag gtcgcgccc gttcatggga aactggcaag atacggcac	17100
cagcaatatg agcgggtggc ctttcagctg gggctcgtg tggagcggca ttaaaaattt	17160
cggttccacc gttagaact atggcagca ggccctggaac agcagcacag gccagatgct	17220
gagggataag ttgaaagagc aaaatttcca aaaaaagggt gtagatggcc tggcctctgg	17280
cattagcggg gtggtggacc tggccaacca ggcaagtcaa aataagatta acagtaagct	17340
tgatccccgc cttcccgtag aggagcctcc accggccgtg gagacagtgt ctccagaggg	17400
gcgtggcgaa aagcgtccgc gcccgcag ggaagaaact ctggtgacgc aaatagacga	17460
gcctccctcg tacgaggagg cactaaagca aggcctgccc accaccctgc ccatcgcgcc	17520
catggctacc ggagtgtgg gccagcacac acccgtaacg ctggacctgc cccccccgc	17580
cgacaccag cagaaacctg tgctgccagg cccgaccgc gttgtgttaa cccgtcctag	17640
ccgcgcgtcc ctgcgccgc cgcgcagcg tccgcatcg ttgcggccc tagccagtgg	17700
caactggcaa agcacactga acagcatcgt gggcttgggg gtgcaatccc tgaagcgccg	17760
acgatgcttc tgatagctaa cgtgtcgtat gtgtgtcatg tatgcgtcca tgtcgccgc	17820
agaggagctg ctgagccgcc gcgcgcccgc ttccaagat ggctaccct tcgatgatgc	17880
cgcagtggtc ttacatgcac atctcgggcc aggacgctc ggagtacctg agccccgggc	17940
tgggtgcagtt tgccgcgcc accgagacgt acttcagcct gaataacaag tttagaaacc	18000

ccacggtggc gcctacgcac gacgtgacca cagaccggtc ccagcgtttg acgctgcggt	18060
tcacccctgt ggaccgtgag gatactgcgt actcgtacaa ggcgcggttc accctagctg	18120
tgggtgataa ccgtgtgctg gacatggctt ccacgtactt tgacatccgc ggcgtgctgg	18180
acagggggccc tacttttaag ccctactctg gcactgccta caacgccctg gctcccaagg	18240
gtgccccaaa tccttgcgaa tgggatgaag ctgctactgc tcttgaaata aacctagaag	18300
aagaggacga tgacaacgaa gacgaagtag acgagcaagc tgagcagcaa aaaactcacg	18360
tatttgggca ggcgccctat tctggtataa atattacaaa ggagggtatt caaataggtg	18420
tcgaaggtca aacacctaaa tatgccgata aaacatttca acctgaacct caaataggag	18480
aatctcagtg gtacgaaaca gaaattaatc atgcagctgg gagagtccta aaaaagacta	18540
ccccaatgaa accatgttac ggttcataatg caaaaccac aaatgaaaat ggagggaag	18600
gcattcttgt aaagcaaca aatggaaagc tagaaagtca agtggaaatg caatttttct	18660
caactactga ggcagccgca ggcaatggtg ataacttgac tcctaaagtg gtattgtaca	18720
gtgaagatgt agatatagaa accccagaca ctcatatttc ttacatgccc actattaagg	18780
aaggtaactc acgagaacta atgggccaac aatctatgcc caacaggcct aattacattg	18840
cttttaggga caattttatt ggtctaatgt attacaacag cacgggtaat atgggtgttc	18900
tggcgggcca agcatcgag ttgaatgctg ttgtagattt gcaagacaga aacacagagc	18960
tttcatacca gcttttctt gattccattg gtgatagaac caggtacttt tctatgtgga	19020
atcaggctgt tgacagctat gatccagatg ttagaattat tgaaaatcat ggaactgaag	19080
atgaacttcc aaattactgc ttccactgg gaggtgtgat taatacagag actcttacca	19140
aggtaaaacc taaaacaggt caggaaaatg gatgggaaaa agatgctaca gaattttcag	19200
ataaaaaatga aataagagtt ggaaataatt ttgccatgga aatcaatcta aatgccaaac	19260
tgtggagaaa ttccctgtac tccaacatag cgtgtatatt gcccgacaag ctaaagtaca	19320
gtccttccaa cgtaaaaatt tctgataacc caaacaccta cgactacatg aacaagcgag	19380
tgggtgctcc cgggctagt gactgctaca ttaaccttgg agcacgtgg tcccttgact	19440
atatggacaa cgtcaacca tttaaccacc accgcaatgc tggcctgcgc taccgtcaa	19500
tgttgctggg caatggtcgc tatgtgccct tccacatcca ggtgcctcag aagttctttg	19560
ccattaaaaa cctccttctc ctgccgggct catacaccta cgagtggaaac ttcaggaagg	19620
atgttaacat ggttctgcag agctccctag gaaatgacct aagggttgac ggagccagca	19680
ttaagtttga tagcatttgc ctttacgcca ctttcttccc catggccac aacaccgcct	19740
ccacgttga ggccatgctt agaaacgaca ccaacgacca gtcccttaac gactatctct	19800
ccgccgcaa catgctctac cctataccg ccaacgtac caactgccc atatccatcc	19860

cctcccgaac ctggcgcggt ttccgcgggt gggccttcac gcgccttaag actaaggaaa	19920
ccccatcact gggtcgggc tacgacctt attacaccta ctctggctct atacctacc	19980
tagatggaac cttttacctc aaccacacct ttaagaaggt ggccattacc tttgactctt	20040
ctgtcagctg gcctggcaat gaccgcctgc ttaccccaa cgagtttgaa attaagcgct	20100
cagttgacgg ggagggttac aacgttgccc agtgaacat gaccaaagac tggttcctgg	20160
tacaaatgct agctaaactat aacattggct accagggtt ctatatcca gagagctaca	20220
aggaccgcat gtactccttc tttagaaact tccagcccat gagccgtcag gtggtggatg	20280
atactaaata caaggactac caacaggtgg gcatcctaca ccaacacaac aactctggat	20340
ttgttggcta ccttgcccc accatgcgcg aaggacaggc ctacctgct aacttccct	20400
atccgcttat aggcaagacc gcagttgaca gcattacca gaaaaagttt ctttgcgac	20460
gcacctttg gcgcatccca ttctccagta actttatgtc catgggcgca ctcacagacc	20520
tgggcaaaaa ctttctctac gccaaactcg cccacgcgt agacatgact tttgaggtgg	20580
atcccatgga cgagcccacc cttctttatg tttgtttga agtctttgac gtggtccgtg	20640
tgcaccagcc gcaccgcggc gtcacgaaa ccgtgtacct gcgcacgccc ttctcggcgg	20700
gcaacgccac aacataaaga agcaagcaac atcaacaaca gctgccgcca tgggctccag	20760
tgagcaggaa ctgaaagcca ttgtcaaaga tcttggttgt gggccatatt ttttggcac	20820
ctatgacaag cgctttccag gctttgtttc tccacacaag ctgcctgcg ccatagtcaa	20880
tacggccggt cgcgagactg ggggcgtaca ctggatggcc tttgcctgga acccgactc	20940
aaaaacatgc tacctctttg agccctttgg cttttctgac cagcgactca agcaggttta	21000
ccagtttag tacgagtcac tctgcgccg tagcgccatt gcttcttccc ccgaccgtg	21060
tataacgctg gaaaagtcca cccaaagcgt acaggggccc aactcggccg cctgtggact	21120
attctgctgc atgtttctcc acgcctttgc caactggccc caaactccca tggatcacia	21180
ccccaccatg aaccttatta ccgggggtacc caactccatg ctcaacagtc cccaggtaca	21240
gcccacctg cgtcgcaacc aggaacagct ctacagcttc ctggagcgcc actcgcccta	21300
cttccgcagc cacagtgcgc agattaggag cgccacttct tttgtcact tgaaaaacat	21360
gtaaaaaataa tgtactagag acactttcaa taaaggcaaa tgcttttatt tgtactct	21420
cgggtgatta tttaccccaa ccttgcctg ctgcgcgtt taaaaatcaa aggggttctg	21480
ccgcgcatcg ctatgcgcca ctggcaggga cacgttgca tactggtgt tagtgctcca	21540
cttaactca ggcacaacca tccgcggcag ctcggtgaag ttttactcc acaggtcgcg	21600

caccatcacc aacgcgttta gcaggtcggg cgccgatatc ttgaagtcgc agttggggcc	21660
tccgccctgc gcgcgcgagt tgcgatacac agggttgcag cactggaaca ctatcagcgc	21720
cgggtggtgc acgctggcca gcacgtcttt gtcggagatc agatccgcgt ccaggtcctc	21780
cgcgttgctc agggcgaacg gagtcaactt tggtagctgc cttcccaaaa agggcgcgtg	21840
cccaggcttt gaggttgact cgcaccgtag tggcatcaaa aggtgaccgt gcccgtctg	21900
ggcgtagga tacagcgctt gcataaaagc cttgatctgc ttaaaagcca cctgagcctt	21960
tgcgccttca gagaagaaca tgccgaaga cttgccggaa aactgattgg cggacaggc	22020
cgctcgtgc acgcagcacc ttgcgtcggg gttggagatc tgcaccacat ttcggcccca	22080
ccggttcttc acgatcttgg ctttctaga ctgctccttc agcgcgcgt gcccgttttc	22140
gtcgtcaca tccatttcaa tcacgtgctc cttatttacc ataagtcttc cgtgtagaca	22200
cttaagctcg ctttcgatct cagcgcagcg gtgcagccac aacgcgcagc ccgtgggctc	22260
gtgatgcttg taggtcacct ctgcaaacga ctgcaggtac gcctgcagga atcgcccat	22320
catcgtcaca aaggtcttgt tgcgtgtgaa ggtcagctgc aaccgcggg gtcctcgtt	22380
cagccaggtc ttgcatacgg ccgccagagc ttccacttgg tcaggcagta gtttgaagtt	22440
cgcccttaga tcgttatcca cgtgttactt gtccatcagc gcgcgcgcag cctccatgcc	22500
cttctccac gcagacacga tcggcacact cagcgggttc atcacgtaa tttcactttc	22560
cgcttcgtg ggctcttctt ctctctcttg cgtccgcata ccacgcgcca ctgggtcgtc	22620
ttcattcagc cgccgcactg tgcgcttacc tcctttgcca tgcttgatta gcaccgttg	22680
gttgctgaaa cccaccattt gtagcgccac atcttctctt tcttctcgc tgtccacgat	22740
tacctctgtt gatggcgggc gctcgggctt gggagaaggg cgcttctttt tcttcttggg	22800
cgcaatggcc aaatccgccg ccgaggtcga tggccgcggg ctgggtgtgc gcggcaccag	22860
cggtcttgt gatgagcttt cctcgtcttc ggactcgata cgccgcctca tccgtttttt	22920
tgggggcgcc cggggaggcg gcggcgacgg ggacggggac gacacgtcct ccatggttgg	22980
gggacgtcgc gccgcaccgc gtccgcgtc gggggtggtt tcgcgtgct cctcttccg	23040
actggccatt tcttctctt ataggcagaa aaagatcatg gagtcatgag agaagaagga	23100
cagcctaacc gccccctctg agttcgccac caccgcctcc accgatgcc ccaacgcgcc	23160
taccaccttc cccgtcaggg caccctcgt ttaggaggag gaagtgatta tcgagcagga	23220
cccaggtttt gtaagcgaag acgacgagga ccgctcagta ccaacagagg ataaaaagca	23280
agaccaggac aacgcagagg caaacgagga acaagtctgg cggggggacg aaaggcatgg	23340
cgactaccta gatgtgggag acgacgtgct gttgaagcat ctgcagcgcc agtgcgccat	23400
tatctgcgac gcgttgcaag agcgcagcga tgtgccctc gccatagcgg atgtcagcct	23460

tgccctacgaa cgccacatat tctcaccgcg cgtacccccc aaacgccaag aaaacggcac	23520
atgcgagccc aaccgcgcgc tcaacttcta ccccgatatt gccgtgccag aggtgcttgc	23580
cacctatcac atctttttcc aaaactgcaa gatacccta tctgcccgtg ccaaccgcag	23640
ccgagcggac aagcagctgg ccttgccgca gggcgctgtc atacctgata tcgcctcgct	23700
caacgaagtg caaaaaatct ttgagggctt tggacgcgac gagaagcgcg cggcaaacgc	23760
tctgcaacag gaaaacagcg aaaatgaaag tcaacttga gtgttggtgg aactcgaggg	23820
tgacaacgcg cgcctagccg tactaaaacg cagcatcgag gtcacccact ttgcctaccc	23880
ggcacttaac ctacccccca aggtcatgag cacagtcag agtgagctga tcgtgcgcgc	23940
tgcgcagccc ctggagaggg atgcaaattt gcaagaacaa acagaggagg gcctacccgc	24000
agttggcgac gagcagctag cgcgtggct tcaaacgcgc gagcctgccg acttgagga	24060
gcgacgcaaa ctaatgatgg ccgcagtgct cgttaccgtg gagcttgagt gcatgcagcg	24120
gttctttgct gaccgggaga tgcagcgcaa gctagaggaa acattgcact acacctttcg	24180
acagggtac gtacgccagg cctgcaagat ctccaacgtg gagctctgca acctggtctc	24240
ctaccttga attttgcag aaaaccgct tgggcaaac gtgttcatt ccacgtcaa	24300
gggcgagggc cgccgcgact acgtccgcga ctgcgtttac ttatttctat gctacacctg	24360
gcagacggcc atgggcgttt ggcagcagtg ctggaggag tgcaacctca aggagctgca	24420
gaaactgcta aagcaaaact tgaaggacct atggacggcc ttcaacgagc gctccgtggc	24480
cgcgcacctg gcggacatca ttttccccga acgctgctt aaaaccctgc aacagggtct	24540
gccagacttc accagtcaaa gcatgttgca gaactttagg aactttatcc tagagcgctc	24600
aggaatcttg cccgccacct gctgtgact tctagcgac tttgtgcca ttaagtaccg	24660
cgaatgccct ccgccgttt ggggccactg ctaccttctg cagctagcca actacctgc	24720
ctaccactct gacataatgg aagacgtgag cgttgacggt ctactggagt gtcactgtcg	24780
ctgcaacctg tgcacccgc accgtccct ggtttgcaat tcgcagctgc ttaacgaaag	24840
tcaaattatc ggtacctttg agctgcaggg tccctgcct gacgaaaagt ccgcggctcc	24900
ggggttgaaa ctactccgg ggctgtggac gtcggcttac cttcgcaaat ttgtacctga	24960
ggactaccac gcccacgaga ttaggttcta cgaagaccaa tcccggccgc ctaatgcgga	25020
gcttaccgcc tgcgtcatta cccaggcca cattcttggc caattgcaag ccatcaacaa	25080
agcccgcga gagtttctgc tacgaaagg acggggggtt tacttgacc ccagtcggg	25140
cgaggagctc aacccaatcc ccccgccgc gcagccctat cagcagcagc cgcgggccct	25200
tgcttccag gatggcacc aaaaagaagc tgcagctgcc gccgccacc acggacgagg	25260
aggaatactg ggacagtcag gcagaggagg ttttgacga ggaggaggag gacatgatgg	25320

