(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0115528
(43) 공개일자 2023년08월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/002 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 33/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/002 (2013.01)
A61P 33/10 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-0012118
(22) 출원일자 2022년01월27일
심사청구일자 2022년01월27일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
전복실
서울특별시 동대문구 경희대로 26, 의과대학 126호 의동물학교실(회기동, 경희대학교)
윤건웅
경기도 용인시 처인구 금령로106번길 14-8, 1805호(김량장동)
(74) 대리인
특허법인태백

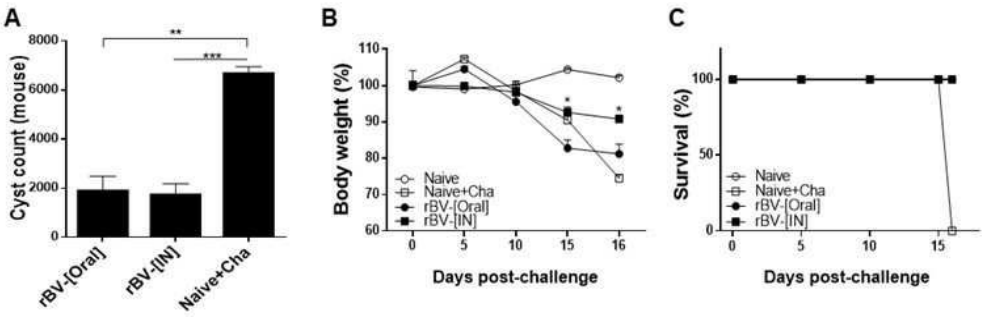
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **톡소포자충의 항원 ROP4를 포함하는 재조합 베큘로바이러스 백신**

(57) 요 약

본 발명은 톡소포자충의 항원 곤봉체 단백질 4(rhoptry protein 4; ROP4)를 포함하는 재조합 배큘로바이러스 백신에 관한 것으로서, 구체적으로, 베큘로바이러스 백신은 유전자 공학기술로 선택적 항체 생성의 장점이 있다. 또한, 비병원성으로 안전하며 포유류 세포 또는 동물 모델에서 세포 독성 및 병리가 관찰되지 않는다. 이런 기반을 바탕으로 인간의 베큘로바이러스에 대한 기존의 면역이 없는 내재적 특성을 결합하면 톡소포자충 외에도 다양한 감염 질환에 적용하여 기술적인 파급 효과를 야기할 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61K 2039/5256 (2013.01)
A61K 2039/542 (2013.01)
A61K 2039/543 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345331688
과제번호 2018R1A6A1A03025124
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 활성산소 조절을 통한 만성질환병 예방치료에 관한 연구
기 여 율 50/100
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465034272
과제번호 HV20C0142010021
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 감염병예방치료기술개발사업(R&D)
연구과제명 호흡기 세포융합 바이러스의 바이러스 유사입자 백신 플랫폼의 비임상시험 및 유효성 평가
기 여 율 50/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2021.07.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

톡소포자충 항원 곤봉체 단백질 4(rhoptry protein 4; ROP4)를 발현하는 재조합 발현 벡터가 형질감염된 재조합 바이러스를 포함하는 톡소포자충에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 백신 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 ROP4는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 ROP4는 서열번호 2의 핵산 서열에 의해 암호화되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 바이러스는 베큘로바이러스(Baculovirus)인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 백신 조성물은 경구 또는 비강 투여하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 6

톡소포자충 항원 곤봉체 단백질 4(rhoptry protein 4; ROP4)를 발현하는 재조합 발현 벡터로 바이러스 세포를 형질 감염시키는 단계; 및

상기 바이러스 세포를 배양하여 ROP4를 발현시키는 단계를 포함하는 톡소포자충에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 백신 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 ROP4는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신 제조 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 바이러스는 베큘로바이러스(Baculovirus)인 것을 특징으로 하는 백신 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 톡소포자충의 항원 곤봉체 단백질 4(rhoptry protein 4; ROP4)를 포함하는 재조합 베큘로바이러스 백신에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 톡소포자충은 세포 내 기생충(obligare intercellular parasite)으로서 전 세계적으로 분포하는 인간 및 동물에 대한 톡소포자충증(Toxoplasmosis)을 야기하는 원인 원충이다. 전 세계 인구의 약 3분의 1 이상이 톡소포자충에 감염된 것으로 추정되며, 국내에서도 그룹에 따라 2 내지 25%의 감염율을 나타내는 것으로 보고된다.

[0003] 톡소포자충은 산모를 감염시켰을 때 톡소포자충의 영양형(trophozoite)은 태반을 거쳐 태아를 감염시킬 수 있다. 톡소포자충의 감염에 의해 초기의 태아는 유산 또는 사산에 이를 수 있으며, 중후기의 태아는 정상적 분만에도 불구하고 시력손상, 수두증, 정신박약 등의 선천적 기형이 야기될 수 있다. 또한, 건강한 개체를 감염시킨 톡소포자충은 면역계 세포, 망상내피계 세포 등을 파괴시켜 림프선염, 망막맥락막염, 뇌척수염 등의 질병을

유발할 수 있으며, 숙주의 면역부전시 뇌에서 증식된 낭포(Cyst)가 활성화 되어 뇌수막염 또는 망막맥락막염을 일으킬 수 있다.

