

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.05.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.05.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/9910812**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.06.2002**
(Věstník č. 6/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/GB00/01749**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/68261**

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 4030

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/255

C 12 N 1/21

C 12 N 15/31

A 61 K 35/74

//(C 12 N 1/21, C 12 R 1:42)

(71) Přihlašovatel:

MICROSCIENCE LIMITED, Wokingham, GB;

(72) Původce:

Dougan Gordon, Wokingham, GB;

Santangelo Joseph David, Wokingham, GB;

Holden David William, Wokingham, GB;

Shea Jacqueline Elizabeth, Wokingham, GB;

Hindle Zoe, Wokingham, GB;

(74) Zástupce:

Kania František Ing., Mendlovo nám. 1a, Brno, 60300;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Oslabené mikroorganismy pro léčbu infekce

(57) Anotace:

Mikroorganismus Salmonela má oslabující mutaci, která narušuje expresi aparátového genu umístěného v ostrůvku patogenity Spi2, a auxotrofní mutaci. Mikroorganismus má tedy dvojitou mutaci, která pomáhá předcházet reaktivitě mikroorganismu při zachování účinnosti mikroorganismu vyvolat imunitní odpověď.

Oslabené mikroorganismy pro léčbu infekcí

2580

Oblast techniky

Tento vynález se vztahuje k oslabeným mikroorganismům, které mohou být použity v očkovacích kompozicích k prevenci nebo léčení bakteriálních nebo virových infekcí.

Dosavadní stav techniky

Je dobře známo, že živé oslabené mikroorganismy jsou vysoce účinnými vakcínami; imunitní odpovědi vyvolané takovými vakcínami jsou často většího rozsahu a delšího trvání než imunitní odpovědi produkované nereplikujícími imunogeny. Jedním vysvětlením pro toto může být to, že živé oslabené kmeny vyvolají v hostiteli omezené infekce a napodobí raná stádia přirozené infekce. Navíc, na rozdíl od usmrcených preparátů, živé vakcíny jsou schopny indukovat silné odezvy zprostředkované buňkou, které mohou být spojeny s jejich schopností replikovat se v buňkách obsahujících antigen, jako například v makrofázích.

Dlouhá je historie používání živých oslabených Salmonelových vakcín jako bezpečných a účinných vakcín k prevenci salmonelózy u zvířat a lidí. Skutečně, živá oslabená orální vakcína proti břišnímu tyfu, Ty21a (Vivotif), vyráběná institutem Swiss Serum Vaccine Institute, se ukázala být velmi úspěšnou vakcínou v prevenci před tyfem a byla povolena v mnoha zemích včetně Spojených států a Evropy.

Nicméně oslabení tohoto kmene bylo dosaženo použitím chemických mutagenních postupů a princip oslabení kmene není plně objasněn. Právě proto není tato vakcína dokonalá ve smyslu počtu dávek (momentálně čtyři) a počtu živých organismů, které musí být dané pro každou dávku.

Moderní molekulární biologické postupy, spojené se vzrůstající znalostí patogenyze Salmonely, vedly k objevu několika genů, které jsou nezbytné pro růst in vivo a přežití organismů. Toto poskytlo nové geny jako cíle pro oslabení, vedoucí k představě, že budoucí očkovací kmeny mohou být "rozumně" oslabeny zavedením definovaných nevratných mutací do vybraných genů, u kterých je známo, že se podílí na virulenci. Toto usnadní vývoj lepších vakcín, zejména co se týče imunogennosti, a tudíž počtu dávek, které musí být podány.

Ačkoli je dnes mnoho oslabených kmenů *Salmonela* známo, jen několik jich bylo kvalifikováno jako potenciální kandidáti na vakcíny pro použití na lidech. To může být částečně způsobeno potřebou udržet rovnováhu mezi imunogenností vakcíny a možností mikroorganismu *Salmonela* stát se reaktivním.

Je jasné, že výběr vhodných cílů pro oslabení, který povede ke vhodnému kandidátovi na vakcínu, je komplikovaný a nemůže být jednoduše předpovězen. Vhodnost oslabeného kmene jako vhodné vakcíny může ovlivnit mnoho faktorů a bylo provedeno mnoho výzkumů za účelem nalezení vhodných kmenů. Například mnoho oslabených kmenů testovaných jako kandidáti na vakcíny vedlo u pacientů k vakcinémii nebo abscesům.

Z toho důvodu je potřebné vyvinout vakcínu o vysokém stupni imunogennosti se sníženou možností, že se kmen mikroorganismu navrátí do reaktivní formy, a která vykazuje dobrý bezpečnostní profil s omezenými vedlejšími účinky.

Podstata vynálezu

Vynález je založen na zjištění, že dvě specifické oslabující mutace zavedené do mikroorganismu *Salmonely* mohou vytvořit vakcínu, která má vysoký stupeň imunogennosti a nízké riziko přeměny mikroorganismu v reaktivní formu. Výsledné očkovací kmeny vykazují dobrý profil vedlejších účinků.

První mutace je obsažena v oblasti patogenitního ostrůvku 2 (*Spi2*) *Salmonely*; druhá je auxotrofní mutace, tj. mutace která naruší expresi genu, který kóduje protein potřebný v biosyntetických cestách.

V souladu s prvním aspektem vynálezu má mikroorganismus *Salmonela* oslabující mutaci, která narušuje expresi aparátového genu umístěného v patogenitním ostrůvku *Spi2* a nezávislou auxotrofní mutaci. Výhodná oslabující mutace je v aparátovém genu *ssaV* a výhodná auxotrofní mutace je v *aroC*.

Mikroorganismus s výhodou dále obsahuje jeden nebo více heterologních antigenů nebo terapeutických proteinů, například antigeny proti patogenní *E. coli*, *Shigella*, hepatitidě A, B nebo C, Herpes Simplex Virus a viru lidského papilomu. Z toho důvodu mikroorganismus může působit jako dodávkový nosič zajišťující imunitu proti jiným infekcím než je *Salmonela*.

Mikroorganismy *Salmonela* mohou být použity ve výrobě léku pro nitrožilní nebo

orální podávání při léčení bakteriálních nebo virových infekcí, například pro léčení tyfu.