aagactggga gacccatagac gaggaagctt ccgaggtcga agaggtgtca gacgaaacac	25380
cgtaaccctc ggtcgcattc cctcgcggcg cgtccagaa atcggaacc ggttcagca	25440
tggtacaaac ctccgtcctt caggcgccgc cggcactgcc cgttcgccga cccaaccgta	25500
gatgggacac cactggaacc agggccggta agtccaagca gccgccgccg ttagcccaag	25560
agcaacaaca gcgccaaggc taccgtcat ggccggggca caagaacgcc atagtgtctt	25620
gcttgcaaga ctgtgggggc aacatctcct tcgcccgcgc cttttcttc taccatcacg	25680
gcgtggcctt cccccgtaac atcctgcatt actaccgtca tctctacagc ccatactgca	25740
ccggcggcag cggcagcaac agcagcggcc acacagaagc aaaggcgacc ggatagcaag	25800
actctgacaa agcccaagaa atccacagcg gcggcagcag caggaggagg agcgtgcgt	25860
ctggcgccca acgaaccgtt atcgaccgc gagcttagaa acaggatttt tcccactctg	25920
tatgtatat ttcaacagag caggggcca gaacaagagc tgaaaataaa aaacaggtct	25980
ctgcgatccc tcaccgcag ctgcctgtat caaaaagcg aagatcagct tcggcgcacg	26040
ctggaagacg cggaggctct cttcagtaaa tactgcgcgc tgactcttaa ggactagttt	26100
cgcgcccttt ctcaatttta agcgcgaaaa ctacgtcatc tccagcggcc acaccggcg	26160
ccagcacctg ttgtcagcg cattatgagc aaggaaattc ccacgcccta catgtggagt	26220
taccagccac aaatgggact tgcggctgga gctgcccaag actactcaac ccgaataaac	26280
tacatgagcg cgggacccca catgatatcc cgggtcaacg gaatacgcg ccaccgaaac	26340
cgaattctcc tggaacagcg ggctattacc accacacctc gtaataacct taatccccgt	26400
agttggcccc ctgccctggt gtaccaggaa agtcccgctc ccaccactgt ggtacttccc	26460
agagacgccc aggccgaagt tcagatgact aactcagggg cgcagcttgc gggcggtttt	26520
cgtaacaggg tgcggctgcc cgggcagggt ataactcacc tgacaatcag agggcgaggt	26580
attcagctca acgacgagtc ggtgagctcc tcgcttggtc tccgtccgga cgggacattt	26640
cagatcggcg gcgccggccg ctcttcattc acgctcgtc aggcaatcct aactctgcag	26700
acctcgtcct ctgagccgcg ctctggaggc attggaactc tgcaatttat tgaggagttt	26760
gtgccatcgg tctactttaa ccccttctcg ggacctcccg gccactatcc ggatcaattt	26820
attcctaact ttgacgcggt aaaggactcg gcggacggct acgactgaat gtttaagtga	26880
gaggcagagc aactgcgctt gaaacacctg gtccactgct gccgccacaa gtgctttgcc	26940
cgcgactccg gtgagttttg ctactttgaa ttgcccagg atcatatcga gggcccggcg	27000
cacggcgctc ggcttaccgc ccaggagag ctgcccgtg gcctgattcg ggagtttacc	27060

cagcgccccc tgctagttga gcgggacagg ggaccctgtg ttctcactgt gatttgcaac	27120
tgtcctaacc ctggattaca tcaagatcct ctagttaatg tcaggtcgcc taagtcgatt	27180
aactagagta cccggggatc ttattccctt taactaataa aaaaaataa taaagcatca	27240
cttacttaaa atcagtttagc aaatttctgt ccagttttatt cagcagcacc tccttgcctt	27300
cctcccagct ctggtattgc agcttccctc tggctgcaaa ctttctccac aatctaaatg	27360
gaatgtcagt ttctctctgt tctgttccat ccgcacccac tatcttcatg ttgttgcaga	27420
tgaagcgcg c aagaccgtct gaagatacct tcaaccccggt gtatccatat gacacggaaa	27480
ccggtcctcc aactgtgcct tttcttactc ctccctttgt atccccaat gggtttcaag	27540
agagtcccc tgggttactc tctttgcgcc tatccgaacc tctagttacc tccaatggca	27600
tgcttgcgct caaaatgggc aacggcctct ctctggacga ggccggcaac cttacctccc	27660
aaaatgtaac cactgtgagc ccacctctca aaaaaaccaa gtcaaacata aacctggaaa	27720
tatctgcacc cctcacagtt acctcagaag ccctaactgt ggctgccgcc gcacctctaa	27780
tggtcgctgg caacacactc accatgcaat cacaggcccc gctaaccgtg cactactcca	27840
aacttagcat tgccacccaa ggaccctca cagtgtcaga aggaaagcta gccctgcaaa	27900
catcaggccc cctcaccacc accgatagca gtacccttac tatcactgcc tcacccctc	27960
taactactgc cactggtagc ttgggcattg acttgaaaga gccatttat acacaaaatg	28020
gaaaactagg actaaagtac ggggtctcctt tgcattgtaac agacgacct aacactttga	28080
ccgtagcaac tgggtccagg gtgactatta ataatacttc cttgcaaaact aaagtactg	28140
gagccttggg ttttgattca caaggcaata tgcaacttaa tgtagcagga ggactaagga	28200
ttgattctca aaacagacgc cttatacttg atgttagtta tccgtttgat gctcaaaacc	28260
aactaaatct aagactagga cagggccctc tttttataaa ctgagccac aacttggata	28320
ttaactacaa caaaggcctt tacttgttta cagcttcaaa caattccaaa aagcttgagg	28380
ttaacctaag cactgccaag gggttgatgt ttgacgtac agccatagcc attaatgcag	28440
gagatgggct tgaatttgggt tcacctaatg caccaaacc aaatcccctc aaaacaaaaa	28500
ttggccatgg cctagaattt gattcaaaca aggctatggt tcctaaacta ggaactggcc	28560
ttagttttga cagcacaggt gccattacag taggaaacaa aaataatgat aagctaactt	28620
tgtggaccac accagctcca tctcctaact gtagactaaa tgcagagaaa gatgctaaac	28680
tcactttggt cttaacaaaa tgtggcagtc aaatacttgc tacagtttca gttttggctg	28740
ttaaaggcag tttggctcca atatctggaa cagttcaaag tgctcatctt attataagat	28800
ttgacgaaaa tggagtgtca ctaaacatt ccttcttga cccagaatat tggaaactta	28860
gaaatggaga tcttactgaa ggcacagcct atacaaacgc tgttggattt atgcctaacc	28920

tatcagctta tccaaaatct cacggtaaaa ctgccaaaag taacattgtc agtcaagttt	28980
acttaaacgg agacaaaact aaacctgtaa cactaacat tacactaac ggtacacagg	29040
aaacaggaga cacaactcca agtgcatact ctatgtcatt ttcattgggac tggctctggcc	29100
acaactacat taatgaaata ttggccacat cctcttacac ttttccatac attgcccaag	29160
aataaagaat cgtttgtgtt atgtttcaac gtgtttatit ttcaattgca gaaaatttca	29220
agtcattttt cattcagtag tatagcccca ccaccacata gcttatacag atcacgtac	29280
cttaatacaa ctcacagaac ctagtattc aaactgccac ctccctcca acacacagag	29340
tacacagtcc tttctccccg gctggcctta aaaagcatca tatcatgggt aacagacata	29400
ttcttaggtg ttatattcca cacggtttcc tgtcgagcca aacgtctatc agtgatatta	29460
ataaactccc cgggcagctc acttaagttc atgtcgctgt ccagctgctg agccacaggc	29520
tgtgttccaa cttgcggttg cttaacgggc ggccaaggag aagtccacgc ctacatgggg	29580
gtagagtcac aatcgtgcat caggataggg cgggtgtgct gcagcagcgc gcgaataaac	29640
tgtgtccgcc gccgtccgt cctgcaggaa tacaacatgg cagtggctctc ctcagcgatg	29700
attcgaccgc cccgcagcat aaggcgctt gtccctcggg cacagcagcg caccctgatc	29760
tcacttaaat cagcacagta actgcagcac agcaccacaa tattgttcaa aatcccacag	29820
tgcaaggcgc tgtatccaaa gtcctggcg gggaccacag aaccacgtg gccatcatac	29880
cacaagcgca ggtagattaa gtggcgacc ctcataaaca cgtggacat aaacattacc	29940
tcttttggca tgttgtaatt caccacctcc cggtaaccata taaacctctg attaaacatg	30000
gcgccatcca ccaccatcct aaaccagctg gccaaaacct gccgcgcgc tatacactgc	30060
agggaaccgg gactggaaca atgacagtgg agagcccagg actcgtaacc atggatcatc	30120
atgctcgta tgatatcaat gttggcaca cacaggcaca cgtgcataca ctctctcagg	30180
attacaagct cctcccgcgt tagaaccata tcccaggga caaccattc ctgaatcagc	30240
glaaatccca cactgcaggg aagacctgc acgtaactca cgttgtgcat tgtcaaagtg	30300
ttacattcgg gcagcagcgg atgacctcc agtatgtag cgcgggttctc tgtctcaaaa	30360
ggaggtagac gatccctact gtacggagtg cgccgagaca accgagatcg tgttggtcgt	30420
agtgtcatgc caaatggaac gccggacgta gtcataattc ctgaagcaaa accaggtgcg	30480
ggcgtgacaa acagatctgc gtctccggtc tcgccctta gatcgctctg ttagtagtt	30540
gtagtatatc cactctctca aagcatccag gcgccccctg gcttcgggtt ctatgtaaac	30600
tccttcatgc gccgtgccc tgataacatc caccaccgca gaataagcca caccagcca	30660
acctacacat tcgttctcgg agtcacacac gggaggagcg ggaagagctg gaagaacct	30720
gttttttttt ttattccaaa agattatcca aaacctcaaa atgaagatct attaatgaa	30780

cgcgctcccc tccggtggcg tgggtcaaact ctacagccaa agaacagata atggcatttg 30840

taagatgttg cacaatggct tccaaaaggc aaacggccct caggtccaag tggacgtaaa 30900

ggctaaacct ttcagggtga atctcctcta taaacattcc agcaccttca accatgcccc 30960

aataattctc atctcgccac cttctcaata tatctctaag caaatcccga atattaagtc 31020

cggccattgt aaaaatctgc tccagagcgc cctccacctt cagcctcaag cagcgaatca 31080

tgattgcaaa aattcaggtt cctcacagac ctgtataaga ttcaaaagcg gaacattaac 31140

aaaaataccg cgatcccgta ggtcccttcg cagggccagc tgaacataat cgtgcaggtc 31200

tgacaggacc agcgcggcca cttccccgcc aggaaccatg acaaaagaac ccacactgat 31260

tatgacacgc atactcggag ctatgctaac cagcgtagcc ccgatgtaag cttgttgcat 31320

gggcggcgat ataaaatgca aggtgctgct caaaaaatca ggcaaagcct cgcgcaaaaa 31380

agaaagcaca tcgtagtcat gctcatgcag ataaaggcag gtaagctccg gaaccaccac 31440

agaaaaagac accatttttc tctcaacat gtctcggggt ttctgcataa acacaaaata 31500

aaataacaaa aaaacattta aacattagaa gcctgtctta caacaggaaa aacaaccctt 31560

ataagcataa gacggactac ggccatgccg gcgtgaccgt aaaaaaactg gtcaccgtga 31620

ttaaaaagca ccaccgacag ctctcgggtc atgtccggag tcataatgta agactcggtg 31680

aacacatcag gttgattcac atcggtcagt gctaaaaagc gaccgaaata gcccggggga 31740

atacatacc gcaggcgtag agacaacatt acagccccc taggaggtat aacaaaatta 31800

ataggagaga aaaacacata aacacctgaa aaacctcct gcctaggcaa aatagcaccc 31860

tcccgtcca gaacaacata cagcgttcc acagcggcag ccataacagt cagccttacc 31920

agtaaaaaag aaaacctatt aaaaaaacac cactcgacac ggcaccagct caatcagtca 31980

cagtgtaaaa aaggccaag tgcagagcga gtatatatag gactaaaaaa tgacgtaacg 32040

gttaaagtcc acaaaaaaca cccagaaaac cgcacgcgaa cctacgccca gaaacgaaag 32100

ccaaaaacc cacaacttcc tcaaatcgtc acttcggtt tcccagttg cgtcacttcc 32160

cattttaaga aaactacaat tcccaacaca tacaagttac tccgcctaa aacctacgtc 32220

accgccccg ttcccacgcc ccgcgccacg tcacaaactc caccacctca ttatcatatt 32280

ggcttcaatc caaaataagg tatattattg atgat 32315

<210> 4

<211> 18935

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 4

cggacacaca aaaagaaaga aggttttttg atctttattg tgtgcgaata actatgagga	60
agattaataa ttttcctctc attgacacit acattaagat taagattctc attgatctgt	120
tacttactct gaggataata attggtgttc agaagtaccc cattccccag tgggggcaaa	180
gacagtccaa aagactcaac ttgtcctatt caactaatct gttttgtctc agtagttcac	240
atattgatca taccaggagg ttggacctaa ttccaaagct tagagtggga cctagtgtat	300
cctcggggct gtaataata cagccattta acacataaca agccctactg ttttcttgtt	360
ttgccgtgca tttagaataa gagacaacit aaacctccga ttcggaaca cagggaataa	420
tctcaccaga cccggcagtg tcttcaggct tcatagcccc aagatggaga gtcgggcccc	480
caaagcatgg atgacgcaca ccgcatcagg ttctgaaaca gattaccata agattttaac	540
agcaggattg tcagtccaac aaggcattgt gagacaacgg gtcattcaag tccaccagg	600
tacaaaccta gaagaaatat gccaatgat cattcaagcc tttgaagctg gtgttgattt	660
tcaagagagt gcagacagtt tcttgctgat gctatgttta catcatgctt atcagggtga	720
ctacaagcaa ttcttggaaa gcaatgcagt caagtacctt gagggtcatt gctttcgctt	780
tgaggtcagg aaaaaggaag gagtcaagcg actcgaagaa ttgcttcttg ctgcatccag	840
tggcaagagc atcaggagaa cactggctgc aatgcctgaa gaggagacaa cagaagcaaa	900
tgccggacag ttctctcttt ttgctagctt atttcttctt aagctagtgt tcggagaaaa	960
agcctgtcta gaaaagggtgc agcggcaaat tcaagttcat tctgagcagg gattgatcca	1020
ataccacaca gcctggcagt cagttggaca catgatggtc attttcagac tgatgagaac	1080
aaattttcta attaatgttc tctttataca tcaagggatg catatggttag caggacacga	1140
tgctaacgat gctgtcatcg caaactctgt agctcaagca cgtttttcag gattattgat	1200
cgttaaaaca gtgctagatc acatccttca gaaaacagag cacggagtgc gctttcatcc	1260
tttggcaaga actgctaagg tcaagaacga agtaaatcc ttttaaggctg cccttagctc	1320
gctagcacia catggagagt atgctccttt tgctcgcttg ctgaatcttt ctggagtcaa	1380
caatctcgag cacggactgt ttctcagct ttctgcaatt gccctagggtg tcgcaacggc	1440
acacggcagt accctggcag gagtaaatgt gggggaacag tatcagcaac tacgagaagc	1500
agccactgag gcagaaaaac aattgcagaa atacgctgaa tctcgcgagc ttgaccatct	1560
aggtctcgat gatcaagaga agaagatctt gaaagacttc catcagaaga aaaatgaaat	1620
cagcttccag cagacaacag ccatggtcac actacggaag gaaaggctag ccaagctcac	1680

tgaggcaatc acctccacat cccttctcaa gacaggaaaa cagtatgatg atgacaacga	1740
tatccccctt cctgggcccc tcaatgataa cgaaaactca gaacagcaag acgatgatcc	1800
aacagattct caggacacta ccatccctga tatcattggt gacccgatg atggcagata	1860
caacaattat ggagactatc ctagtgagac ggcgaaatgcc cctgaagacc ttgttctttt	1920
tgaccttgaa gatgggtgacg aggatgatca ccgaccgtca agttcatcag agaacaacaa	1980
caaacacagt cttacaggaa ctgacagtaa caaacaagt aactggaatc gaaacccgac	2040
taatatgcca aagaaagact ccacacaaaa caatgacaat cctgcacagc gggtcaaga	2100
atacgccagg gataacatcc aggatacacc aacaccccat cgagctctaa ctcccatcag	2160
cgaagaaacc ggctccaatg gtcacaatga agatgacatt gatagcatcc ctcccttgga	2220
atcagacgaa gaaaacaaca ctgagacaac cattaccacc aaaaaaata ccaactgctcc	2280
accagcacct gtttatcgga gtaattcaga aaaggagccc ctcccgcaag aaaaatccca	2340
gaagcaacca aaccaagtga gtggtagtga gaataccgac aataaacctc actcagagca	2400
atcagtggaa gaaatgtatc gacacatcct ccaaacacaa ggaccatttg atgccatcct	2460
atactattac atgatgacgg aggagccgat tgtctttagc actagtgatg ggaaagaata	2520
cgtataccct gattctcttg aaggggagca tccaccgtgg ctcagtgaag aagaggcctt	2580
gaatgaggac aataggttta tcacaatgga tgatcaacaa ttctactggc ctgtaatgaa	2640
tcacaggaac aaattcatgg ctatccttca gcaccacaag taatttcttc ataatgacag	2700
atcattgtaa ggttattacc accatccctg caacaaagca tgaaaaccac actcaacaac	2760
gccctaccac aggatacctt ggagaccata caccaagatc agcagctgtg caaccacccc	2820
catgcgaatc caccaccaca accacaaaac aataatccca agaccaaacc gcacacatcc	2880
agatcaaccc aaacctcaa acaccacccc actccgcat cccagaccaa actccgcccc	2940
agacaagcac cccaccatc ccagaaaccg cagggccgag aatcgatccc cagcattcaa	3000
aatgcgttat taagaaaaaa catatgatga agattaaaac cttcatcaac attgcacaga	3060
ctttgacatc taggagttta ttctagctat ctacaaaacg ggtccaaaac ggaatgattt	3120
ccactagggc tgcagcaatc aatgatcctt cattaccaat cagaaaccag tgtacacgtg	3180
gccctgaact atcaggatgg atctccgaac aattaatgac aggcaaaatt ccggtacatg	3240
aaatcttcaa cgacactgag cccacataa gctcagggtc cgactgcctt cccagaccca	3300
aaaacacggc cccccggact cgcaacaccc agacacagac cgatccggtt tgcaatcaca	3360
atthtgaaga cgttacacaa gcactaacat cattaaccaa tgtcatacaa aaacaggctc	3420

ttaacttaga gtctctcgaa caacgcatca tagatctaga gaatggctta aagccaatgt	3480
atgacatggc taaagtcatt tctgcattga atagatcttg tgctgagatg gtagcaaaat	3540
atgatctcct ggtgatgaca actggccgcg caaccgccac cgccgctgca actgaggctt	3600
attgggagga acatggacaa ccaccacctg gaccatcact ttatgaagag agtgcgatta	3660
gaggcaagat taacaagcaa gaggataaag tacctaagga agttcaagaa gcttttcgta	3720
atctggacag taccagctca ctaacagaag agaactttgg caagccagat atatctgcaa	3780
aggacctacg agacatcatg tatgaccacc taccaggctt cggtacggct ttccaccaac	3840
tggtccaggt aatttgcaag ctaggaaaag acaattctgc attggacatt attcatgctg	3900
agttccaagc cagccttgct gaaggtgatt ctcccaatg tgcctgatc caaataacaa	3960
aacggatccc catcttcag gatgccactc cgcccacaat tcacatccgc tctcgtggtg	4020
acatcccacg tgcctgccaa aaaagtctcc gtccagttcc tccatcacca aaaatagaca	4080
gaggttgggt ttgcattttc caattgcagg acgggaagac acttgggctc aagatatagg	4140
gtccccagt caaagacacg tgcggtccca tcctccctca cttcagaca tcaacgatg	4200
gcagtcccaa acaccggtga gggaggcgcc cggcgacaac acatgatgat aggctgatct	4260
tcgggataag agacatgaaa aacaaaaag ccgtttacat ccagatccaa gatcaagagt	4320
ggcttggaaa taaggggcac ttgttctttg tctcaaagga cttacaaaaa caagggtgat	4380
gaagattaag aaaaagcctc cttcagttgc aaggagctaa ttcttaaaac ttcattctaga	4440
ctaaggataa atcgattcca atcacgatga ggagaatcat cctaccacg gcaccacctg	4500
aatacatgga ggcgtgttac ccaatgagaa caatgaattc tggtgcagac aacactgcc	4560
gtggccctaa ttacacaaca actggtgtga tgacaaatga tactccctct aattcactcc	4620
gaccagtgc agatgataat attgatcatc cgagccacac gcctaacagt gttgcctctg	4680
catttatatt ggaagctatg gtgaatgtaa tatctggccc gaaagtgtg atgaagcaaa	4740
tccaatctg gcttcctctg ggtgtctctg accagaagac atatagcttt gattcaacca	4800
ctgctgccat tatgctagca tcatatacca tcactcattt tggcaaaacc tcaaattccc	4860
ttgtgagaat caaccgactt ggtcctggca tacctgatca cccactacga ctccaaagaa	4920
taggaaatca agccttccta caagagtttg tgctacctcc tgtacaactg ccacaatact	4980
tcacttttga tctgacagcg ctgaagctga tcaccagcc actcccagcg gcaacctgga	5040
cagatgaaac tccagctgtg tcaactggca cgtccgccc agggatctca ttccatccca	5100
aattaaggcc tatcctgcta ccaggaagag ctggaaagaa gggctccaac tccgatctaa	5160
catctcctga caaaatccag gctataatga atttctaca agacctcaaa attgtaccaa	5220
tcgatccaac caagaatatc atgggtattg aagtgccaga actcctggtt cacaggctga	5280

ctgggaagaa gacaactacc aagaatggtc aaccaatcat tccaattctg ctaccaaagt	5340
acattggtct tgatcctcta tctcaagggtg atctcacaat ggtgatcact caggactgtg	5400
attcctgcc a cccccggcc agtcttcccc cagtcaatga aaaatgacca tgagactcaa	5460
catcacactg ccagagcacc tcaccgcaag tctatacaac aatcaacccc ggcatctaca	5520
acctgcaaaa accagcccat ctgatactcc tggcatcggg ggcaagacaa ggcagccaag	5580
cagcagcccc cgagccgagc ccaaaccat tacaccgag cccaacaccc atccagcaac	5640
ccacaaccgt caaacgcaca gatggacaag caaagaacat caagccagga gcaacacaga	5700
ccccaagtct aagctgatca accctcccc caatcccacc aacgccagca aaaatcccc	5760
aactcgatac caacccaag caaatcagct caaacgtct atctctcccc gcttcactcc	5820
acaccccaga ttcagcaaac gatcaacgca cttcttatgc cacagcttat attaagaaaa	5880
agaacttgat gaagattaag gcaaccagtg gtgctatctt catctctttg atttgagtct	5940
taagtgaata cacaggttct aatactgttc ttctgtccaa cggataatt cagccaggcc	6000
taagacagta gctaatacaca gtcatcatgg gagcgtcagg gattctgcaa ttgccccgtg	6060
agcgcttcag gaaaacatct ttctttgttt gggtataaat cctattccat aaagtctttt	6120
caatcccgtt gggggttgta cacaacaata ccctacaagt gagtgatatt gacaagtttg	6180
tgtgccgaga caaactctct tcaactagcc aattgaagtc agtcgggttg aacttgagg	6240
gcaatggagt agcaactgat gtaccaacgg caacaaaaag atggggtttt cgagctgggtg	6300
ttccacaaa ggtggtaaat tgcgaagctg gagaatgggc tgagaactgt tataacctgg	6360
ctataaagaa agttgatggt agtgagtgcc taccagaagc ccctgaggga gtgagggatt	6420
ttccccgttg ccgtatgta cacaagtct caggaactgg accatgccca ggaggactcg	6480
cttttcaaa agaaggagcc ttcttctgt atgaccgact cgcatcaaca atcatttate	6540
ggggtacaac ctttgccgaa ggagttattg catttctgat cttgcctaag gcgcgaaagg	6600
atTTTTTcca gtctctcca ttgcatgagc ctgccaacat gaccacggat ccctccagtt	6660
actatcacac gacaacaata aactacgtgg ttgataattt tggaaccaac accacagagt	6720
ttctgttcca agtcgatcat ttgacgtatg tgcagctcga ggcaagattc acaccacaat	6780
tccttgtcct cctaaatgaa accatctact ctgataaccg cagaagtaac acaacaggaa	6840
aactaatctg gaaaataaat cccactgttg ataccagcat gggtagtggt gctttctggg	6900
aaaataaaaa aacttcaaa aaacctttc aagtgaagag ttgtctttcg tacctgtacc	6960
agaaaccag aaccagggtc ttgacacgac agcgacggtc tctctcca tctccgcca	7020
caaccagca gccgaagacc acaagaatt ggtttcagag gattccactc cagtgttca	7080
gatgcaaaac atcaagggaaggaggacacaaat gccaccaca gtgacgggtg taccaacaac	7140

cacacccctct ccatttccaa tcaatgctcg caacactgat cataccaaat catttatcgg	7200
cctggagggg cccaagaag accacagcac cacacagcct gccaaagacca ccagccaacc	7260
aaccaacagc acagaatcga cgacactaaa cccaacatca gagccctcca gtagaggcac	7320
gggaccatcc agccccacgg tccccaacac cacagaaagc cagccgaac ttggcaagac	7380
aacccaacc acactcccag aacagcacac tgccgccagt gccattccaa gagccgtgca	7440
ccccgacgaa ctcagtggac ctggttctt gacgaacaca atacgggggg ttacaaatct	7500
cctgacagga tccagaagaa agcgaaggga tgtcactccc aatacacaac ccaaagcaa	7560
cccaaacctg cactattgga cagccttgga tgagggtgct gccataggtt tagcctggat	7620
accatacttc gggccagcag ctgagggaat ttacactgaa ggcataatgg agaataaaaa	7680
tggattgac tgtggattga ggcagctggc caacgaaacg acacaagctc ttcaattgtt	7740
cttaaggga actactgagt tgcgtacatt ctctatacta aatcggaag caatagactt	7800
cttgctccaa agatggggag gaacatgtca cattctaggg cctgattgtt gcattgaacc	7860
ccaagattgg accaaaaata tctactgataa aattgatcaa ataatccatg actttgtcga	7920
taataatctt ccaaatacga atgatggcag caactggtgg actggatgga aacaatgggt	7980
tcctgctgga ataggaatca caggagtaat cattgctatt attgctttgc tgtgcatttg	8040
caaattcatg ctttgaacta atatagcatc atactttcta atattcccc aatatgaatt	8100
tttgttttcg attttattta atgatatac ctctgtatac ctactaatg tactcgagca	8160
taatttcct gatagacttg attgtatttg atgattaagg acctcacaaa attcctgggg	8220
attgaaaaga actggataac tcaataaatt ttatgctagg accacaaata cacttgatga	8280
agattaagaa aaagataatc ttatgattat cattgatctt catctatacc ttaaatactc	8340
tattcaagga gagtatgaca aaaccaagta gtattggata aacttgctct gcattcaaat	8400
ctgaagacat acggcttacc tattcactat tgtattagaa aatctagga atatcatttg	8460
aaactaatta gtgactaaaa cacacaactc aagtcggcca gaatggaagt tgttcatgaa	8520
agaggtcgt ccaggatctc ccgacaaaac acaagggatg gacctagtca tttagtacgg	8580
gcgagatcat cctctcgagc tagttatcga agtgaatacc atacaccaag gagtgcctcg	8640
cagatccgtg tccccactgt ctttcatcgg aaaaagacag atttattgac agttccacca	8700
gcacctaag atgtatgcc gactttaag aaagggttc tatgtgacag caatttctgt	8760
aaaaaggatc accaacttga aagcttaaca gatagagagt tactcttgct gattgcacgc	8820
aagacatgtg gatccacgga acaacaacta agcatagttg ctccaaaaga ttcacgtctg	8880

gctaataccta ttgctgagga tttccaacaa aaagatgggc ctaaggtaac actgtcgatg	8940
cttatagaga cagcagagta ttggtccaaa caggacatta agaacatcga tgattcaaga	9000
ttaagagctt tattgacctt ttgtgctgtt atgacgcgca aattttcaaa atctcaactt	9060
agcttgctat gtgaaagcca cttacggcga gaaggacttg gtcaagacca atcagagtca	9120
gttctggagg tatatcaacg cttacacagc gataaagggt ggaatttcga ggcagcacta	9180
tggcagcagt gggatcggca atcattgata atgttcataa cagcatTTTT aaatattgca	9240
ttacaattac catgtgagag ttcatctgtt gttatttcag gtttgagaat gctgataccc	9300
cagtcggaag ccaactgaggt tgtaaccccc tccgaaacct gcacatggtc agaaggagga	9360
agttccatt gaagcccaa atcacaaaggc gagctaaaaa atcccttttg aacatgcata	9420
acatcacata caatttcaaa ggcattggaa taaatgggtga tttcaggaag attagtgttt	9480
gccctcaaaa tcagatccga gcaataatca tctactctac agccagttaa tttctaatat	9540
aaaggttaaa aaaatgtgc aggccagctt ttgttcaca ggtccaatt ctcttgta	9600
aattgtagga gctagcaca gtgatgcaat taaatgatac tagtatatac aatgccacca	9660
acttaattct aagattttgt atatctcgga aattcaaaat taaatgctac gttattgatt	9720
caattaagaa aaagacaatg gaccatcaaa attagttaa tactgaact aatgcactta	9780
tagaaacagg agaaccagcc agacagcaga caaataacaa tgaaccaca tatgttactg	9840
ctataatgaa gttcgttaat tcaaaaacaa atgatgaaga ttaatgcaga tgtctaaagg	9900
ataaacactc catgcatcag tggtataatt gggctctgta gaaaatcttc atctctcca	9960
acctacctca aagaaggatt ttaccgcgat tgggagtta aacgacaata gggacaacca	10020
cctttgacac tagccaagct tgtcgtgggc acacagcatt ttatcttgca acgtcgacat	10080
tcccatcaat ctgaggagta acagctatca aaacaacgca tatgtagaca ttgtcggtaa	10140
tagtactgcc taagacaact atttataata acagttggaa ttcatTTTT caccgaagct	10200
attctcaagt taacagtga aacaggactc gaccaggac aactccgat acgtaacata	10260
agaaaagaac aacccttgac ccagagtga caagctcata ctatcaagc taatctcgg	10320
gcctgcctgg agtcacaaat ggccaaggct actgggaggt acaaccttat ctcccaaag	10380
aaagatcttg aaaaagggt ggttctgaat gacctttgca ctctctcagt ggcccagacg	10440
gtccagggat ggaaggttac ctgggctggg attgaatttg atgttacaca gaaagggatg	10500
gccttattgc acaggctcaa gaccagtga tttgtccag cctggtcaat gaccaggaac	10560
ttatttcac atctcttca aaaccgaac tctacaattg agtcgccact ttgggcactg	10620
cgggtcatac tagcagcagg tattcaagat cagctaattg atcaatcgtt gatcgaaccc	10680
ttggcaggag cgctaggctt aattgctgat tggcttctta ctactggaac aaaccacttt	10740