Oslabené mikroorganismy *Salmonela* tohoto vynálezu tvoří vakcíny, které překvapivě stimulují mukózní a systémovou imunitu. Dále mikroorganismy na zvířecím modelu nezpůsobují abscesy sleziny, kdežto mutanty s jednou mutací je způsobují. To je obzvláštní výhodou zde definovaných dvojitých mutantů.

Mikroorganismy a očkovací kompozice tohoto vynálezu mohou být připraveny známými technikami.

Výběr konkrétního mikroorganismu *Salmonela* a zvolení vhodné mutace mohou být provedeny odborníkem bez neobvyklých experimentů. Výhodným mikroorganismem je *Salmonella typhimurium*.

První mutace může být zavedena do aparátového genu umístěného v oblasti patogenického ostrůvku 2 *Salmonely*, přičemž tato oblast je popsána ve WO-A-9617951.

Patogenitní ostrůvek 2 (Spi2) *Salmonely* je jedním ze dvou klasických patogenitních ostrůvků situovaných v chromozomu *Salmonely*. Spi2 obsahuje několik genů, které kódují vylučovací systém typu III, který se účastní transportu proteinů spojených s virulencí kódovaných Spi2 (takzvaných efektorových proteinů) ven z bakterií *Salmonela* a potenciálně přímo do cílových hostitelských buněk jako jsou makrofágy. Část Spi2 (aparátový gen) kóduje vylučovací aparát systému typu III. Výzkum dnes zdokumentovaný několika různými skupinami ve světě říká, že Spi2 je rozhodně zásadní pro patogenost a virulenci *Salmonely* u myši. Mutanti Spi2 *S. typhimurium* jsou při testování imunity u myši, podáváním léku orální, intravenózní a intraperitoneální cestou, velice oslabováni.

Aparátové geny umístěné ve Spi2 jsou dnes již dobře popsány; viz například Hensel a kol., *Molecular Microbiology* (1977); 21(1): 155-167. Geny vhodné pro použití v tomto vynálezu zahrnují *ssaV*, *ssaJ*, *ssaK*, *ssaL*, *ssaM*, *ssaO*, *ssaP*, *ssaQ*, *ssaR*, *ssaS*, *ssaT*, *ssaU* a *ssaH* geny.

Mutace v oblasti Spi2 nemusí nezbytně proběhnout uvnitř genu, aby narušila funkci. Například mutace v protiproudé regulační oblasti může také narušit funkci exprese genu vedoucí k oslabení. Mutace v intergenové oblasti může být také dostačující k narušení funkce genu.

Ve výhodném provedení vynálezu je aparátovým genem ssaV. V samostatném výhodném provedení se mutace nachází v intergenové oblasti mezi ssaJ a ssaK.

Druhá mutace je nazývána „auxotrofní mutací“, protože narušuje gen, který je zásadní v biosyntetické cestě. Tuto biosyntetickou cestu obsahují Salmonely, ale u savců není přítomna. Proto nemohou být mutanti závislí na metabolitech nacházejících se u léčených pacientů a obejít tak účinek mutace. Vhodné geny pro auxotrofní mutaci jsou jakékoliv aro geny, například aroA, aroC, aroD a aroE.

Ve výhodném provedení vynálezu obsahuje očkovací kompozice mikroorganismus *Salmonela* mající oslabující mutace v ssaV a aroC.

Mutace mohou být vneseny do mikroorganismu použitím jakékoliv známé techniky. S výhodou se používá mutace delecí, kdy narušení genu je způsobeno odstraněním nukleových kyselin. Nebo mohou být mutace zavedeny insercí nukleových kyselin nebo bodovou mutací. Metody pro vkládání mutací do specifických oblastí budou odborníkovi zřejmé.

Kromě dvou mutací může také mikroorganismus *Salmonela* obsahovat heterologní antigeny. Oslabený mikroorganismus tak může působit jako dodávkový nosič pro podávání antigenů proti ostatním bakteriálním nebo virovým infekcím. Antigeny, které jsou v tomto případě vhodné pro použití, budou odborníkovi zřejmé a zahrnují:

Patogenní antigeny *E. coli*, tj. ETEC

Antigeny Hepatitidy A, B a C

Antigeny limské nemoci

Antigeny *Vibrio cholerae*

Antigeny *Helikobakterií*

Antigeny viru Herpes Simplex

Antigeny lidského viru papilomu.

Tento systém má také schopnost dodávat terapeutické proteiny, například cytokiny, pro léčení pacientů, například pacientů nakažených žloutenkou. Metody pro dodání heterologních antigenů nebo terapeutických proteinů použitím očkovacích kompozic budou odborníkovi zřejmé.

Vakcíny vyrobené použitím mikroorganismů podle vynálezu mají využití při léčbě lidí a léčbě veterinárních infekcí.

Dvojitá mutace poskytuje účinný prostředek k oslabení mikroorganismu a poskytnutí bezpečného kandidáta pro vakcínu.

Očkovací kompozice poskytují účinnou ochranu dokonce i u pacientů s oslabeným imunitním systémem a skýtají významně nízké riziko pro vytváření abscesů sleziny. Abscesy sleziny byly identifikovány při použití vakcín založených na jediné mutaci, a proto nynější kompozice mohou poskytnout podstatný přínos pro pacienty.

K vytvoření očkovacích kompozic mohou být mutované mikroorganismy přítomny v kompozici spolu s jakoumkoli vhodnou farmaceuticky přijatelnou přísadou, ředidlem nebo pomocnou látkou. Vhodné formulace budou odborníkovi zřejmé. Formulace mohou být vyvinuty pro jakoukoli vhodnou cestu podávání léků. Výhodné je orální nebo intravenózní podávání léků a vakcíny jsou živé oslabené mikroorganismy *Salmonely*. Počet mikroorganismů, které jsou ve formulaci zapotřebí, může být určen a optimalizován odborníkem. Nicméně, obecně vzato, pacientovi může být podáno přibližně 10^7 - 10^{10} CFU, nejlépe okolo 10^8 - 10^9 CFU v jedné dávce. CFU (Colonies forming units) představují zárodky schopné tvořit kolonii.

Následující příklady popisují vynález.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Tento příklad popisuje přípravu mutovaného kmene označeného jako ZH9, který působí jako orální vakcína proti tyfu u lidí. Kmen je vytvořen z virulentního kmene *S. typhi* Ty2, původně izolovaného z případu tyfu. Odvozený kmen má definovanou mutaci na *purA* a *aroA*.