caaatgcgca cacaacaggc taaggagcaa ctaagtctaa aaatgttgtc cctgggtgcga	10800
tcaaacatcc taaagttcat caaccaacta gatgcactac atgttgtgaa ttacaatgga	10860
cttctcagta gcattgaaat tggcaccaaa agccatacaa ttataattac ccggacaaat	10920
atgggttttt tggtagagtt gcaagagcct gacaaatcag ccatgaacac cagaaaacca	10980
ggaccagtca aattctccct cctccatgaa tcaaccttga agacacttgc taaaaaacct	11040
gcgaccacga tgcaagcact aatcttagaa ttcaatagtt ctctcgctat ttaactcaac	11100
tcatcaaaat gctaacttgt gatccttaag ctgcacctta gacttttgat aagaatacta	11160
actattgatg attgtctttg acatgaggat aagaacactg cccttagat agatgggggtt	11220
caccattaat acacaattac ccaatcatgt taacagcagt tagatccctc aagtatatca	11280
agttcattct accctttgca ttgtcactct aattaaatca cctgatacaa ttatgttaat	11340
tagctagatt ctctcatttt tagacttggt tgctagaata attgatcatc cacttgatta	11400
cacatccaac taggggtctag ttcatagatt gctaataatc tttagttaa tactaatgac	11460
aaagagatta gattagctat agcttgagga agattaagaa aaagtgtctg tgggggtcttt	11520
ccgtgtagaa gggcacacag ccataattct tcctctttat acaacatggc tacacaacat	11580
acgcaatatc cagacgcaag gttatcatca cctatagttt tagatcagtg tgatcttgtc	11640
actcgtgctt gtggattgta ttccgcatac tccttaaate cccaactaaa gaactgtaga	11700
ctaccgaaac atatataccg actaaaatat gacaccactg ttacagagtt tttgagtgat	11760
gtgccggtag caacattgcc agcggatttt ttagtaccta catttcttag gactctatca	11820
ggaaatggtt ctgttccaat tgatccaaaa tgcagtcaat ttttagaaga aattgtcaat	11880
tatactctac aagatattcg ctctctaaac tattacctca atcgagccgg agtgcataac	11940
gatcatgtgg atagggattt tggacaaaaa attcgcaatc taatttgca caatgaggtt	12000
ttacatcaaa tgtttcactg gtatgatctt gcaattctag cacgtagagg gcgactaaat	12060
agaggaata atcgctcaac atggtttgca agtgataatt tggtagatat cctaggttat	12120
ggagattata ttttttgaa aataaccatta tcactactac cagtggatac acaaggcctc	12180
ccacatgcag ccaaggactg gtatcatgaa tcggttttca aggaggctat tcaaggccat	12240
acacacatcg tgtccatctc tacagcagat gtcttaatca tgtgtaagga cataatcacc	12300
tgtcgattta atactttact gattgctgct gtggcaaatc tagaggattc agttcattca	12360
gattaccctt taccagaaac agtgtctgac ctatacaaag caggagatta tttaatctca	12420
ttgctaggat cagaaggtta caaagtcata aaattccttg agccgttatg cttagcaaag	12480
atccaactct gctcaaatta cactgagagg aaaggaagat tcctcactca aatgcattta	12540
gctgtaaatc atacacttga ggaacttaca gggtcccgag aattaaggcc acaacagatt	12600

cggaaggtaa gggaattcca tcaaatgctg ataaacctta aggcaactcc tcaacaactc	12660
tgtgagttgt tttcagtcca aaagcattgg gggcaccctg tcttgcatag cgaaaaggct	12720
atccaaaaag taaagaagca tgcaacagtg ataaaagcat tgcgcccaat aataatcttt	12780
gaaacatatt gtgtgtttta atacagcatt gcaaaacatt atttgatag tcagggtacg	12840
tggtagagtg tgacttctga cagatgctta acaccaggcc tttctctta catcaaaaga	12900
aaccaatttc ctccactacc tatgatcaaa gaacttttgt gggaatttta tcacttagat	12960
catcctccgt tattctccac caaagtgatt agtgatttga gtatctttat taaagatcgt	13020
gctactgcag tcgagaaaac atgctgggac gcagtttttg aaccaatgt tcttggttat	13080
aacccaccga ataaatttgc taaaaaagg gtacctgagc aattccttga acaggagaat	13140
ttctcaatag agagtgtcct acattatgct caacgtctgg aatatcttct cccggagtac	13200
cggaacttct ctttttctact caaggagaag gagttaaaca ttggacgagc ttttgggaaa	13260
ttgccatatt caacacgcaa tgttcaaact ctgtgcgaag ctttgttagc agatggtttg	13320
gcgaaagcat tcccaagcaa tatgatggtt gtgacagagc gcgagcaaaa agaaagcctt	13380
ttgcataag cgtcttggca tcacacaagt gatgattttg gtgagaatgc tactgttaga	13440
ggcagtagtt ttgtaacaga cttggaaaaa tacaatttag cattccgata tgagtttaca	13500
gctcctttta ttgaatactg taatcgttgt tacggtgtaa gaaatttgtt taattggatg	13560
cactacacta taccacagtg ttatatacat gtgagtgatt attataaccc cccacatgga	13620
gtctctctcg aaaaccgaga aaatccacca gaaggtccaa gctcttaccg tggatcatca	13680
ggcgggattg agggacttca acaaaaactc tggacaagca tctcatgtgc acagatttca	13740
ttagttgaaa tcaaaaccgg ttttaaactg cgatctgcgg taatgggtga caatcaatgt	13800
ataactgtac tctctgtatt tcccctgaa actgagtcta gtgagcaaga attaagttct	13860
gaagataatg ccgctagagt agctgctagc ttagcaaaag tcacaagtgc ctgcggcatc	13920
tttttaaac ctgatgaaac tttgttcac tcaggtttca tttattttgg caaaaaacaa	13980
tatttgaatg gagtacaatt acctcaatca ctgaaaactg ctactagaat tgcacccttg	14040
tcagatgcta tctttgatga tcttcaaggg aactagctta gcataggcac ggcttttgaa	14100
agatctatct ccgaaactag gcacgtagtc cttgttagag tagcagctgc attccatacc	14160
ttttttccg taagaatctt acaatatcat catcttggct tcaacaaggg aacagacctg	14220
ggtaattgt cattaaagca gccattagat ttggaacta taactttggc cttggcagta	14280
ccacaagtct tgggtggctt atcattccta aatccagaaa aatgttttta tagaaatctg	14340

ggtgatcctg ttacttcagg gctgtttcag ctcaagacat atcttcaaat gatccacatg	14400
gatgatattgt ttttaccttt gatcgcaaag aacccaggga actgtagcgc aattgacttt	14460
gtgttaaacc ctagtgggtt aaacgtaccg gggtcacagg atttgacatc ctctctacgt	14520
cagatagtgc gccgaacaat tactctaagt gctaaaaata aattaataaa cactttgttc	14580
cattcttctg ctgatttaga agatgaaatg gtttgcaaat gggtgctttc ttctacacca	14640
gtcatgagta ggtttgccgc cgatatattt tctcgactc ccagtgggaa acgtttacag	14700
atcttaggtt accttgaagg gactagaaca ttgttagcct ctaaaattat aaatcataat	14760
actgagacac ctatctaga tcgattgagg aaaattacgc tgcaaagggtg gaggctgtgg	14820
tttagttatc tcgaccactg tgatcaagtt ctggctgatg ccctaactca gataacctgc	14880
actgtggact tagcacagat tcttcgcgag tacacctggg cacacatact agagggaagg	14940
cagctcattg gagcaacact tcttgtata ctagaacaac taaatgtcat ctggctcaaa	15000
ccatatgagc attgccctaa atgtgcaaag tcagcaaacc ctaaagggga acctttgtt	15060
tctattgcaa ttaaaaaaca ttagtaagt gcttgacctg atcaatcacg acttagttgg	15120
acaattggag atggcatccc ttatatcgga tctgaaacag aggataagat tgggcagcca	15180
gccatcaaac caaatgccc ttcagcagcc ttacgtgaag caattgagtt gacatcaaga	15240
ttgacttggg ttactcaagg tggagcaaac agcgacttac tagttaaac cttcatagaa	15300
gcacgagtaa atttaagcgt acaggaaatt ctccaatga caccttctca ttactccggc	15360
aacattgtgc atcgataaa tgatcaatat agtcacact catttatggc aaataggatg	15420
agtaattctg ctactaggtt agttgtttcg acaaacactc ttggagaatt ttcaggagga	15480
ggtcagtcag caagagatag taatattatc ttccagaatg tcattaattt tgctgttgca	15540
ctttttgac tacgatttag gaacgtggct acttcttcta tacaacatca tcgggctcat	15600
cttcatttgt caaagtgtg cacgcgagag gttccagccc aatatttagt ttatacatca	15660
acattgccat tggaccttac acggtatcgg gataatgagt tgatttacga tgacaatcca	15720
ttaagagggtg gtttaaatg caatctttct ttgataatc cgcttttcaa gggccagaga	15780
cttaacataa ttgaagaaga cttgattaga ctaccttact tatcaggatg ggagctagct	15840
aaaactgtta tccaatctat aatttctgac agcaacaatt catcaacgga tccaatcagt	15900
agtggggaaa cacgatcatt caccactcac ttcttgacat atcctaagat tggactacta	15960
tatagttttg gtgcactcat cagttattat ctaggcaaca ccattattag aaccaaaaaa	16020
ttgactctta acaacttcat atattaccta gctactcaaa tacataattt acctcatgc	16080
tcgttgagaa tcttaaac tactttgaaa cacgctagtg ttatctcgag attaataagt	16140
attgactctc acttctcaat ttatatgga ggaactgctg gtgatcgagg actttccgat	16200

gcggaagat tgtttcttag aactgccatt actgtcttcc ttcaattcgt tagaaagtgg	16260
atagttgaac gcaagacagc tattccactg tgggtcatct accctctaga aggtcaaagt	16320
cctagtccga tcaacagttt tctacaccac gtcacgcacat tgttgcaaca tgagtccctc	16380
cacgatcatg ttgtgctgc agaagccac agtcgagtgg agacatttga taatttagtt	16440
tatatgtgta aaagcacagc aagtaacttc ttcatgctt cattagcata ctggagaagt	16500
cgatctaaaa atcaagacaa aagagagatg acaaagatat tatctttgac gcaaacggaa	16560
aagaaaaatt cattcggcta tacagcacat ccagaaagca ctgctgttct tggttccctc	16620
cagaccagcc ttgctccacc tccatctgct gacgaggcta catatgatag gaaaaacaaa	16680
gttttgaaag cticcagacc tggcaagtat tcccagaata caaccaaagc cccaccaac	16740
caaaccagtt gtgcgatgt atctcccaat atcacaggca cagatgggtg cccttctgcc	16800
aatgagggtt ctaacagcaa taacaataat ttagtctgc acagaattgt actgccgttt	16860
tttaccattgt ctcataatta taacgaaaga ccctctatca gaaagtctga ggggacaaca	16920
gagattgtaa ggcttactcg gcagctgagg gcaataaccag acaccacaat atattgccgc	16980
ttcacgggaa tagtttcttc aatgcactat aagctcgatg aagtccttg ggaatttgat	17040
aattttaagt ctgctataac acttgccgaa ggtgaagggt cgggtgcatt actcttatta	17100
caaaaatata aagtagaac ctgtttttt aataactag ccacagaaca cagcattgaa	17160
gcagaaatta ttctggaat aactacacca agaagtcttc tccctattat gtctaggttc	17220
catggtggac aaataaaagt cactttaaac aattctgcaa gccagattac cgatattact	17280
aatccaagtt ggttggcaga caaaaatct aggatcccta agcaagtaga gattataacc	17340
atggatgctg aaacaacaga aaacattaat cggtaaaaat tgtacgaagc agtccaacag	17400
ctgattgtct cacatatga tccgaatgca ctcaaagttg tggttcttaa agttttctta	17460
agtgacattg atggaatcct atggtgaat gataacctta cccctttgtt tgggctgggt	17520
tacttgatca agccgatcac ctctagccca aaatctagt agtggtacct atgtctctca	17580
aaccttcttt caacttcaag acgattacct catcagagtc atactactg catgcatgtt	17640
attcaaacag cactccagct acaaatcag aggagctcat attggcttag ccacctgtc	17700
cagtatgcca atcataattt gcatttagat tatattaatc tcggtttccc ttcatggag	17760
agggttttat accatagata caatttagtc gattctcaga aaggcccttt gacttccatt	17820
gtccaacatc tagcgacct gcagaccgag attagggagt tggttaatga ctataatcaa	17880
caaagacaaa gtcgaacca aacatatcat ttcatataaa caataaaagg tcgtattaca	17940
aaattggtaa atgattacct taagttcttt ctaataatac aagccttaaa gcacaattgc	18000
acatggcaag aggaactaag agctcttcca gatctaatta gtgtctgcac tcgattctat	18060

catactcgaa actgttcatg tgaaaaccgg ttcctagtag agactttata cttatcacgc 18120

atgcaggatt cggaatcaa actaatagat agattgaccg gccttcttag tctatgtcca 18180

aatggttttt ttcggttaagg actcttgacg tacaaactcc acatagttat acaatggtac 18240

caggacacta tatgtaaatt gaccctaaga aagagtaatt cgacacacag agttctcaag 18300

tgaaaccctt catctcagat tatctgtggt tgcaattcta atatccgatt gttaccccggt 18360

gagtataact ccagattaat ataagaaaat accttttgtc ctgcaaattt atcttaaatt 18420

caagtacata cgctccaaat cgtataaaat attaagaaaa agttaatctg cttgctttaa 18480

ttataacttt aatattcgac aaatagttaa cggctctcatc actcaaaaat ttcattaaca 18540

aaagaagtac tctgagtata ttcacataatc atatgtgatt aacatataag caacgcatga 18600

tgcgccttcc tcttacttat tgtgtgtgca cgcagtcggt gtactacctc gaaaattcca 18660

aacaataaat cgtgtctatc ccgcatcttag tgtctttaat ttaagatctc aaatccaaaa 18720

aactgggttt atgttgatgt aaatcaataa taccgaaatt gcttgatatt aaaataaagc 18780

ttaaaggatt tttccttaaa cggatgatgtt aggtatatag gaaagctcga tcacgatgtc 18840

ccttactcag aaaaagaaaa acggaagccc tattggccat ttaatcgtac acaaaaatat 18900

ctttaccaa ttgttttctc ttttttgtgt gtcca 18935

<210> 5

<211> 18940

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 5

cggacacaca aaaagaatga aggattttga atctttattg tgtgcgagta actacgagga 60

agattaaaga ttttctctc attgaaattg aaattgagat tctaattctg acggatcgat 120

ccccataacc aacctgaga attggcctga agaagtcac tgctccttgg caaaaccaag 180

agcaggccca aagggccatt aggccacatc tgctgagcct gcagaacacg caggacttac 240

ttagcagaag agagcgcgtg ccgaaaccag ccaacaaatt gacacagctg ctcaactctga 300

ccctgaattc ataaacaata ttaagttgac aacagagata ctaatccaat atttgatca 360

agaatcaaaa tagtgaaacg actgactatc cctccttaga attagcaaag atccttttgt 420

agactattgt gctacattct ctatccaaga cctcaaaatg gatcctcgtc caatcagaac 480

ctggatgatg cataacacat ctgaagttga agcagactac cataagattc taactgccgg 540

attgtccgtc cagcaaggca ttgtgagaca aagaatcatt cctgtttacc aaatctcaaa	600
cctggaggaa gtatgtcaac tcatcataca ggcatctgag gctggcgtcg acttcagga	660
tagtgcagat agctttttgt taatgctatg tctgcatcat gcctatcaag gggattataa	720
acaatttttg gaaagtaatg cggtaaaaata ccttgaaggt catggattcc gttttgagat	780
gaagaaaaag gaaggtgtca agcgccctgga ggaactactc cctgctgcct cgagtggaaa	840
gaacatcaag agaacattgg ctgcaatgcc cgaggaggaa acaacagaag caaatgctgg	900
acaatttctt tcatttgcta gtctgtttct cccaaaattg gttgtcggag aaaaggcctg	960
tctggagaag gttcaacgac aaatccaagt gcacgcagaa caaggtctga ttcaataccc	1020
gacatcttgg caatcggtag gacatatgat ggcatcttc agactaatgc gaaccaactt	1080
cctgattaag ttctcctaa tacatcaagg aatgcatatg gttgcagggc atgatgctaa	1140
tgatgccgtc attgccaact ctgtagctca agctcgtttc tccgattgt tgatagtcaa	1200
aacagtgcctt gatcataatc tccaaaaaac agagcacgga gttcgcctgc atcccttggc	1260
gcgaacagcc aaagtcaaaa atgaggtgag ctcttttaag gccgctttag cctcactagc	1320
acaacatgga gaatatgcc cgtttgctcg tctgctgaat ctatctgggg ttaataatct	1380
tgagcatggg cttttccctc aactttctgc aattgctttg ggagtagcaa ctgcacatgg	1440
gagcactctg gctggagtca atgtaggaga gcaataccaa caactgcgag aagcagccac	1500
tgaggccgaa aagcagttgc agaaatatgc tgaatctcgt gaacttgatc acctaggtct	1560
tgatgatcag gaaaagaaaa tcttaaaaga ctccatcag aaaaagaatg agatcagctt	1620
ccagcagacg acagccatgg tcacactgcg gaaagagaga ttggccaaat tgaccgaagc	1680
tattacttcc acctctatcc tcaaacaggg aaggcggtat gatgatgaca atgacatacc	1740
ctttccaggg ccaatcaatg ataacgagaa ctctggctcag aacgatgacg atccaacaga	1800
ctcccaggat accacaatcc cggatgtaat aatcgatcca aacgatggtg ggtataataa	1860
ttacagcgat tatgcaaatg atgctgcaag tgctcctgat gacctagtgc tttttgacct	1920
tgaggacgag gatgatgctg ataaccggc tcaaaacacg ccagaaaaaa atgatagacc	1980
agcaacaaca aagctgagaa atggacagga ccaggatgga aaccaaggcg aaactgcatc	2040
cccacgggta gcccccaacc aatacagaga caagccaatg ccacaagtac aggacagatc	2100
cgaaaatcat gaccaaacc ttcaaacaca gtccagggtt ttgactccta tcagcgagga	2160
agcagacccc agcgaccaca acgatggtga caatgaaagc attcctcccc tggaatcaga	2220
cgacgagggt agcactgata ctactgcagc agaaacaaag cctgccactg cacctcccgc	2280
tccgctctac cgaagtatct ccgtagatga ttctgtcccc tcagagaaca ttcccgcaca	2340