Ty2 pro vytvoření ZH9

S. typhi Ty2 byl původně izolován v roce 1916 z jedince nakaženého tyfem a byl používán pro tvorbu všech povolených tyfových vakcín. Kmen byl získán z PHLS národní kolekce kultur v Colindale. Byl získán jako lyofilizovaná kultura, pod NCTC číslem 8385.

Klonování genu *aroC* *S. typhi* z *S. typhi* Ty2

S. typhi Ty2 byl izolován z dobytku a rostl v bujónu Luria Bertani (LB) přes noc. Buňky byly sesbírány a byla připravena celobuněčná DNA. Fragmenty DNA z DNA *S. typhi* Ty2 byly získány částečným štěpením s restriktivním enzymem *Sau3A* a výsledné fragmenty byly ligovány na *Bam*H1, štěpeny pHC79, aby se získala knihovna kosmidů DNA *S. typhi* Ty2, kdy *E. coli* HU835 byla použita jako recipient. K izolování DNA kódující *aroC* z DNA *S. typhi* byla použita knihovna kosmidů k transdukci *E. coli* AB2849, která má mutaci na genu *aroC* a její růst je závislý na aromatických sloučeninách. Transdukční směs byla nalisována na velmi malém médium s nedostatkem aromatických sloučenin a inkubována při 37 °C. Po inkubaci přes noc byl zkoumán počet izolovaných kolonií. Tyto bakterie pravděpodobně vznikly jako důsledek komplementace mutace *aroC* v AB2849 kosmidovým klonem uchovávajícím neporušenou formu genu *aroC*. Byl purifikován kosmid DNA jednoho z těchto kmenů. Fragment 5.2kb *Hind*III z tohoto kosmidu byl naklonován do pUC18, aby vznikl plazmid pTAC2, který byl schopen komplementovat deleci *aroC* v AB2849, čímž se dokazuje, že obsahuje gen *aroC* *S. typhi*.

Generace definované delece klonovaného *aro* *S. typhi* Ty2

Definovaná 600pb delece byla vytvořena v klonovaném *aroC* genu použitím PCR. Oligonukleotidové primery použité v PCR byly navrženy za použití publikované DNA sekvence genu *aroC* *S. typhi* (Acc. M27715). DNA 5' do genu *aroC* byl rozšířen z pTAC2 pomocí primerů SEKV. ID. Č. 3 a SEKV. ID. Č. 1. SEKV. ID. Č. 3 se navazuje k vektoru DNA, SEKV. ID. Č. 1 se navazuje k regionu 5' *aroC*. DNA 3' do genu *aroC* byl rozšířen použitím primerů SEKV. ID. Č. 4 a SEKV. ID. Č. 2. SEKV. ID. Č. 4 se navazuje k vektoru DNA, SEKV. ID. Č. 2 se navazuje k regionu 3' *aroC*. Výsledné PCR produkty měli *Xba*I místa začleněna do 5' konců kvůli usnadnění klonování. Fragmenty byly klonovány do vektoru pUC18. Výsledný konstrukt plazmidu označovaného pMIAC23 obsahuje definovanou deleci *aroC* (pozice 544 až 1143) ve fragmentu 4.8kb *Hind*III. Fragment *Hind*III je insertován do místa *Hind*III v pUC18. Jedno místo *Xba*I je přítomno v místě delece *aroC*.

Zavedení mutace *aroC* do genomu *S. typhi* Ty2

Suicidní plazmid pCVD442 (Donnenberg & Kaper, Infection and Immunity, 1991;

59; 4310-4317) byl použit jako vektor k zavedení delece *aroC* do genomu *S. typhi* Ty2. Fragment 4.8kb *Hind*III obsahující delecí *aroC* byl izolován z pMIAC23 a konce byly zarovnány, k čemuž bylo použito soupravy Stratagene DNA polishing kit. Plazmid pCVD442 byl linearizován štěpením pomocí *Sma*I, upraven alkalickou fosfatázou a ligován k fragmentům se zarovnanými konci. Požadovaný konstrukt byl izolován a označen jako pYCVC21.

pYCVC21 byl zaveden do *S. typhi* Ty2 použitím standardního elektroporačního protokolu. Plazmid byl schopen integrace do genomu Ty2, s následnou rekombinací mezi homologickými regiony na plazmidu a genomu, což dalo transformanty odolné vůči ampicilinu. Tyto transformanty obsahovaly kopii původního standardního *aroC* a deletovaného genu *aroC*. Růst těchto kmenů za nepřítomnosti ampicilinu umožnilo průběh druhé rekombinace, která vedla ke ztrátě sekvencí DNA pCVD442 a jedné kopie genu *aroC*, buď standardní kopie nebo deletované kopie. Bakterie *S. typhi* Ty2, které prošly procesem této druhé rekombinace, byly identifikovány jako deriváty citlivé na ampicilin, které jsou schopné růst za přítomnosti 5% sacharózy (pCVD442 nese gen *sacB*, který po expresi vede k fenotypům citlivým na sacharózu). Kmeny, které si udržely pouze deletovaný gen *aroC*, byly zpočátku identifikovány jako kmeny, které nejsou schopné růstu na misce s minimem média bez přídavku aromatických sloučenin. Genotyp *aroC* byl potvrzen použitím analýzy PCR. Primery, které mají SEKV. ID. Č. 5 a SEKV. ID. Č. 6, poskytly produkt 994 pb pro standardní typ *aroC* a 400 pb pro deletovaný gen *aroC*. Analýza sekvence výsledného PCR produktu potvrdila přítomnost požadované delece v 5ti jednotlivých izolátech označených DTY6, DTY7, DTY8, DTY9 a DTY10. Tyto kmeny byly uschovány v vialkách Microbank pro dlouhodobé uskladnění při -70 °C. Kmen DTY8 byl vybrán pro další manipulaci.

Zavedení mutace *ssaV* do mutantu DTY8 *aroC S. typhi*

7,5kb fragment *Pst*I obsahující region *ssaV* *S. typhi* byl rozšířen z přípravy celkové DNA za použití PCR a klonován do vektoru pCR2.1 (Invitrogen). Použité oligonukleotidové primery PCR, které mají SEKV. ID. Č. 7 a SEKV. ID. Č. 8, byly navrženy do sekvence *S. typhimurium* SPI2. Výsledný konstrukt plazmidu byl označen pTYSV21.

Konstrukt plazmidu, který má delecí genu *ssaV*, byl odvozen z pTYSV21 použitím opačně orientované PCR. Primery navázané k 5' (SEKV. ID. Č. 9) a 3' (SEKV. ID. Č. 10)

oblastem otevřeného čtecího rámce *ssaV* byly navrženy do sekvence *S. typhimurium* Spi2. Restrikční místo *AvrII* bylo začleněno do oblasti 5' každého primeru, místo *XbaI* bylo začleněno do SEKV. ID. Č. 10. Místo *XbaI* slouží jako značka pro *ssaV* mutaci, tudíž může být jednoduše detekováno restrikční analýzou. Výsledný produkt PCR byl podroben štěpení s *AvrII* a molekuly hlavního řetězce plazmidu byly přečištěny po agarózové gelové elektroforéze. Recirkularizace výsledných fragmentů u kohezních konců *AvrII* dala požadovanou sestavu delece pYDSV1. pYDSV1 obsahuje 5,5kb fragment *PstI* s definovanou 1894pb delecí v otevřeném čtecím rámci *ssaV*.

Suicidní plazmid pCVD442 byl použit jako vektor k zavedení delece *ssaV* do genomu DTY8 mutantu *aroC* *S. typhi* Ty2. Fragment 5,5kb *PstI* obsahující delecí *ssaV* byl izolován z pYDSV1 a konce byly zarovnány působením Klenow DNA polymerázy. Plazmid pCVD442 byl linearizován štěpením se *SmaI*, upraven pomocí alkalické fosfatázy a ligován k fragmentům se zarovnanými konci. Požadovaný konstrukt byl izolován a označen pYDSV214.

pYDSV214 byl elektroporací zaveden do DTY8 *S. typhi*. Byly vybrány transformanty odolné vůči ampicilinu a následně pěstovány za nepřítomnosti ampicilinu, aby se poskytla ztráta sekvencí DNA pCVD442 a jedné kopie genu *ssaV*, buď standardní kopie nebo deletované kopie. Kmeny, které absolvovaly tuto druhou rekombinaci, byly identifikovány jako ampicilin senzitivní kolonie, odolné vůči sacharóze. Kmeny, které si uchovávaly pouze deletovaný gen *ssaV* byly identifikovány použitím PCR analýzy. Primery mající SEKV. ID. Č. 11 a SEKV. ID. Č. 12 poskytly 2485pb produkt pro standardní typ *ssaV* a 591pb pro deletovaný gen *ssaV*. Sekvenční analýza výsledných produktů PCR potvrdila přítomnost požadované delece u pěti jednotlivých izolátů ZH2, ZH4, ZH6, ZH7 a ZH9. Kmen ZH9 byl vybrán pro zpracování CGMP vzorové banky buněk.

Příklad 2

Tento příklad popisuje přípravu mutantního kmene *S. typhimurium* označovaného jako WT05, který má očkovací aktivitu proti lidské gastroenteritidě. Kmen je odvozen od známého lidského virulentního kmene TML *S. typhimurium*.

TML pro konstrukci WT05

TML byl původně izolován z pacienta trpícího gastroenteritidou a byl identifikován

v laboratořích Dr. Johna Stevense na Birminghamské univerzitě. Byl lyofilizován ve Wellcome Research Laboratories a bylo mu přiděleno číslo kultury BRD 519. Kultura byla získána z Birminghamské university.

Generace definované delece klonovaného genu *ssaV* *S. typhimurium*

Plazmid (plazmid 7-2, Shea a kol.; PANS, 1996; 93; 2593-2597) byl vytvořen klonováním fragmentu 7,5kb *Pst*I izolovaného ze *S. typhimurium* LT2 do místa *Pst*I pUC18. *ssaV* je situován uprostřed tohoto fragmentu. Plazmidový konstrukt obsahující definovanou deleci *ssaV* ORF byl odvozen z plazmidu 7-2 použitím opačně orientované PCR. Primery navázané na 5' (SEKV. ID. Č. 13) a 3' (SEKV. ID. Č. 14) oblasti otevřeného čtecího rámce *ssaV* byly navrženy pro sekvenci *S. typhimurium* Spi2. Restrikční místo *Avr*II bylo začleněno do oblasti 5' každého primeru a místo *Xba*I bylo začleněno do SEKV. ID. Č. 14. Místo *Xba*I slouží jako značka pro mutaci *ssaV*, takže může být lehce detekováno pomocí restrikční analýzy. Výsledný produkt PCR byl podroben štěpení s *Avr*II a molekuly hlavního řetězce plazmidu byly purifikovány po agarové gelové elektroforéze. Recirkularizace výsledných fragmentů u kohezních konců *Avr*II dala požadovanou sestavu delece označenou pMDSV1. pMDSV1 obsahuje 5,5kb fragment *Pst*I s definovanou 1849pb delecí v otevřeném čtecím rámci *ssaV*, v místě delece jsou restrikční místa *Avr*II a *Xba*I.

Suicidní plazmid pCVD442 byl použit jako vektor pro zavedení delece *ssaV* do genomu *S. typhimurimu* TML. Fragment 5,5kb *Pst*I obsahující deleci *ssaV* byl izolován z pMDSV1 a jeho konce byly zarovnány působením Klenow DNA polymerázy. Plazmid pCVD442 byl linearizován štěpením s *Sma*I, upraven pomocí alkalické fosfatázy a ligován k fragmentům se zarovnanými konci. Byl izolován požadovaný konstrukt a označen pMDSV22.