gtccaatcaa acgaacaatg aggacaatgt caggaacaat gctcagtcgg agcaatccat	2400
tgcagaaatg tatcaacata tcttgaaaac acaaggacct tttgatgcca tcctttacta	2460
ccatatgatg aaagaagagc ccatcathtt cagcactagt gatgggaagg agtatacata	2520
tccagactct ctigaagatg agtatccacc ctggctcagc gagaaggaag ccatgaacga	2580
agacaataga ttcataacca tggatgggtca gcagttttac tggcctgtga tgaatcatag	2640
aaataaatte atggcaatcc tccagcatca caggatgatcc gacctctaaa actgagctcc	2700
taactacaag ctaccccatc actctgccgg aatgccagaa cctccctcca aaacagctcc	2760
acatcgagaa cctccgacgc ggtacacagg caagacaggc aacctaatga tgttcctgtt	2820
caccacaac cgcaaccaac acttgatcga cttccaagac aactacaacc cccttagcca	2880
actccaccac agaagcacca ccccataaca acaaccccaa accaacaaca ctgcatgtaa	2940
gtattgtctc accccaagat gatccctgga caccaacaac ccctaacct cccaagtgtg	3000
tcattaagaa aaaatatatg atgaagatta aaaccttcat cagagctatt tcttctacgc	3060
ttggttagga ccagtattca caaactatht tacaatccct acccaatatg acctctaaca	3120
gagcaagggt gacttacaac ccaccaccaa caaccacagg cacacgatcg tgtgggccgg	3180
aactttccgg gtggatctct gagcaattga tgacaggcaa gattccgatt accgatatct	3240
tcaatgaaat tgaaacctta cctagtataa gtccctcgat ccactccaaa atcaaaaccc	3300
caagtgttca aacacgcagt gtccagaccc aaactgaccc aaattgtaat catgattttg	3360
cagaggttgt gaaaatgcta acatctctaa cccttgtcgt acaaaaacaa acccttgcaa	3420
ctgaatcact tgagcaacgc attactgacc tggaaggtag cctgaaacca gtgtctgaga	3480
tcaccaagat tgtttctgca ctaaatagat cctgtgcaga gatggtggcc aaatatgatc	3540
ttctagtaat gacgactggt cgtgcaactg ccactgtctc agctactgaa gcatactggg	3600
cagaacatgg acgtcctcca ccggggccct cattgtacga ggaggatgca atcaggacta	3660
aaattggaaa acaaggggat atggtacca aggaagtgca agaggccttc cgtaatctgg	3720
atagtactgc ctttctaacg gaagagaatt ttgggaaacc agacatatcc gcaaaagact	3780
tgcgcaatat catgtatgat caccctccag gttttggcac agcatttcat caactagtgc	3840
aagtatctg caagttaggg aaggacaatt cctcacttga tgtaattcat gcagaatttc	3900
aggccagcct tgcigaagga gactctctc agtgtgccct gattcagata accaaacgga	3960
ttctatthtt ccaagatgca gcaccaccg taatccatat tcggtcacgc ggtgatatac	4020
caaaggcgtg tcaaaagagc ctccgccctg ttccaccatc accaaagatt gataggggtt	4080

gggtatgcat attccagcta caagacggaa aaacactcgg actcaaaatc taaggatgaac 4140
aattgcgcaa cctccacagt cgcctatatt gcttccttcc ggaatcaggg tatgatcgcg 4200
taaaaaataa gcttccaaca tattgataca cgatccatat ccataatgcc atctccagga 4260
atatgagaac gcaaggccat atcaggaccc gatctcaatt ccaatgcaac ctactgttaa 4320
gaataaaata accaatgtcc tctagcctta tatgttctca aaaatacaag tgatgaagat 4380
taagaaaaag catcctttac ttgagaggag ctaattcttt ataacttcatc taatctttaa 4440
gtaagttgat cactaccacc atgaggaggg caattctacc tactgcaccg ccagaataca 4500

tagagctgt ctaccaatg agaacggtta gtactagtat caacagtact gccagtggtc 4560
cgaactttcc agcacgggat gtaatgatga gtgatacacc ctccaactca ctccgaccaa 4620
ttgctgatga taacatcgat catccaagtc atacaccaac cagtgtttca tcagccttta 4680
tactcgaggc aatggatgaat gtgatatcgg ggccgaaggt actaatgaag caaatccta 4740
tatggctccc ctgggtgtt gctgatcaaa aaacatatag ttttgactca actacagctg 4800
caattatgct cgcacgtac accatcactc actttggcaa aacctccaat ccgcttgtga 4860
gaatcaatcg acttggctct gggatccccg atcacccgtt gcggcttcta agaataggaa 4920

atcaagcctt ctgcaagag tttgtgctgc ctccagtca attgccgcag tatttcactt 4980
ttgacctgac ggctctaaag ctgatcactc aacctctccc ggacgcaacc tggacggatg 5040
atactccgac cggctctaca ggaatacttc gtcttggat ttcctttcat cccaaactga 5100
gacctatcct attgccaggg aagaccggga aaagaggatc cagctccgat cttacttctc 5160
ctgataaaat acaagcaata atgaactttc tccaagacct caaactcgtg ccgattgatc 5220
cagccaagaa cattatgggt attgaagtgc cggaactctt ggtccacaga ctaactggaa 5280
agaaaatcac aacaaaaaat ggtcaaccaa taattcctat tcttctacca aagtatttg 5340

gcatggatcc catttctcag ggagacctca caatggatcat cactcaagac tgtgacactt 5400
gccattctcc tgctagtctt cctccagtca gcgagaaatg agcatgaagt ccgaggctgc 5460
ccggcccaca cgacccccag ggccttcgtc cggtaccga accaaccatc cgaccttcat 5520
caaaacaaaa aaataccgcc acgcgaaagc taaaatgcag gaccacaatc caaccagcaa 5580
caccatccat acacaggtat caattgggct gccgcagcat atagaccaa tagcaagctg 5640
ctgtccagaa aatagtccg gaaagtaact caaccatgc aagcccaatg cagctttcag 5700
aatccgcca gcaacccaac tccactgtac cccaatatt aacctgaatc gactaaccgc 5760

actttaattt gaagtacatt tgttcaatgg gttcattatt aacagtgttg cttttagatt 5820
gtacctttgc tcacagatag taaattgtta tggatcaaaa tcttattaag aaaaagaaca 5880
cgatgaagat taacgcgacc tagagcgctg ccttcatctc atcaatttaa cttgtcaata 5940

gagcaaccta gtttgtgatt actcatcttc cgtagttgac aaacactttg ctggttaatt	6000
glaaatatac cacagtcac atggttacat caggaattct acaattgccc cgtgaacgct	6060
tcagaaaaac atcatttttt gtttgggttaa taatcctatt tcacaaagtt ttcctatcc	6120
cattgggcgt agttcacaac aacactctcc aggttaagtga tatagataaa ttggtgtgcc	6180
gggataaact ttcctccaca agtcagctga aatcggtcgg gcttaatcta gaagtaatg	6240
gagttgccac agatgtacca acagcaacga agagatgggg attccgagct ggtgttcac	6300
ccaaagtggg gaactacgaa gctggggagf gggctgaaaa ctgctacaac ctggacatca	6360
agaaagcaga tggtagcgaa tgcctacctg aagccctga ggggtgaaga ggcttcctc	6420
gctgccgtta tgtgcacaag gtttctggaa cagggccgtg cctgaaggt tacgctttcc	6480
acaaagaagg cgctttcttc ctgtatgatc gactggcatc aacaatcatc tatcgaagca	6540
ccacgttttc agaaggtgtt gtggctttct tgatcctccc cgaaactaaa aaggactttt	6600
tccaatcgcc accactacat gaaccggcca atatgacaac agacccatcc agctactacc	6660
acacagtcac acttaattat gtggctgaca attttgggac caatatgact aactttctgt	6720
ttcaagtgga tcatctaact tatgtgcaac ttgaaccaag attcacacca caattttctg	6780
tccaactcaa tgagaccatt tatactaattg ggcgtcgcag caacaccaca ggaacactaa	6840
tttggaaagt aaatcctact gttgacaccg gcgtaggtga atgggccttc tgggaaaata	6900
aaaaaacctc aaaaaaaccc tttcaagtga agagctgtct gtcataattg taccaagagc	6960
ccaggatcca ggcagcaacc agaagacgaa ggtcactccc accagcttcg ccaacaacca	7020
aacctccaag aaccacgaag acttggttcc agaggatccc gcttcagtgg ttcaagtgcg	7080
agacctccag agggaaaaca cagtgccgac cccaccccca gacacagtcc ccacaactct	7140
gatccccgac acaatggagg aacaaaccac cagccactac gaaccaccaa acatttccag	7200
aaacatcaa gagaggaaca acaccgcaca ccccgaaact ctgcccaaca atccccaga	7260
caacacaacc ccgtcgacac cactcaaga cggtagcgcg acaagttccc acacaacacc	7320
ctccccccgc ccagtcccaa ccagcacaat ccatcccacc acacgagaga ctacattcc	7380
caccacaatg acaacaagcc atgacaccga cagcaatcga cccaacccaa ttgacatcag	7440
cgagtctaca gagccaggac cactcaccaa caccacaaga ggggctgcaa atctgtgac	7500
aggctcaaga agaaccgaa gggaaatcac cctgagaaca caagccaaat gcaacccaaa	7560
cctacactat tggacaaccc aagatgaagg ggctgccatt ggtttagcct ggatacctta	7620
cttcggggcc gcagcagagg gaatttatac ggaagggata atgcacaatc aaaatgggct	7680
aatttgcggg ttgaggcagc tagcaaatga gacgactcaa gccctacagt tattcttgcg	7740
tgctaccacg gaattgcgca ctttctctat attgaatcga aaagccatcg actttttact	7800

ccaaagatgg ggaggaacgt gccacatctt aggccagat tgctgtattg agcccatga	7860
ttggactaag aacattactg acaaaataga tcaaatcatt catgatttca ttgataaacc	7920
tctaccagat caaacagata atgacaattg gtggacaggg tggaggcaat gggttcctgc	7980
cgggatcggg atcacggggg taataatcgc agttatagca ctgctgtgta ttgcaaatt	8040
tctactctaa tctagtccga ctctgtacca gcataatggc ctctaaaata agcttttgct	8100
tctgcttctt atagttaata catttcagca aaaatcaact attaagtcaa aagaagatcc	8160
ctctaataat cctaattacc ttcaaaaatc tagaacttta ttaattctca gggatattag	8220
aacagccaga tgacttgact aagtttgtac tgtaataaaa agatacttga tgaagattaa	8280
gaaaaagaca gtcttgat tgctactaat ctcatctca aaacatatta ttttaccaga	8340
agctactata gcctacctcc ttgacacata gcaaacctta ctcatgttga taattgtttg	8400
cctgctatctt acatatttac taacttacia aattatcttg gggattttctc tgaacatata	8460
atcagaattg gcatttaaaa cacaagttag tcctaattgga ctcatctcat gagagagggc	8520
gtagcagaac tattcgacag agtgcaagag atgggccgag tcatcaagta agaacaagat	8580
catctccag agacagccac cgcagcgaat atcatacacc taggagctct tcccaagttc	8640
gagtcgccgac tigtgttcat cggaagcgta ctgattcttt gacagttcca ccagaccaa	8700
aggacatatg tcttacctta aggaaaggat ttttgtgtga cagcaatttt tgtaaaaagg	8760
accatcaact agaaagtta acagataggg agctgctttt gctgattgca cggaaaacct	8820
gcggctccct tgaacaaca ttgaacatca ctgctcctaa agatacacga ttagcaaacc	8880
caattgcaga tgatttccaa caaaaagacg gcccaaaaat tacactattg acacttttg	8940
agactgcgga gtattgttca aaacaagata tcaaggcat tgatgactca agactaagag	9000
cattactaac ctttgtgcc gtcagacga ggaattctc aaaatcccag cttagtctat	9060
tgtgtgagag tcatctacga cgagaagggc taggacagga tcaatcagaa tctgttcttg	9120
aagtgtatca gcgttacat agcgacaaag gcggaaattt tgaggcagcc ctatggcaac	9180
aatgggaccg acagtcttg atcatgttta taacagcatt tcttaatat gctttacaat	9240
taccctgtga aagttcatct gttgttattt caggattaag gctgctagt cctcaatcag	9300
aagataccga gacctcaacc tacaccgaga cacgtgcatg gtcagaggaa ggtggcccc	9360
attaacatct tccacagtcg aatctacat aatttccta ttcaacgcag ataagaatca	9420
gtactaaacc acaagtgcaa aaattaacaa aacaccagca taagtgaat cctgtctgtg	9480
attagcaaca cgaatgatct tcaatcctgt tgcaattcgc cagtataat tgtattcaca	9540

ttgtggccac aatatactgt cttttcccat tgaataataa ggctgaatct attacgtac	9600
acaaacttac aggattagca ccacgacggc tcaatactat acctattggt cacggctcga	9660
tgtgttaatc acttatattg tattcatttg aaattactca ttaggcaaat actttgatta	9720
agaaaaata atiggaaaac cagaaaatcc ctaggatatt aaattcctat ctccggagat	9780
ccgagataat taatcaagca atgagggaac aatggtgaac aacaacatat tgttgcccc	9840
tttagattgg tcagttccaa aaacaagtga tgaagattaa tgcagatgtc caaggaacac	9900
atatttgtga tttaaactgt ccagttagac tctgttcaag gatcttcac tttttagct	9960
ccactctgag tcacaacata attgagtttt tgctcagaac agttatcagg attaaattct	10020
ctcaataac tgaactact agcatcactc tcaatttcac tacttacgac aatcattatc	10080
ttaataatat ttctctaaat tactgactta attagcttgt aatcagataa tatcgaaacc	10140
aatttatcat aaggcataat ttgtataagt gatttaggat ttacccaga agtgaaataa	10200
ttcttagaat aaaagaccga ctagaatata cttaggctg tctaactgac cacacagcta	10260
gggttagcct gacatctgga acaagatcga tactaatata gggatttgtt tcatactagc	10320
tctctgcaaa cacaatggct aaggcaacag gtaggtacaa cttggtttca cctaaaaagg	10380
acctcgagag ggggcttgtt ttgagtgatt tgtgcacgtt tttagttgat cagactatcc	10440
aggggtggcg ggtgacttgg gttgggattg aatttgacat cgcccagaaa gggatggctc	10500
tactgcatcg gttaaaaact gctgacttcg ctctgcatg gtcgatgaca aggaatttat	10560
ttcctcattt atttcaaaa tcaatttcta ctattgagtc tcccctctgg gcattacgag	10620
tgattctggc agctggtatt caagaccagt taattgacca atccttggtg gaaccgttgg	10680
ccggagccct gagcttagtc tccgattggc ttcttacaac aaacacaaac cattttcaaa	10740
tgcgcacgca gcacgctaaa gagcaactga gcttgaagat gctatcatta gtgcgtcta	10800
atatcttgaa attcatcagt caattggacg cactacatgt cgtgaactac aatggactct	10860
tgagcagtat cgaaattggc actagaaatc ataccattat catcacaaga accaacatgg	10920
gtttcctggt agaattacag gagcctgata aatctgccat gaatcaaaag aaaccaggac	10980
cagtcaagtt ctccctctg catgaatcaa cttcaagge tctaatcaaa aaaccgcaa	11040
ctaagatgca ggccttgatt ctggaattta acagctccct ggcaatatag tccaacgcta	11100
ccaaccatca ttttttgtaa ctgcatctct tttatttctt ttctaacttg atacaattat	11160
aatcaagatc cctaaccct tttgacgaag tgggctaatt tttgtcatt ctaataataa	11220
atcataacct gaataaaaga caccacaata ttataacca ataacaccta gagaatttct	11280
gaattgctaa agattatata ctgcactaa gagacaagtt aatcaatctt tacttaataa	11340
tatactaaat gctagatagc tctggctaac taacctgagt tgtggattac tccttttaaa	11400