pMDSV22 byl zaveden do *S. typhimurium* TML použitím konjugace. Za tímto účelem byl konstrukt transformován do kmene *E. coli* S17-1 λ pir. Konjugace byla provedena podle standardních procedur. Plazmid pMDSV22 byl schopen integrace do genomu TML po rekombinaci mezi homologickými regiony na plazmidu a genomu, aby dal transkonjugáty odolné vůči ampicilinu. Transkonjugát označený jako mdsv-WT2 byl vybrán pro další zpracování. Tento transkonjugát obsahuje jak kopii původního standardního *ssaV*, tak deletovaného genu *ssaV*. Byl vypěstován bez přítomnosti ampicilinu, aby

došlo k druhé rekombinaci, která by vedla ke ztrátě sekvencí DNA pCVD442 a jedné kopie genu *ssaV*, a to buď standardní kopie nebo deletované kopie. Izoláty, které prošly touto druhou rekombinací, byly identifikovány jako ampicilin-senzitivní deriváty, které byly schopné růstu za přítomnosti 5% sacharózy (pCVD442 nese gen *sacB*, jehož exprese vede k fenotypům citlivým na sacharózu). Kmeny, které si ponechaly pouze deletovaný gen *ssaV*, byly identifikovány použitím analýzy PCR. Primery, které mají SEKV. ID. Č. 15 a SEKV. ID. Č. 16, poskytly produkt 2485pb pro standardní *ssaV* a 591pb pro deletovaný gen *ssaV*. Sekvenční analýza výsledných produktů PCR potvrdila přítomnost požadované delece ve čtyřech individuálních izolátech ZH20, ZH23, ZH25 a ZH26. Tyto kmeny byly uchovány v LB a 15% glycerolu při -80 °C pro dlouhodobé skladování. Kmen ZH26 byl vybrán pro další použití.

Klonování genu *aroC* *S. typhimurium* z *S. typhimurium* TML

Genomová DNA byla izolována ze *S. typhimurium* TML a rozštěpena s *Hind*III. Fragmenty *Hind*III v rozmezí velikosti 5 až 6 kb byly purifikovány a ligovány k *Hind*III-rozštěpenému pBluescriptu. Ligovací směs byla použita k transformaci mutantu *aroC* *E. coli* AB2849 a klony obsahující gen *aroC* *S. typhimurium* byly vybrány na základě jejich schopnosti komplementovat tento kmen. Analýza jednoho klonu pDAC1 ukázala, že obsahoval 5,2kb fragment *Hind*III.

Definovaná 600pb delece byla vytvořena v klonovaném genu *aroC* použitím PCR. Oligonukleotidové primery byly navrženy s použitím publikované sekvence DNA genu *aroC* *S. typhi* (Acc. M27715). DNA 5' ke genu *aroC* byla rozšířena z pDAC1 použitím primerů majících SEKV. ID. Č. 19 a SEKV. ID. Č. 17. SEKV. ID. Č. 19 se navazuje na vektor DNA, SEKV. ID. Č. 17 se navazuje na region 5' *aroC*. DNA 3' ke genu *aroC* byla rozšířena použitím primerů majících SEKV. ID. Č. 20 a SEKV. ID. Č. 18. SEKV. ID. Č. 20 se navazuje k vektoru DNA, SEKV. ID. Č. 18 se navazuje k regionu 3' *aroC*. Výsledné produkty PCR měly pro usnadnění klonování místa *Xba*I začleněná do 5' konců. Fragmenty byly klonovány do vektoru pUC18. Výsledný plazmidový konstrukt pMIAC8 obsahující definovanou deleci *aroC* (Acc. M27715 pozice 544 až 1143) na 4,8kb fragmentu *Hind*III. Fragment *Hind*III je vložen do místa *Hind*III pUC18. Jediné místo *Xba*I je přítomno v místě delece.

Zavedení mutace *aroC* do ZH26 mutantu *ssaV* *S. typhimurium*

Suicidní plazmid pCVD442 byl použit jako vektor pro zavedení delece *aroC* do genomu *S. typhimurium* TML. 4,8kb fragment *Hind*III obsahující deleci *aroC* byl izolován z pMIAC8 a konce byly zarovnaný použítím sestavy Stratagene DNA polishing kit (Část č. 200409). Plazmid pCVD442 byl linearizován štěpením s *Sma*I, upraven pomocí alkalické fosfatázy a ligován k fragmentům se zarovnanými konci. Požadovaný konstrukt byl izolován a označen pMCVC16. pMCVC16 byl zaveden do *S. typhimurium* ZH26 použitím elektroporace. Byly vybrány transformanty odolné vůči ampicilinu a nechaly se růst za nepřítomnosti ampicilinu, aby se dosáhlo ztráty sekvencí DNA pCVD442 a jedné kopie genu *ssaV*, buď standardní kopie nebo deletované kopie. Kmeny, které absolvovaly druhou rekombinaci, byly identifikovány jako ampicilin-senzitivní deriváty, které byly schopny růstu v přítomnosti 5% sacharózy. Kmeny, které si uchovaly pouze deletovaný gen *ssaV*, byly na začátku identifikovány jako kmeny, které nebyly schopné růstu na misce s minimem média bez přídavku aromatických sloučenin. Genotyp *aroC* byl potvrzen použitím PCR analýzy. Primery mající SEKV. ID. Č. 21 a SEKV. ID. Č. 22 daly 994pb produkt pro standardní typ *aroC* a 400pb pro deletovaný gen *aroC*. Sekvenční analýza výsledných produktů PCR potvrdila přítomnost požadované delece ve čtyřech individuálních izolátech WT05, WT09, WT10 a WT12. Kmen WT05 byl vybrán pro výrobu CGMP vzorové banky buněk.

Příklad 3

Následující konstrukt byl připraven za účelem testování dvojité mutovaných vakcín na zvířecím modelu. *S. typhimurium* SL1344, kmen, který infikuje myši, byl použit s přítomnými jednoduchými a dvojitými mutacemi.

ssaV::aph (nepolární) mutace z *S. typhimurium* 12023s byla transdukována P22 do SL1344, aby se získal jednoduchý mutant Spi2.

Delece *aroC*/pCVD422suicidní vektor pMCVC16 byl elektroporován do kmene *S. typhimurium* LB5010 a byly získány merodiploidy. Merodiploid delece *aroC* byl potom transdukován P22 z merodiploidu LB5010 do SL1344. Merodiploid SL1344 byl následně analyzován použitím sacharózové selekce, za účelem získání jednoduchého mutantu *aroC*.

Dvojitý mutant byl vytvořen transdukci merodiploidu P22 delece *aroC* z LB5010 do SL1344 *ssaV::aph*. Sekvence plazmidů byly analyzovány z výchozího kmene 3 merodiploidu, mutace deletovaného *aroC* v SL1344 *ssaV::aph* pozadí.

Preklinické farmakodynamické studie na definovaných mutantech *Salmonely aroC/ssaV*

Mutanti *Salmonely* (kmen SL1344) mající definované mutace buď v *aroC*, *ssaV* nebo kombinaci obou mutací, byly rozsáhle hodnoceny u myší BALB/C kvůli posouzení oslabení, vytrvalosti organismů a schopnosti imunizovat vůči napadení kmenem standardního typu.