agtctatcaa ttttaagctta tcactaatat taaggaggac tttttaaata agagcaagtg	11460
ttatgtagtc ttactaagaa tgatttgagg aagattaaga aaaagtgcctt gtggggctctt	11520
tccgtttag aggcacacag agcaaaacttc ttcctctaata ttttaatatgg caactcaaca	11580
tacacaatat ccagatgcaa gattatcttc acccattgtc ttagatcaat gtgatcttgt	11640
caccctgtct tgccgtctgt attcttcata ctcatataat cctcagttga aaaattgttag	11700
actacaaaa catatttacc gcctcaaatt tgatgctacg gttacaaaat ttttaagcga	11760
tgttccaata gttacattgc cgatagatta ctgaccctt ttacttttac gaactttatc	11820
cggggagggc ttatgccctg tcgaacaaa gtgcagccaa ttcttagatg aaatagtaag	11880
ttatgttttg caggatgcac gttttttaag atactatctt aggcattgtg gactacacga	11940
tgacaatgtt ggaaaaaatt ttgagccaaa gattaaggct ttgatttatg ataataaatt	12000
tctgcaacaa ttgttttatt ggtacgattt agcaatccta acgcgtagag ggcgcctgaa	12060
tcgaggggaat aaccgttcaa catggtttgc aaatgacgat ttaataagaca ttctcgggta	12120
cgggtgattat attttctgga aaataccgtt gtcatgttg tcactcaaca cagaggggat	12180
tcctcatgca gctaaggact ggtatcacgc atcaatcttc aaagaagcgg ttcaaggtea	12240
cacacatcgc gtgtcagttt ccactgcaga tgttttaatt atgtgtaagg acatcataac	12300
ctgtcgtttc aataccacac tcattgcagc attggcaaat ttagaagatt ctatctgttc	12360
tgactatcca caacctgaaa caatctctaa tctgtataag gcaggggatt acttaatctc	12420
gatactgggt tcagaagggt ataaggatcat aaagttttta gaaccactat gtttagctaa	12480
gatccaattg tgctcaaatt aactgagag gaaagggaga ttcttactc aaatgcattt	12540
ggccgttaat cacacacttg aagaacttat tgagggccgg ggattgaagt cacaacaaga	12600
ctggaagatg aggaatttc accgaatctt agtaaattta aagtcaacac cacaacaact	12660
ctgtgaattg ttttcagtgc aaaagcattg ggggcacctt gtgtacata gcgagaaggc	12720
tattcagaaa gtaagaaac atgcaaccgt aataaaagca ttgcgtcccg taatcatctt	12780
tgagacatat tgtgtgttca agtacagcat tgccaaacat tattttgata gccagggtc	12840
atggtatagt gtaatctcag ataaacatct aacaccagggt ttacactctt acattaagag	12900
gaaccaattt ccgccactgc ctatgattaa agacttattg tgggaattct atcaccttga	12960
tcactctccc ttattttcca ccaagattat tagtgacttg agtatcttca ttaaggatcg	13020
cgctaccgca gtggaaaaaa catgttggga tgcagttttc gagcctaagc ttcttgata	13080
tagtcctcca aacaagtctt caactaagag ggttcctgaa cagtttcttg aacaagaaaa	13140
tttctcgatt gatagtgttc tcacttatgc ccagcgcctg gattatctac ttccacaata	13200
ccggaatttt tctttctcac ttaaggaaaa agaattaaat gtaggacgag cttttggtaa	13260

gctaccttat cctacacgta atgttcaaac ttatgtgaa gccttattgg cagatggatt	13320
agctaaagcc tttcctagta acatgatggt tgtaacagag cgtgagcaga aggaaagcct	13380
cttgcaccag gcgtcgtggc accacacaag tgacgatttc ggtgagaatg ccactgttag	13440
aggcagcagt ttigtaccg acctagaaaa atacaacttg gcatttagat atgagtttac	13500
agctccattt attgaatact gtaatcgatg ttatgggtga aaaaatttat tcaattggat	13560
gcattatacg ataccgcaat gttatataca tgtaagtgat tattataatc cccctcatgg	13620
agtttcgcta gaaaatcggg aagatcccc ggaaggccct agctcttacc gtggcatct	13680
tgggggaatt gagggactcc aacagaaact ctggaccagc atttcatgtg cacaaatctc	13740
attagttgag atcaagactg gtttcaaatt gagatctgcg gtaatgggtg ataataatg	13800
catcacagtt ctttccgtat ttcctctaga gacagattcc aatgagcaag agcatagctc	13860
cgaggacaat gctgctcgg tagcagccag tttagccaaa gtcacgagtg cctgtggcat	13920
cttcctaaaa ccagatgaga cttttgtgca ttcaggcttt atttatttcg gtaagaagca	13980
atattttaat ggcgttcaat tgccacaatc actcaagact gctaccagga ttgctccctt	14040
gtcagatgca atctttgatg accttcaggg aactctggct agtataggaa cggcatttga	14100
gagatctata tccgagacta gacatgtata cccttgccgg gtggttgccg cattccatac	14160
attcttctcc gttaggatcc tccaatacca ccaccttggg ttcaacaaag gaaccgatct	14220
aggtcaacta tactaagca aaccgttggg tttcggaact atcactcttg ctttagcggg	14280
acctcaagtt ctaggaggtt tatcgttttt aaaccagag aaatgttttt atcgcaacct	14340
tggagacccc gtgacctccg gcctattcca acttaggact tacctgcaa tgatcaacat	14400
ggacgactta ttctacctt taattgccaa gaaccccggg aactgtagtg caattgactt	14460
tgtactcaac ccaagcggat tgaatgtccc tgggtcacia gacctaacat cttttttacg	14520
tcagatagtg cgtagaacia tcacattgag tgcaaaaaat aagctaataa acacattgtt	14580
tcactcctca gccgatttag aagatgagat ggtatgtaaa tggctacttt cttcaacacc	14640
tgtaatgagt cggtttgctg ctgatataat ctctcgtact ccgagtggga agcgcttgca	14700
gacccatggt tatttagaag ggactagaac cttgctagcc tccaaagtca tcaataacia	14760
tgacagact cctattttag ataggttgag gaaaatcaca ctgcagagat ggagtttgtg	14820
gtttagctac ctgaccact gtgatcaggt tctagcagat gctttaataa aagtttcttg	14880
tacagttgat ttggcgcaaa ttttacgtga atatacctgg gcacacatac tagagggaag	14940
acagctcatt ggtgcaacac ttccttgcat gttagaacia tttaatgtgt ttgggtcaa	15000

atcgtacgaa caatgcccta aatgtgcaaa atctagaaat ccaaaaggag agccatttgt	15060
gtcaattgca attaagaaac aagttgtgag tgcattggccg aatcagtcac ggtaaattg	15120
gaccattggg gacggtgtac cttacatcgg gtctcgaaca gaggacaaga ttgggcagcc	15180
agcaatcaag cctaagtgtc cctctgctgc cttacgtgaa gcaatagagt tgacatctag	15240
actaacatgg gttaccaag gtggtgccaa tagtgatttg ctagttaaac cttttgtaga	15300
ggcacgagta aacctgagtg tgcaggagat ctttcaaatg acgccttctc attattcagg	15360
gaacatcgta catcggtata atgaccaata cagccctcat tctttcatgg caaatagaat	15420
gagtaattcc gcgacgagat tgggtgtgtc gacaaatact ctcggggagt tctcaggtgg	15480
ggggcaatca gcaagggaca gcaatatcat ctttcaaat gtaatcaatt tttcggttgc	15540
cctatttgat ttacgatttc ggaacaccga aacatcctcc attcagcata atcgtgccca	15600
tctccatctt tcacagtgtt gcacacggga agtcccagct caatacctaa cctacacgtc	15660
tacgctttcc ttggatctca caaggtaccg agagaatgag ttaatttatg ataacaatcc	15720
gttaaaagggt ggacttaatt gcaacctatc ctttgataat ccacttttca agggccaaag	15780
gctcaatatc atagaggagg atttgattag atttctcat ctatctgggt gggaacttgc	15840
gaaaaccatc attcagtcca ttatctcaga cagcaataac tcattccacag acccatttag	15900
cagtggagaa acacgatcat tcacaactca ctttctcaca taccctaagg ttgggtctct	15960
ctatagtttc ggcgccatcg tgagttatta cttagggaat accattatta ggacaaaaa	16020
gctagacctc agtcatttta tgtattactt aacaactcaa atccataatt tgccacatcg	16080
ctcgttgagg atacttaagc ccacctttaa acatgttagt gtgatatcaa gactaatgag	16140
tattgatcct catTTTTTcaa tctacatcgg gggtacggca ggtgatcgag ggctttcgga	16200
tgctaccaga ctattccttc gagtggccat ttcttccttc cttcaattta tcaaaaaatg	16260
gatcgtggaa tacaagacag ctattcctct gtgggttata tacccttttg agggacaaaa	16320
tccagatcca attaatagct ttctacatct gattatagcc ttactgcaa atgaatcccc	16380
tcaaaacaac atccaattcc aagaagacag aaataatcaa cagttgtccg ataatttagt	16440
ttacatgtgc aagagcactg ccagtaattt cttccatgca tcaattgcct attggaggag	16500
ccggcacaaa ggacggccca aaaatcgatc gaccgaagaa cagacagtta aaccatacc	16560
atatgataat tttcattctg ttaaatgtgc ctcaaaccce ccaagcatcc ccaaatctaa	16620
gtcaggaact caaggttcaa gcgcattttt tgagaaactt gaatatgata aagaaagaga	16680
attgccaaca gttccacac cagccgaaca atccaagacc tataatcaagg ccctatccag	16740
ccgaatttat catggtaaaa caccatccaa tgccgcaaaa gatgattcaa caacctccaa	16800
gggctgcgat tccaaagaag aaaatgccgt tcaagcttca caccgaattg tctaccatt	16860

ttttacattg tcacagaacg actacagaac tcctcagct aaaaagtcag agtatataac	16920
tgaaatcacc aaactaatc gacaattaaa ggcaattcca gataccactg tatactgtcg	16980
ctttacaggg gttgtatctt caatgcatta taagcttgat gaggttctct gggaattcga	17040
tagtttcaaa actgctgtga ctctagctga aggagaaggg tcaggtgcct tattactact	17100
acaaaaatat aaggtcagaa caatcttttt taacacttta gctacagagc atagcatcga	17160
ggcagaaata gtttctggga caaccacacc tcgaatgctc cttcctgtaa tggccaaact	17220
tcatgatgat caaataaatg taatattaaa caattctgct agccagggtta ctgatatcac	17280
taacctgca tggttcactg accagaaatc tagaatcccc acacaagttg agattatgac	17340
tatggatgct gaaacgacag aaaatattaa tcgggtcaaaa ttatatgagg ctattcagca	17400
attaattgtt tcacacattg atacaagggt gctaaagatt gttattataa aggttttttt	17460
aagtgatatt gaaggtctcc tgtggcttaa tgaccatctt gccctttat tcggatccgg	17520
ctatttaatt aaacctatta cttcgagtcc aaagtcaagc gaatggtact tatgtctttc	17580
aaatttctt tcagcctctc gacgacggcc tcatcagggt catgctacct gtatgcaagt	17640
catccaaaca gcgtacgac tccaagttca aaggagtcca tactggctta gccatttagt	17700
gcaatatgct gatattaatt tgcacttgag ttatgttaat ttgggtttcc cttcattgga	17760
aaaggttctt taccatcgat ataacctagt tgattcacgg aagggtccac tggctctgat	17820
cctttacat ttaacacact tgcaagcaga gattagagaa ttagtgtgtg actataatca	17880
gcaacgacaa agtcgaaccc aaacatacca cttcatcaaa acgacaaagg gccggattac	17940
aaaattagtc aatgactacc ttaaatttta tctcgtagtg caagcactga agcataattg	18000
tctttggcag gaagaactca gaacacttcc tgacttaatc aatgtttgca atcgatttta	18060
ccatataagg gactgctcat gtgaagatcg atttttaatt caaactctt acttaaccg	18120
tatgcaagac tcagaagcaa aattaatgga gagattaacc gggtttctag gattgtatec	18180
taatggtatt aacgcttaag atccccttag aggcacgca atatgactcc aaacattaaa	18240
tgatattgct gtcaatacat ctacctgacc gagagcaagg ttattataa aaaacctata	18300
cacatgactg caatgcgtaa tttataccga aacacagtga gggctgcaca tgcaggttcc	18360
tgttgagctt taaaagatca tgcaatataa aatgatattt gtatactaat catgttagta	18420
ctaactaaca gtactcactg catatactct atcaattaag aaaaattact gtggtttatg	18480
catttaaatg acatcacaga tggatataat atagttaatt cttacctaaa tgttgagtta	18540
tagtaatttg aagttataat tatgattagt gcttatacta taaataatag ctataccaag	18600
tatacacaag aagttatgat ttgtattca aattatattc acaggaactt gtgattaata	18660
ataaaagtct cagttgttgg ttgttgagtt gtaaaactcc cgttaaaaat ttattttcca	18720

cttataacta ataataatca tagatcagta tgagttgagg ctattcaaac cttagaaaaa 18780

ttgtgcatg ttttttacca tgtcaatctt gatttcaatg atattggagg gcttgtcgat 18840

aaattcagta attaacatta agtcagtgtg gaacctcatt ggatatttga tcgtacacaa 18900

aatatcttta caaaattgtt ttctcttttt tgtgtgtcca 18940

<210> 6

<211> 18891

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 6

cggacacaca aaaagaaaaa aggtttttta agattttttg tgtgcgagta actatgagga 60

agattaacag ttttcctcag tttaaggat acactgaaat tgagattgag attctcctct 120

ttgctattct gtaactttcc ctggttgtga caattgaatc agttttatct attaccaatt 180

accatcaaca tggatgtct agtgatcttg ggactcttct tcatctggtt tttcctagag 240

ctctgaatct attttgtgag aagttcatcc aaacgaccca gtgtctgaaa atacaagagg 300

ttcccttttc cgtaagttt aaggggttgt tttgattgtg tgtagatttt ataatcctag 360

agtgccaagg agtgcgtgt catcattaat tgggaagatc aaggaaacaa tttgttccaa 420

taatatcgta catcttgact aagtcgaaca aggggaagtc gatatggatc gtgggaccag 480

aagaatctgg gtgtcgcaaa atcaaggtga tactgattta gattatcata aaattttgac 540

agctggcctt actgttcaac aggggaattgt caggcagaaa ataatttctg tatatcttgt 600

tgataacttg gaggctatgt gtcaatttgt aatacaagcc tttgaggcgg gaattgattt 660

ccaagaaaat gccgacagct tccttctgat gctttgccta catcatgctt accaaggtga 720

ctataaattg ttcttgaga gcaatgctgt acagtatttg gaaggtcatg gattcaaatt 780

tgagctccgg aagaaggacg gtgtcaatcg gctcgaggaa ttgcttcctg ctgcaacgag 840

tggaaaaaac atcaggcgta cgttggccgc actgcctgaa gaggagacta cagaagcaaa 900

tgcagggcaa tttctctcat ttgcgagttt gtttcttccc aaactggttg tgggagagaa 960

ggcttgcttg gaaaaagtcc agcgacaaat tcaggttcat gcagaacagg gtttaattca 1020

atatcccact gcatggcaat cagttggaca catgatggtg atcttcagat tgatgaggac 1080

taatttcttg attaaatatt tactgatcca ccagggtatg catatggtag ctggccacga 1140

tgccaatgat gctgtcattg ctaattcagt tgctcaggct cgcttttcag gactccta 1200

tgtaaaacc gtctttgatc atattctgca gaaaaccgac caaggagtaa gacttcaccc	1260
tttgcccca acagccaaag tgcgtaatga ggtaaatgca ttaaggccg ccctaagctc	1320
acttgctaag catggggaat atgccccctt tgctcgctt ctcaatctct cgggagttaa	1380
caacctagaa catggtctct acccacagtt atcagcaatt gctcttgag ttgccacagc	1440
acatggtagc acccttgagc gagttaatgt tggtagcag tatcagcagc ttagagaggc	1500
tgccactgaa gctgagaagc aactccaaca atatgctgag tccagagAAC tcgacagcct	1560
aggcctagac gatcaggaaa gaagaatact aatgaacttc catcagaaga aaaatgaaat	1620
tagtttccag cagaccaatg caatggtaac ccttaggaaa gagcgactgg ccaaattaac	1680
agaagctata acgttggcct caagacctaa cctcggtct agacaagacg acgacaatga	1740
aataccgttc cctgggccta taagcaaca cccagacca gatcatctgg aggatgatcc	1800
tagagactcc agagacacta tcattcctaa tagtgcaatt gaccccgagg atggtgattt	1860
tgaaaattac aatggctatc atgatgatga agttgggacg gcaggtgact tggctttgtt	1920
cgatcttgac gatcatgagg atgacaataa agcttttgag ctacaggaca gtcaccaca	1980
atcccaaagg gaaatagaga gagaagatt aattcatcca ccccaggca acaacaagga	2040
cgacaatcgg gcctcagaca acaatcaaca atcagcagat tctgaggAAC aagaaggtca	2100
ataaacagg caccgaggcc cagaacgtac gaccgccaat cgaagactct caccagtga	2160
cgaagaggac acccctatag atcaaggcga tgatgatccc tcaagccac ctccgtgga	2220
atctgatgat gacgatgat caagtagcca acaagatccc gattatacag ctgttgcccc	2280
tcctgtcct gtataccga gtgcagaagc ccacgagcct cccacaaat cctcgaacga	2340
gccagctgaa acatcacaat tgaatgaaga cctgatatc ggtcaatcaa agtctatgca	2400
aaaattagaa gagacatatc accatctgct gagaactcaa ggtccatttg aagctatcaa	2460
ttattatcac atgatgaagg atgagccgtt aatatttagc actgatgatg ggaaggaata	2520
cacctaccg gattcacttg aggaagccta tcctccatgg ctaccgaga aagaacgact	2580
ggacaatgaa aatcgataca ttacataaa taatcaacag ttcttctggc ctgtcatgag	2640
tccagagac aaatttcttg caatcttgca gcaccatcag taaccacagc acaaagcgcg	2700
gtccacttcg taaagctaaa tacacttaa gcttgaccga ttcatctaca aaactaatc	2760
cattataact tattagtgt acttttctat aagtattct caatctaagg ccattaagag	2820
tttaagcaat atacatatac acttacaccg gtctatcaa gatgtggctc aatgttctta	2880
atttgaacat agtcataagg ggataaataa tactttatat ttctgattgt ggattgacct	2940
attctgctta aaatgcttcg cccattaaaa atgtgatcta atagatagcc ctgactagac	3000

caattaagaa aaacatttga tgaagattaa aaccttcac gccagtaaat gattatattg	3060
tctgtaggca ggtgtttact ccaccttaaa gtcggaaata tcctacctta ggaccattgt	3120
taagagggtgc ataggcatta ccatccttga gaacatgtat aataataaat tgaagatatg	3180
ttcaggccca gaaacaactg gatggatttc tgagcaacta atgacaggta agattccagt	3240
aactgatata ttcatgtata ttgataacaa gccagatcaa atggaagtcc ggctcaaacc	3300
atcatcaagg agctcaacca gaacttgtac aagtagcagt cagacggagg tcaactatgt	3360
acctctcctt aaaaagggtg aggatacatt aactatgcta gtgagtgcaa ccagtcgtca	3420
gaatgctgca atcgaggccc ttgaaaaccg cctcagcaca cttgagagta gcttaaagcc	3480
aatccaagac atgggtaaag tgatttcac attgaatcgc agttgtgccg aaatggtggc	3540
aaaatatgat cttctagtta tgacaactgg acgggctact tcaaccgcag ctgcagtaga	3600
tgcgtagtgg aaagagcaca aacagccacc accagggccca gcgttgtatg aagagaatgc	3660
gcttaaagga aaaatcgatg atccaaacag ctatgtacca gatgctgtgc aggaggctta	3720
caagaacctt gacagtacat cgaccctgac cgaggaaaat tttgggaaac cttatatatc	3780
tgctaaagat ctgaaggaga tcatgtatga tcatctacct ggttttggga ctgcctttca	3840
ccaacttggt caagtgatgt gtaaaatagg aaaggataac aacctcttgg acacaatcca	3900
tgctgagttc caggcaagtc tagcagatgg tgactctccc caatgtgcac tcatacagat	3960
aacccaaaaga gtcccaatct ttcaggatgt gccgcccccg acaatccaca ttagatcccg	4020
tggtgatatc ccacgagcat gccaaaagag tctccgacca gcaccacat caccctaaat	4080
tgatcgtggt tgggtttgtt tgtttaagat gcaagatggt aaaacgcttg gacttaagat	4140
ctaaggatca agatttatat aacaaggcaa gccacaacct tagatagaac ctccagccaga	4200
ctattgaact attgacgctg ttgatgataa tatataatta atggtcatat ttgaatatga	4260
caacatcttg cttcttgttt tgccttgtat ctctttgagt tggaagatca ttccaaactt	4320
acaaacatgc acaagatgtt atggtttagc aaagaattga taggagtact ggtatataat	4380
gtaaatataa caagtgatga agattaagaa aaaccagtcg gtattttcca gacttggcat	4440
ttcttatctt catcttctaa agtgagatat tttatcatca aaaaatgaga cgcgagtggt	4500
taccaacggc tcctccagca tataatgata ttgcatactc tatgagcata ctcccaaccc	4560
gaccaagtgt catagtcaat gagaccaaat cagatgtact ggagtgcca ggagcagatg	4620
ttccatcaaa ctccatgaga ccagtggtcg atgataacat tgatcactca agccatactc	4680
caagcggagt agcttctgcc tttatatggg aagctaaagt gaatgtaatt tcgggaacaa	4740

aagtcctgat gaagcaaata cctatttggc ttccactggg tgtagctgat cagaagatat	4800
acagctttga ttcaacaaca gccgcaatta tgttggcttc ctacacagt acacacttcg	4860
ggaagatata taaccgcgtg gtacgtgtca acaggctagg cccaggaata cccgatcatc	4920
cgctacgact cctaaggttg ggcaatcagg cattcctca agagtttgtt ctccaccag	4980
tccagcttcc ccagtatttc acatttgatc taacagctct aaagctcatc actcaacat	5040
tgccagctgc aacctggaca gacgaaactc cagcaggagc agtcaatgct ctctgctctg	5100
ggctctcact ccatccaag ctctgtccaa ttcttctacc ggggaagata ggaaagaaag	5160
gtcatgcttc agacttaaca tcacctgaca aaattcaaac aatcatgaat gcaataccgg	5220
acctcaaaat tgtcccgatt gatccaatca agaacatagt tggaattgag gttccagaat	5280
tactagtcca aaggctgacc ggcaaaaaac cacaacccaa aaatggccaa ccaattattc	5340
cagttcttct tccgaaatat gttggacttg atcctatata gccaggggac ttaactatgg	5400
ttatcaccca ggatttgtat tcatgccact ctccagccag ccatccgat cacatggaca	5460
agcaggatag ttaccaataa tttaattcc attcgagcta ttattctgct agtaattccg	5520
acgggatcaa tagactaaaa atctgattgt atagaattat aaaagaatca agcagaggca	5580
acagactcac agcttacgcc tagatgacta atattaagga gttttttaat ctaattttcc	5640
agtcttaagt aataatcatt tcttttgtaa ttaattatgc atttgtaac ttatcggtgc	5700
gagatttctt tgagaaccgg gcggggcttc tactatctgt agtaaccaga agagaagttc	5760
aaccagtc aactaaacc aagcaatatt ctgaatgctc tatagtctat tctaaccaga	5820
ggtataacaa tggctaagat ttcaatgact cgttaacaat cgctagtaat ttaatctcc	5880
agattaagaa aaagatatat gatgaagatt aaggcgacaa cgagtcgaaa ctcatctct	5940
tttaagatc taacattatc tgttccaaag tcatacaagg acacattcaa atcagggatt	6000
gtaagctgct atttcttacc tccccaaatc acctatacaa catgggggtca ggatatcaac	6060
ttctccaatt gcctcgggaa cgttttcgta aaacttcgtt cttagtatgg gtaatcatcc	6120
tcttcacg agcaatctcc atgccgcttg gtatagtac aaatagcact ctcaaagcaa	6180
cagaaattga tcaattgggt tgtcgggaca aactgtcatc aaccagtcag ctcaagtctg	6240
tggggctgaa tctggaagga aatggaattg caaccgatgt cccatcagca aaaaacgct	6300
ggggattccg ttcaggtgtg cctcccaagg tggtcagcta tgaagccgga gaatgggcag	6360
aaaattgcta caatctggag atcaaaaagt cagacggaag tgagtgcctc cctctccctc	6420
ccgacggtgt acggggattc cctagatgtc gctatgtcca caaagttcaa ggaacaggtc	6480
cttgtcccg tgacttagct ttccataaaa atggggcttt ttcttgtat gatagattgg	6540
cctcaactgt catctaccgt gggacaactt ttgctgaagg tgtcatagct tttttaattc	6600

tgtagagacc caagaagcat ttttgaagg ctacaccagc tcatgaaccg gtgaacacaa	6660
cagatgattc cacaagctac tacatgaccc tgacactcag ctacgagatg tcaaattttg	6720
gaggcgagga aagtaacacc ctttttaagg tagacaacca cacatatgtg caactagatc	6780
gtccacacac tccgcagttc cttgttcagc tcaatgaaac acttcgaaga aataatcgcc	6840
ttagcaacag tacagggaga ttgacttga catlggatcc caaaattgaa ccagatgttg	6900
gtgagtgggc cttctgggaa actaaaaaaaa cttttcccaa caacttcatg gagaaaactt	6960
gcatttccaa attctatcaa cccacaccaa caactcctca gatcagagcc cggcggggaac	7020
tgtccaagga aaaattagct accaccacc caccaacaac tccgagctgg ttccaacgga	7080
ttccctccaa gtggtttcag tgctcactgc aggacggaca gaggaatgt cgaccaagg	7140
tctaactaac ggagagacaa tcacaggttt caccgcaac ccaatgacaa ccaccattgc	7200
cccaagtcca accatgacaa gcgaggttga taacaatgta ccaagtgaac aaccgaacaa	7260
cacagcatcc attgaagact ccccccatc ggcaagcaac gagacaattg accactccga	7320
aatgaattcg atccaaggt cgaacaactc cgcccagagc ccacagacca aggccacgcc	7380
agcgcccaca gcatccccga tgacctgga ccgcaagag acggccaaca gcagcaaacc	7440
aggaaccagc ccaggaagcg cagccgaacc aagtcagccc ggactcacta taaatacaat	7500
aagtaaggta gctgattcac tgagtccac caggaaacaa aagcgatcgg ttcgacaaaa	7560
caccgcta ataatgaacc cagatcttca ctattggaca gctgttgatg agggggcagc	7620
agtaggattg gcatggattc catattttgg acctgcagca gaaggcatct acattgaggg	7680
tgtaatgcat aatcagaatg ggcttatttg cgggctacgt cagctagcca atgaaactac	7740
ccaggctctt caattatttc tgcgggccac aacagaactg aggacttact cacttcttaa	7800
cagaaaagct attgattttc ttcttcaacg atggggaggt acctgtcgaa tcctaggacc	7860
atcttgttg attgagccac atgattggac aaaaaatatt actgatgaaa ttaaccaa at	7920
taaacatgac ttatttgaca atcccctacc agaccacgga gatgatctta atctatggac	7980
aggttggaga caatggatcc cggctggaat tgggattatt ggagtataa ttgctataat	8040
agccctactt tgtatatgta agattttgtg ttgatttatt ctgagatctg agagaaaaaa	8100
atctcagggt tactctaagg agaaatatta tttttaaaat ttacttaaat gctgaccact	8160
tatcttaaat gagcaattaa taatatgttt ttctgttct ttgcttgatt tacaatatga	8220
tatttctctt aataatgatt aatatattaa gaaaaactta tgacgaagat taaaggggag	8280
gatcgtaac gggaaaatct cccatctcgt tcgtcgaagc cacgttggtg gtgcttgacg	8340
ctgagaacaa ctccagagat tgtaggtaga aaggaccagc atttataggt aggggtcaga	8400
aagcaacaat agccataaaa ggagagcctg acattgctat ttaatatcct agaacctgat	8460

ttctaggttc tagttgtaca atccggatga tggagcattc aagagaacgg ggtagatcta	8520
gcaacatgcg acataatagc cgggaacat acgaaaatcc atcaaggtct cgtcattat	8580
ctcgggaccc taatcaggtt gatcgtagc agcctcgaag tgcacccaa attcgtgttc	8640
cgaatctgtt ccatcgaaa aagactgatg cactcatagt tcctccggct cccaaagata	8700
tatgcccac actcaaaaa ggattcctct gcgatagtaa attttgcaa aaagatcacc	8760
aattggatag cttaaatgat catgaattac tactgctaatt tgcaagaaga acatgtggaa	8820
ttatcgagag caattcgag attacatccc caaagatat gcggttagcg aatccaacag	8880
ctgaagactt ctcacaagg aatagtcta aattaacact tgcagtcctt cttcaaattg	8940
ctgaacattg ggcaaccaga gacctaaaggc aaattgagga ctctaaactt agagctcttt	9000
taaccctttg tgccgtatta acaaggaaat ttctaaatc ccaactgggt cttctatgtg	9060
agaccacct acggcatgag ggcctcggac aggaccaagc tgattctgta ttagaggctt	9120
accaaagact ccacagtgat aaaggaggga attttgaggc tgccctgtgg caacaatggg	9180
accgacagtc gtaataatg ttcattcttg cttttctcaa cattgtcttc cagacacctt	9240
gtgaaagtgc tagtgtcga gtctcaggtc ttgccacatt gtaccagca caagacaatt	9300
ctacaccatc cgaggcaact aatgatacca cctggccaag tacagttgaa tagaaaacca	9360
ctggagctat tttccacga ttgctctcag tcaataaatt aatatagata taatacgact	9420
tcggtgtgca attgtcaagg gttccatttg gtaataatga ttcttaaac aatctactat	9480
cgtaattatc gatggatcta ccctatttga cggtaacatga cttgaatgta ataaggtgag	9540
ttggatctg aggtattttg tctagagtat actcaaaatc gtatgtctag caaattatca	9600
atagcaaagt taaattctcc taacctcata ttttgatcaa gtaacatga tttatggta	9660
attctttgca gattatcggt ttaatcttta ttaagaaaa atcatgattg tagacaattt	9720
actggtagtc cctgggtatc caagtttatg aacagagcta gagagaattt gctacttccg	9780
aggtataact ttattatttg ctacttcgaa tgcctaaaac cagtaatgca ggatgaagat	9840
taattgcgga ggaatcagga attcaacttt agttccttaa ggcctcgtct gaattctcat	9900
cagttagtaa gtctttttat agaagtcatt agcttctaag gtgattatat tttagtatta	9960
aattttgtta attgcttgct ataaagttga agtgtctaatt gcttaaatga acatttcttt	10020
gaagctgaca tacgaatata tcatatcata tgaacacatc gcaattagag cgtccttgaa	10080
gtctggcatt gacagtcacc aggctgttct cagtagtctg tccttggaag ctcttgggga	10140
gacaagaaga ggtcccagag agtcccaaca ggttggcata aggtcattaa caccagcata	10200