Příklad 4

Zvířata imunizovaná intravenózní cestou

Pozorování obrany

Skupiny deseti myší BALB/C byly imunizovány intravenózně s 10^5 a 10^6 SL1344 *aroC*, SL1344 *ssaV* a SL1344 *aroC::ssaV* organismy vypěstovanými přes noc v bujónu LB a znovu suspendovanými v solném roztoku, pro podání. Myši byly napadeny o 6 týdnů později 10^5 organismy standardního typu podávanými intravenózně. Deset organismů tohoto kmene standardního typu podaných intravenózně dostačuje k usmrcení myší.

Všechny myši, jimž byl podán jednoduchý mutant *aroC* nebo *ssaV*, byly pevně chráněny po působení kterékoli dávky a přežily experiment dobře, aniž by vykazovaly jakýkoli příznak nemoci. U dvojité mutace bylo 90 % zvířat, které byly imunizovány 10^6 organismy, pevně chráněno. Jedno zvíře uhynulo 8 dní po napadení. U zvířat, která byla imunizována nižšími dávkami, napadení přežila pouze jedna myš.

Tento pokus ukazuje, že imunizování mutanty *ssaV Salmonely* jak samotné, tak v kombinaci s mutací *aroC*, činí myši odolné proti napadení standardními typy kmenů *Salmonely*.

Vytrvalost kmenů

Skupině myší bylo podáno 10^6 organismů tří mutantů *Salmonely* popsaných výše. Čtyři myši byly záměrně usmrceny v různých časových intervalech během 14 dnů a bylo provedeno sčítání organismů v játrech a slezině. Množství všech tří mutantů byla srov-

natelná až do 10. dne, kdy množství organismů v každém orgánu bylo přibližně 5×10^5 . Rozdíl mezi jednoduchými mutanty a dvojitými mutanty se projevil 14. den, kdy byl zaznamenán menší počet dvojitých mutantů mikroorganismů v játrech i ve slezině.

Další důležitý rozdíl mezi jednoduchými mutanty a dvojitými mutanty *aroC/ssaV* je v tom, že s dvojitými mutanty nedošlo během experimentu v žádném časovém období k žádnému abscesu jater. Avšak myši infikované jednoduchými mutanty měly abscesy jater během 10. a 14. dne. Toto je důležité zjištění a výrazně podporuje použití kombinace mutací pro zhodnocení přípravy vakcín.

Imunogennost

Výše uvedeným imunizovaným myším byla odebrána krev a použitím ELISA byly titrací stanoveny koncentrace protilátek proti celé buňce *Salmonely*. U všech tří kmenů bylo názorně dokázáno, že jsou vysoce imunogenní, vyvolávající vysoké koncentrace cirkulujícího IgG proti *Salmonelle*.

Příklad 5

Zvířata imunizovaná orální cestou

Vytrvalost kmenů

Skupiny myší imunizovaných orálně s 5×10^9 mikroorganismy každého ze tří mutantů *Salmonely* byly záměrně usmrceny v daných časových intervalech a byly sečteny organismy v játrech a slezině. Počet jednoduchých mutantů *aro* a jednoduchých mutantů *ssaV* v játrech a slezině bylo 10^3 a 10^2 , v tomto pořadí, až do asi 21. dne. Potom se počty snížily. U myší, které dostaly dvojité mutanty *aroC: ssaV*, byly organismy po orální imunizaci v játrech a slezině prakticky nezjistitelné.

Orální imunizace a intravenózní napadení myší A-J očkovaných *Salmonelou typhimurium* TML *aroC/ssaV* (WT05)

Účelem tohoto experimentu bylo zjistit účinnost ochrany 5×10^9 mutantů *aroC/ssaV S. typhimurium* TML u modelu orální vakcinace ity^r myší a intravenózního napadení. Tento model se blíže podobá lidské reakci na *Salmonelu* v tom, že tato zvířata jsou méně náchylná než prostředí ity^s.

5×10^9 *S. typhimurium* TML *aroC/ssaV* v objemu 0,2 ml PBS bylo sondou orálně naočkováno do žaludku deseti 6 až 8 týdnů starých myší A-J a ponecháno 8 týdnů. Dvě

myši dostaly pouze BPS a sloužily jako kontrolní zvířata. Po uplynutí 8 týdnů byly napadeny tyto dvě imunizované skupiny intravenózně s 10^7 *S. typhimurium* TML standardního typu. Myši byly poté sledovány po 30 dní.

Všechna zvířata byla pevně chráněna proti napadení standardním typem (100% přežití, 10/10 zvířat přežilo). Myši, jimž byl podán pouze samostatný PBS a potom byly napadeny s *S. typhimurium* TML standardního typu zemřelo 6 dní po začátku napadení.

V prostředí ity^r se zdá, že dvojitá *S. typhimurium* TML aroC/ssaV chrání myši při podání orální dávky 5×10^9 . Toto může být důležité pro lidské poměry, protože ity^r myši jsou lepší model lidské salmonelózy, ve vztahu k náchylnosti k infekci.

Byla také prováděna pozorování za účelem vyhodnocení vytrvalosti dvojitých mutantů v játrech a slezině myši. Bylo zjištěno, že dvojití mutanti přetrvávají na nižší úrovni do přibližně 21. dne. Do 28. dne mutantní kmen zmizel.

Příklad 6

Klinické testování na lidech

18 zdravých dobrovolníků bylo získáno ke kontrolovanému zkoumání „open label“, bez placeba. Po příslušných vyšetřeních obdržel každý ze tří dobrovolníků jednu orální dávku buď 10^7 , 10^8 nebo 10^9 CFU *S. typhi* ZH9 nebo *S. typhimurium* WTO5. Mikroorganismy připravené jak je popsáno výše byly znovu rozpuštěny do příslušných dávkovacích koncentrací v konečném objemu 100 ml 2% (hmotn./obj.) roztoku uhličitanu sodného, aby se neutralizovaly žaludeční kyseliny. Tato kapalná suspenze byla orálně podána dobrovolníkům. Potom byli dobrovolníci 72 hodin izolováni a poté následovala post imunizace kvůli bezpečnosti a imunogennosti.