gtcagctcga tcaagactgt aagcgagtcg attgcaacta aaaagattat ttctttgtgt	10260
ttaaacaat tccttttgtg tgagacaccc tcaaggcaca agatggctaa agccacaggc	10320
cgatacaatc tcgtgcccc aaagaaagat atggaaaagg gagtgtttt tagtgatctt	10380
tgtaatttct tgattactca aacctgcaa ggttgggaagg tttattgggc aggaattgag	10440
tttgatgtaa gtcaaaaagg catggctctt ctgacaagac tcaaaacaaa tgactttgct	10500
cctgcctggg cgatgacaag aaatctcttc ccacatctgt tccaaaaccc aaattcggtt	10560
attcaatctc ccacttgggc tttagaggga attttggcag ccggttgca ggatcagttg	10620
ttagaccatt cattggttga gccattgaca ggggtctctg gtctaatttc tgattggctc	10680
ctaactacaa cgtaacaca tttcaatctt cgtactagaa gcgtaaagga ccagcttagt	10740
tttcgtatgt tatctttgat cagggtcaaac atcttgtagt tcatcaacaa gcttgacgcc	10800
ctgcagtgtg tcaattacaa tggtttactc agtagtattg agatcgggac ttctacacac	10860
acaatcatta taactcgtac aaatatgggt tttctcgtgg aagttcagga gcctgacaaa	10920
tcagctatga attctaagcg cccaggacca gtcaagttct cattacttca tgagtctgcc	10980
ttcaaacctt tcaactcgtg tccacaatct gggatgcaat cattaataat ggagttcaac	11040
agttttgttg caatttaaca aggtgatctt aaaataagta catgaatgag aattagtgt	11100
gggtcttacc tagcattgtt gagttagcta tctaacttat tttactaat tgcattgagc	11160
actgctagta ggtttgcacc acgttaaaga ttcagagtgt atgaattgtg cagatttaaa	11220
cttgggtttt gccttatgct tcataggtgg tctttttaaa atggagatta tcagcatctc	11280
ttcaatggga ggagttagca atcagaaatt ggagataaat ggacatcggg atagaacaat	11340
gcctaactat tgggcggctt tcatttttaa atgtgtatat aaccaatctt ttcctatctt	11400
tgcttatatt ggtgttaactt tactttaata acatgtcaat gctatactgt taagagaagg	11460
tctgaggaag attaagaaaa aggtctcgtg ttcacttggg tgccgtcaag tatcctgtgg	11520
tttttttcta cctaacttcc tcatgccata tggctacca gcataccag taccggatg	11580
cacgtttatc ttacatata gtcttgatc aatgtgattt ggtaactcga gcatgtgggt	11640
tatattcacc ttattctcta aatctcagc taaggcaatg taaattacca aaacatatat	11700
atcgacttaa gtgcacaca atagtatcca aattcctaag tgataacct gtagcaacac	11760
tgccgataga ctatttagta ccaattctcc tgcgttcct aacggggcac ggtgataggc	11820
cgttgacccc gacttgtaat caattccttg atggaattat taattacact ctcatgatg	11880
cagcctttct tgattactat ctcaaggcaa caggtgcaca ggaccatttg acaaacatta	11940
caactagaga gaagcttaaa aacgaaattc taacaatga ttatgtccat caattgttct	12000
tctggcatga cctgtctatt ttggctcgac gtgggcgtct gaatcgcggg aacaaccgtt	12060

caacctgggtt tgttcatgat gaattcattg atattttagg atatggcgat tatatTTTT	12120
ggaaaatacc tttatcatta ttaccagtta ctatagacgg ggtcccacac gcggcaactg	12180
actgggtatca accgactctt tttaaagaat ccatacctagg gcacagccaa atcctatctg	12240
tgtcgacagc tgaataacta attatgtgta aagatatatt cacctgtagg tttaatatcat	12300
cactgattgc atccattgca aaattagagg atgtagatgt gtctgattat cctgaccgca	12360
gtgatattct taagataaac aatgctggag actatgtaat atctattctt ggctcagaag	12420
gttataagat aataaaglac cttgaaccac tttgtttggc caaaatccaa ctttgctcta	12480
aattcacaga aagaaaaggt cgtttcctca cacagatgca tttatcagta ataatgatc	12540
ttcgggagtt gatttctaac cgcagggtta aggactatca gcaagagaag attagggatt	12600
ttcacaaaat attattacaa ttgcaattat ctctcaaca gttttgtgaa ttattctctg	12660
ttcaaaaaca ttgggggcat ccaattttac atagtgagaa agctatacaa aaagtaaac	12720
ggcatgcaac catccttaag gctctcagac ctaatgtcat tttgagaca tatttgttat	12780
tcaagtacaa tattgccaag cactatttcg acagccaagg aacttggtac agtgtaatct	12840
cagacaggaa tttaaactca ggactcaact cttcataaaa acgtaatcac tttccttcac	12900
tacccatgat taaggatctt ctatgggaat tctatcatct taatcacctt cgtttattct	12960
ctacaaaggt gattagtac ttaagtattt tcatcaagga tagggccaca gctgttgaa	13020
agacatgttg ggatgcagtc tttgaacca atgtgctagg ttacaatcct ccaacaaaat	13080
tctccactaa aagggtgccg gaacaatttc tagaacagga ggatttttca atcgaaagt	13140
tctgaatta tgcacaggaa ttacattatt tattaccaca gaataggaat ttttctttt	13200
ctcttaaaga aaaagaatta aatattggac gaacatttgg taagctacca tatctcacac	13260
ggaatgtcca aactttatgt gaggtctgt tagcagatgg actggctaag gccttcccca	13320
gtaacatgat ggtagtaact gaacgtgaac aaaaagagag ctttcttcat caggcatcat	13380
ggcaccacac cagtgtgat tttggagaga atgctaccgt tcgaggaggt agttttgtaa	13440
ctgatttaga gaagtacaat cttgcatttc gctatgagtt cactgcacca tttattgagt	13500
actgcaacca ttgctatggt gtgcgtaatg tctttaattg gatgcattat ttaatccgc	13560
agtgttacat gcatgtaagt gattattata atccgcctca caatgttaat cttagcaatc	13620
gagaatatcc tctgaagge ccgagttcgt accgagggca cttaggagge atagagggat	13680
tacaacaaaa acigtggacg agtatatcct gtgcacaaat ctcttagtg gaaattaaaa	13740
ctggttttta gttacgatca gcggtcatgg gagacaatca gtgtataacc gtattgtctg	13800
tttttccact tgaacagac cctgaagagc aggagcaaag cgccaagac aatgctgcaa	13860
gagtagcagc aagtcttgca aaagtaacca gtgcatgtgg gatctttctt aaaccagaag	13920

agacattcgt acactcaggt ttcatttatt tcggaaaaa acaatatctc aatgggtgac	13980
aattaccgca atcactcaaa acagcagcaa gaatggcgcc actctctgat gctatattcg	14040
atgatctaca aggaacactt gccagtattg gaactgcctt cgaacgtgct atatcggaaa	14100
cgcgacatat cctcccatgt cgtattgtag cagctttcca tacgtatttc gccgttcgga	14160
ttttacaata tcaccatctt ggatttaata aaggcatcga tttagggcag ttgtcactta	14220
gtaaaccatt agactatggg actattactc taacattggc ggttccacaa gtccttgggg	14280
gattgtcttt tctaaatcca gaaaagtgtt tttatcgaaa cttcggagat cctgtgactt	14340
ctggactttt ccagctacgg gtgtacctag aaatgggtta catgaaagac ctattttatc	14400
cattaatatc gaaaaatcca ggaaattgia gtgccattga ttttgtctta aatccatccg	14460
gattaaatgt tccaggatca caagacttga catccttttt gcgacagatc gttaggcgta	14520
gtattacact aactgcaaga aataagttaa ttaacactct cttccatgcc tctgctgatt	14580
tggaagatga gatggtttgt aaatggctcc tttcatcaaa cctgtcatg agtcgctttg	14640
cagcggatat tttttccagg acacctagtg gtaaactgtc ccaaataatta ggttatcttg	14700
aagggaccag gactctattg gcctccaaaa tcataaaca caacagtgag acacctgtac	14760
ttgataagct gaggaagatc accctacaaa gatggaatct gtggttcagt tatttggacc	14820
attgtgacca attactagca gatgctctac agaaaattag ttgcacagtg gatttggccc	14880
agatttttgc tgagtataca tggtcacaca tcttagaggg tagaccattg atcggagcga	14940
cattaccatg tatggtggag caattcaaag ttaagtggct aagacaatat gaacctgtc	15000
cagaatgcct caacaaaaaa ggctcaaatg cttatgtctc agttgcagtc aaagatcaag	15060
tggtcagtgc ttggccaat acttctcgaa taagttggac aatagggagt ggtgtcccct	15120
atatagggtc aagaaccgag gataaatcg gacagcctgc aatcaagccg cgatgccctt	15180
catctgccct caaggaggct atagaattag catcaaggct cacttgggtt acacaaggaa	15240
gttctaatag tgaacaatta atccggcctt tcttagaagc gagagtcaac cttagtgtca	15300
gtgaagtctt gcaaatgaca ccatcacatt attcaggaaa tattgtccat cgatataacg	15360
accaatatag cccgcactca tttatggcga atcgcatgag caatactgcg acccgctca	15420
tagtgtcaac taatacactt ggagaatttt caggtggagg gcaggccgcc agggatagca	15480
atataatttt ccagaatgtt ataaatttag cagttgccct ttatgatatt agattccgga	15540
atacgaacac ctctgatata aggcataata gggctcatct tcacctgaca gagtgtgtga	15600
ctaaagaggt cccggcccag tatttgacat atacaagtgc actcaatctg gatttaagcc	15660

gttatcgtga taatgaacta atatatgact caaatccact gaggggagga ttgaactgca	15720
atttaacaat ggatagtcct ttagtgaagg gtcctaggct taacatgatt gaagatgac	15780
ttctccgctt tccacacctt tctggatggg agttagcgaa aacggtggta caatccatca	15840
tctcagacaa tagcaactca tcaacagatc caatcagtag cggagaaaca cgctctttca	15900
caactcattt tctcacttac cctcagattg gccttcttta cagtttcggg gcagtattat	15960
gcttttatct aggcaatact atcctatgga ctaaaaaact tgattatgaa cagtttctat	16020
attatttgca taaccagctg cacaacttac ctcatcgagc actccgtgtt tttaaaccaa	16080
catttaagca tgccagtgtg atgtcccgat taatggaaat tgattccaac ttctcaattt	16140
atattggcgg gacatctgga gatcgagggc tgctgatgc tgctcgactg tttcttcgga	16200
cagcaatcgc gagtttttta caatttctta aaagctggat catcgatcgc caaaagacaa	16260
ttcttttatg gatagtatat ccgcttgaag gtcaacagcc ggaatccatc aatgaatttc	16320
tacataaaat ttttggctcg ctcaacaag gccccaaaaa tattccaaag gaggtcagca	16380
ttcaaatga tggacatttg gatttggcag aaaataatta tgtttacaat agtaagagca	16440
ctgctagtaa tttcttccat gcactcttag ctactggag aagtaggaaa tctcggaaaa	16500
ctcaagacca taatgatttc tcaagagggg atggaacact tacagaaccg gtgtgtaagt	16560
tctcaagcaa tcatcagtc gatgaaaagt actacaatgt gacatgtgga aagtcaccga	16620
agccgcaaga acgcaaagc ttctcgcaat acagactcag caataacggg caaacaatga	16680
glaatcatcg taagaaaggg aagtccaca agtggaatcc ctgcaaagt ttaatggaga	16740
gtcaaagggg aactgttcta aaagaggtg actactttca aaacaatact ccaccaacag	16800
atgatgtatc aagtcctcac cgactcattc taccattttt taaattggga aatcacaacc	16860
atgcacatga tcaagatgcc caagaattga taaatcaaaa tattaaacag tacctacatc	16920
agctaaggtc tatgttggac accactatat attgtagatt cacagggatt gtctcatcca	16980
tgcatataa attggacgaa gttcttctag aatacaatgg tttcgattca gctatcacat	17040
tagctgaagg tgaggggtca ggggtctctat tacttttgca gaaatatagt acaaggttat	17100
tatttttgaa cacattggca acagaacaca gtatagagtc agaagttgta tcaggttttt	17160
ctactccgag aatgttgta ccaataatgc aaaaggttca tgaaggacaa gtcactgtta	17220
tcttaataa ttcagcaagt cagataactg acataactag ctcaatgtgg ttaagtaatc	17280
aaaaatataa tctacctgt caagttgaaa tcattacgat ggatgctgaa acaacagaga	17340
acttaaacag gtccaactc taccgagcag tatataactt aatacttgat cacattgac	17400
cgcagtatct caagtggtg gtactcaaag tatttctgag tgatatagaa ggaatattat	17460
ggattaatga ttacttggct ccattattcg gggctggta cttgattaaa ccgattacat	17520

caagtgcccg gtcaagtga tgggtaccttt gcttatcaaa tttgatatct actaacagga 17580
gatcggccca tcagactcac aaggcatgtc ttggtgttat cagagatgct ttgcaagcac 17640
aagtccagcg aggcgtgtac tgggtgagtc acatcgacaca gtatgctaca aagaatctcc 17700
attgtgaata catatgcctt gggttccac ctctagaaaa ggtcctatat cacaggtata 17760

atctagttag tactggactc ggtccattgt cgtcagttat tagacattta actaacctcc 17820
aggcagagat acgagactta gtattagatt ataccctgat gagagagagt cgcactcaaa 17880
cgtaccattt tattaagact gcaaaaggca gaatcacaaa gttagtcaat gactttctga 17940
agttttcttt aattgtccag gcactcaaaa ataattcttc ttggtatact gagcttaaaa 18000
aattacctga ggtgattaat gtgtgtaatc gattttatca tactcacagt tgcaaatgtc 18060
aggaaaaatt ctttgtccag acgctttatt tacaacgcct acgcgatgca gaaatcaagc 18120
taattgaacg ccttaccggg ttaatgcgat tttatccaga agggtaata tattccaatc 18180

acacataggt actaaatcat catagtatga ggaataaaat aatgataatt cctgacgaca 18240
gttttagttc cgattctaag tataatcgaa gagagtatgc caatcttaat tattaaggt 18300
aacaagctat tagttattac ttattgataa gaataaaactt tatcatagcg taacacatca 18360
taactttata gcgattttgc atttctaate ctagtattta ttagaatgta ctatcagaga 18420
aatgacccca gttcctatct ttaaataatg attgtgtgta ttaaattatt agttttattag 18480
gtttatgagt tggttacaca gtgagtatta gtaattgagg attatgtaga taggtaatct 18540
aacactgaat caccatctg atgtcacat atccaaatat tgtgctagtc gcatttaaac 18600

atgctatctt cagttaagta acatagactg aaaatgctaa gaagagattg gagtaaaagt 18660
ataaaataaa tttaattaaa cttcaaagtg attaaatgat aatgatcttg ggaactcgat 18720
atgacctcaa gtcaaaaata atgtcaatat aattgtttag taatatgagt tataatgtga 18780
attttgataa ctaactagct ttagtagtta agatcaaatg caaacattct aagaatgtta 18840
agcgcacaca aaaacattat aaaaaacaa ttttttcctt tttgtgtgc c 18891

<210> 7

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 7

tctctccna

9