U dobrovolníků byla pozorováním, lékařskou prohlídkou a zkompletováním lékařské karty zhodnocena reakce a další nepříznivé následky spojené s vakcinací. Vedle toho byly odebrány kultury krve, stolice a moči kvůli kvantitativnímu rozboru na vakcínemii, ztrátu a vytrvalost kmenů vakcíny. Navíc byla měření hladiny C-reaktivního proteinu (CRP), enzymů funkce jater (ALT) v krvi, celkového počtu bílých krvinek (WBC) a míry sedimentace erytrocytů pomocí standardních procedur získána bezpečnostní data. Tyto parametry byly měřeny v krvi odebírané denně až do 7. dne potom týdně až do 28. dne.

Analýza mukózních a systémových imunitních reakcí

Vzorky krve a slin byly shromažďovány již před imunizací a potom 7., 14., 21. a 28. den po imunizaci. Sliny a sérum byly zmrazeny na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do analýzy ELISA. Periferní krevní jednojaderné buňky byly shromažďovány a analyzovány na přítomnost buněk vylučujících protilátky (ASC) použitím techniky ELISPOT.

S. typhi ZH9 i *S. typhimurium* WT05 byly dobře snášeny všemi dobrovolníky. Nebyly zaznamenány žádné závažné nepříznivé následky u žádného z dobrovolníků v žádné ze 3 dávkovacích úrovní a kultury krve a moči zůstaly negativní u všech očkováných jedinců po celou dobu testování. Tudíž imunizace s *S. typhi* ZH9 a *S. typhimurium* WT05 nevyústila ve vakcinémii. Ani jeden z podaných kmenů nevyvolal u žádného z dobrovolníků průjem nebo vytrvalou horečku s vysokými teplotami, což dále dokazuje bezpečnost kmenů vakcín. Vytrvalé vylučování nebo vakcinémie nebyly po 7 dnech pozorovány u žádné ze 3 skupin dávek *S. typhi* ZH9 nebo nízké dávky (10^7) *S. typhimurium* WT05.

Mukosální a systémové imunitní reakce vyvolané *S. typhi* ZH9

Orální imunizace s jednou nízkou dávkou (1×10^7 CFU) *S. typhi* ZH9 měla za následek aktivaci *S. typhi*-specifických IgA-vylučujících ASC detekovanou u 2 ze 3 dobrovolníků 7 dní po imunizaci. Následné testování 14. a 21. den ukázalo, že IgA ASC jsou stále detekovatelné, ale v daleko nižších hladinách a zmizely do 28. dne. U skoro všech očkováných respondentů byl počet ASC nejvyšší 7. den. Překvapivě přijetí vyšší dávky (10^8 CFU) *S. typhi* ZH9 mělo za následek nízkou odezvu IgA ASC u pouze jednoho ze tří očkováných jedinců. Přijetí nejvyšší dávky (1×10^9 CFU) aktivovalo IgA ASCs u 2 ze 3 dobrovolníků.

Reakce protilátek séra specifického pro Salmonelu

Orální imunizace s jednou nízkou dávkou (1×10^7 CFU) *S. typhi* ZH9 nevyvolala IgG *S. typhi* LPS-specifického séra (přestože vytvářela IgA-ASCs u 2/3 očkováných jedinců) při vyšetření 7., 14., 21. a 28. den. Podobně pouze 1/3 vytvářela velmi nízké hladiny flagella-specifických IgG. Nicméně přijetí 10^8 CFU vedlo k produkci vysokých hladin LPS- a flagella-specifických IgG u všech tří dobrovolníků. Již 7 dní po vakcinaci byly zjištěny zvýšené hladiny *S. typhi* LPS-specifických a flagella-specifických, které stouply 14. den a zůstávaly vysoké i 28. den. Nejvyšší dávka 10^9 CFU také stimulovala u 2 ze 3

očkovaných jedinců LPS- a flagella-specifické IgG, zjiitelné 7., respektive 14. den.

Závěr

Tato studie demonstrovala užitečnost mutace *ssaV* jako složky jakékoli nové orální vakcíny proti tyfu. Kmen *S. typhi* mající pouze samotné mutace *aro* by u podaných dávek způsoboval vakcinémie. Mutace *ssaV* proto poskytují dodatečný stupeň bezpečnosti u samostatných mutací *aro* odstraněním vakcinémií použitím této první mutace.

ZH9 se, stejně tak jako v případě dokázání dobré tolerance, také projevil jako imunogenní u všech 3 úrovní podaných dávek. Pokud jde o stimulaci protilátek séra, střední (10^8 CFU) a vysoké (10^9 CFU) dávky se ukázaly být vysoce imunogenní, přičemž 3/3 vakcíny podané s 10^8 CFU a 2/3 podané s 10^9 CFU vyvolávají vysoké koncentrace *S. typhi* IgG LPS- a flagella-specifického séra. Tyto reakce jsou velmi povzbudivé, protože je obecně náročné vyvolat protilátky séra orální vakcinací.

Stejně jako ZH9 vyvolala reakce *S. typhi*-specifických protilátek na sérum, aktivovala také IgA ASC, svědčící o imunní stimulaci ve střevní (sliznici). U celkem 5/9 dobrovolníků byla vyvolána reakce *S. typhi* LPS-specifických IgA-vylučujících buněk (ASC), která se nejevila jako závislá na dávce.

WT05 byl také docela tolerován a nebyly zjištěny žádné vakcinémie. Zajímavé je, že u žádného z dobrovolníků nebyly zjištěny žádné případy průjmů nebo příznaky gastroenteritidy. Předchozí data získaná použitím mutantního kmene TML s jednoduchou mutací *aro* nebo SPI2 u *S. typhimurium* podaného myším naznačovala, že dvojitý mutant *aroC/ssaV* může způsobovat nějaké lokální střevní účinky, například průjem nebo křeče u lidí. Absence těchto účinků dále podporuje užitečnost kombinace mutací *aro* a SPI2.

Příklad 7

Heterologní nosiči antigenů

Aby byla názorně dokázána užitečnost kmenů s dvojitou mutací *ssaV:aroC* pro expresi a doručování cizích antigenů, byl transformován WT05 s plazmidem (pBRD026) exprimujícím gen pro B podjednotkou (LT-B) teplotně labilního enterotoxinu *E. coli*.

Myši BALB/C (n=10/skupina) byly orálně imunizovány ve dny 0 a 28 s 10^9 CFU (200 ml v PBS) WT05 exprimujícím pBRD026 nebo s vektorovým kmenem WT05 (kon-

trolním). Pro srovnání (a jako pozitivní kontrola) byla orálně imunizována skupina myší ($n=5$) ve dnech 0 a 28 s 10 μg čisté LT (Sigma). Negativní kontrolní myší ($n=5$) byly orálně imunizovány ve dnech 0 a 28 s 200 μl PBS. Myším byla z ocasní žíly odebrána krev 21., 28., 35. den a srdeční punkcí 42. den, tato krevní séra a střevní výplach (pouze ze 42. dne) byly shromážděny a skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Všechny myši imunizované WT05/LT-B, kromě jedné, vyvolaly IgG LT-specifický (koncentrace 3 000 až 50 000) 28. den po jedné orální dávce. Žádná z kontrolních myší orálně imunizovaných s WT05 nebo PBS nevyvolala IgG LT-specifický. Orální imunizace jednou dávkou čistého LT vyvolala vyšší koncentrace LT-specifických protilátek (koncentrace 6 000 až $>50\,000$). Když byl zkoumán izotyp LT-B-specifický IgG séra, bylo zjištěno, že kmen WT05 exprimující pBRD026 vyvolával skoro výhradně LT-specifický IgG2a, znamenající tendenci k imunitní reakci TH1-typu. Naopak myši imunizované čistým LT (Sigma) vyvolávaly skoro výhradně LT-specifický IgG1, označující odezvu TH2-typu. Proto exprese LT-B ve kmeni *aroC/ssaV* usnadňuje intenzivní zmírnění imunity. Reakce s tendencí TH1, vytvářené kmenem *aroC/ssaV* Salomely, budou důležité, když jsou exprimovány antigeny z patogenních organizmů, které jsou chráněny reakcemi TH1-typů.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Mikroorganismus *Salmonella* mající oslabující mutaci, která narušuje expresi aparátového genu lokalizovaného v patogenitním ostrůvku Spi2, a auxotrofní mutaci.
2. Mikroorganismus podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** auxotrofní mutace narušuje expresi genu *aro*.
3. Mikroorganismus podle nároku 2, **vyznačující se tím, že** genem *aro* je *aroC*.
4. Mikroorganismus podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím, že** oslabující mutace narušuje expresi kteréhokoli z genů *ssaV*, *ssaJ*, *ssaK* nebo *ssaH*.
5. Mikroorganismus podle kteréhokoliv z předešlých nároků, **vyznačující se tím, že** oslabující mutace narušuje *ssaV* a auxotrofní mutace narušuje *aroC*.
6. Mikroorganismus podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím, že** oslabující mutace je v intergenovém regionu mezi *ssaK* a *ssaJ*.
7. Mikroorganismus podle kteréhokoliv z předešlých nároků, **vyznačující se tím, že** mikroorganismus dále obsahuje heterologní antigen nebo terapeutický protein.
8. Mikroorganismus podle nároku 7, **vyznačující se tím, že** antigenem je antigen hepatitidy A, B nebo C.
9. Mikroorganismus podle kteréhokoliv z předešlých nároků, **vyznačující se tím, že** mikroorganismem je *Salmonella typhi* Ty2.
10. Mikroorganismus podle jakéhokoliv z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím, že** mikroorganismem je mikroorganismus označený zde jako ZH9 nebo WT05.
11. Mikroorganismus podle kteréhokoliv z předešlých nároků pro použití v terapii.
12. Očkovací kompozice obsahující mikroorganismus podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, a pomocnou látku a fyziologicky přijatelné ředidlo.

13. Očkovací kompozice podle nároku 12, **vyznačující se tím, že** obsahuje 10^7 až 10^{10} CFU v jedné dávce.
14. Očkovací kompozice podle nároku 13, **vyznačující se tím, že** obsahuje 10^8 až 10^9 CFU.
15. Použití mikroorganismu jak byl definován ve kterémkoli z nároků 1 až 10, pro výrobu léčiva v intravenózní dávkové formě pro léčbu systémových bakteriálních infekcí.
16. Použití mikroorganismu jak byl definován ve kterémkoli z nároků 1 až 10, pro výrobu léčiva v orální dávkové formě pro léčbu systémových bakteriálních infekcí.
17. Použití podle nároku 15 nebo nároku 16 pro léčbu tyfu.

SEQUENCE LISTING

<110> Microscience Limited

<120> Attenuated Microorganisms for the Treatment of
Infection

<130> REP06128WO

<140>

<141>

<150> 9910812.8

<151> 1999-05-10

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 1

aatcagtcta gaaatactgg tgccgggtcgt cacgcc

36

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 2

aatcagtcta gaagtgggca acacattgtg gcgcat

36

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 3

cccagtcacg acgttgtaaa acg

23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 4

agcggataac aatttcacac agg

23

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 5

cggcgaaatca cacgggctgg c

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 6

ggcgcagcag gtgatccatc a

21

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 7

gccactaaca cgataacggt tgcgtgaaaa ccacg

35

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 8

tgtaaagtcc tctgcagaac cgagccagga gc

32

<210> 9

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 9

caccgtccct aggaccatat cctgccgacc cgcgcataca ctgagccact gttgcgcct 60
g 61

<210> 10

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 10

ggcaggacct aggctagtct agacttatac aagtggtaga aagtattgac cttagcgaag 60
agg 63

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 11

aatatgttct ggcggcaagg

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 12

atccccacga cttcagcaag

20

<210> 13

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 13

caccgtccct aggaccatat cctgccgacc cgcgcataca ctgagccact gttgcgccct 60
g 61

<210> 14

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 14

ggcaggacct aggctagtct agacttatac aagtggtaga aagtattgac cttagcgaag 60
agg 63

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 15

aatatgttct ggcggcaagg

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 16

atccccacga cttcagcaag

20

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 17

aatcagtcta gaaatactgg tgccggtcgt cacgcc

36

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 18

aatcagtcta gaagtgggca acacattgtg gcgcat

36

<210> 19

<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 19
cccagtcacg acgttgtaaa acg

23

<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 20
agcggataac aatttcacac agg

23

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 21
cggcgaatca cacgggctgg c

21

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide

<400> 22
ggcgcagcag gtgatccatc a

21