[0004] 톡소포자충 감염증은 보통 스피라마이신(spiramycin) 또는 피리메타민(pyrimethamine)을 단독으로 투여하거나, 말라리아의 예방약으로 개발된 피리메타민과 설파(sulfa)제를 병용 투여함으로써 치료한다. 그러나, 스피라마이신은 약효가 크지 않아 예방용으로 쓰이고 있으며, 피리메타민은 임신 중에는 치료 효과가 잘 나타나지 않는다. 또한, 피리메타민과 설파메톡사졸(sulfamethoxazole) 등의 설파제를 병용 투여시 골수 억제를 일으켜 혈소판 수를 감소시킬 수 있으며, 엽산의 병용 투여로 인해 알러지 반응, 신장 장애, 혈액 장애, 오심(惡心), 구토 등의 부작용을 유발할 수 있다. 더욱이, 현재 가장 널리 사용되는 항톡소포자충제인 피리메타민이나 설파디아진(sulfadiazine)은 톡소포자충의 내약성 증가로 인하여 치료 효과가 점차 감소하고 있어, 톡소포자충 감염증에 대한 효과적인 인간 백신이 개발되어 있지 않은 실정이다.

[0005] 톡소포자충에 대한 DNA, 아단위 또는 단백질 백신이 연구된 바 있으나, 이들은 성공하지 못하였다. DNA 백신을 이용한 면역화는 낮은 면역원성을 보인 한편, 아쥬반트 IL-18을 포함하는 DNA 백신은 체액성 및 세포성 면역 반응을 유도하여 제한적인 보호를 유도할 수 있었다. 따라서, 톡소포자충 감염증에 대해 매우 효과적인 신규한 백신을 발견하는 것은 연구자들에게 여전히 큰 과제로 남아있으므로, 대안적인 방법을 사용하여 톡소포자충 감염증으로부터 개체를 보호할 수 있는 효과적인 백신의 개발이 필수적이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2165100호(2020.10.06 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 톡소포자충 항원 곤봉체 단백질 4(rhoptry protein 4; ROP4)를 발현하는 재조합 발현 벡터가 형질감염된 재조합 바이러스를 포함하는 톡소포자충에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 백신 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 톡소포자충 항원 곤봉체 단백질 4(rhoptry protein 4; ROP4)를 발현하는 재조합 발현 벡터가 형질감염된 재조합 바이러스를 포함하는 톡소포자충에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 백신 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 톡소포자충 항원 곤봉체 단백질 4(rhoptry protein 4; ROP4)를 발현하는 재조합 발현 벡터로 바이러스 세포를 형질 감염시키는 단계; 및 상기 바이러스 세포를 배양하여 ROP4를 발현시키는 단계를 포함하는 톡소포자충에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 백신 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 톡소포자충의 항원 곤봉체 단백질 4(rhoptry protein 4; ROP4)를 포함하는 재조합 베큘로바이러스 백신에 관한 것으로서, 구체적으로, 베큘로바이러스 백신은 유전자 공학기술로 선택적 항체 생성의 장점이 있다. 또한, 비병원성으로 안전하며 포유류 세포 또는 동물 모델에서 세포 독성 및 병리가 관찰되지 않는다. 이런 기반을 바탕으로 인간의 베큘로바이러스에 대한 기존의 면역이 없는 내재적 특성을 결합하면 톡소포자충 외에도 다양한 감염 질환에 적용하여 기술적인 파급 효과를 야기할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 톡소포자충 ROP4 재조합 베큘로바이러스 백신을 마우스에 접종시킨 후 수집한 혈청에서 항체반응을 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 톡소포자충 ROP4 재조합 베큘로바이러스 백신을 마우스에 접종시킨 후 수집한 점막 조직에서 항체반응을

확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 톡소포자충 ROP4 재조합 베큘로바이러스 백신을 마우스에 접종시킨 후 유세포 분석기를 통해 면역세포 활성을 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 톡소포자충 ROP4 재조합 베큘로바이러스 백신을 마우스에 접종시키고 *Toxoplasma gondii* (ME49 strain) 치사량의 50배 이상을 마우스에 감염시킨 후, 뇌에서 염증성 사이토카인을 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 톡소포자충 ROP4 재조합 베큘로바이러스 백신을 마우스에 접종시키고 *Toxoplasma gondii* (ME49 strain) 치사량의 50배 이상 마우스에 감염시킨 후 뇌 조직에서 톡소포자충 cyst의 수를 측정하고, 마우스의 몸무게 및 생존율을 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 톡소포자충 항원 곤봉체 단백질 4(rhoptry protein 4; ROP4)를 발현하는 재조합 발현 벡터가 형질감염된 재조합 바이러스를 포함하는 톡소포자충에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 백신 조성물을 제공한다.

[0013] 바람직하게는, 상기 바이러스는 베큘로바이러스(Baculovirus)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 바람직하게는, 상기 백신 조성물은 경구 또는 비강 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명에서 "톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)"는 콕시디아아강(subclass of coccidia)에 속하는 첨복포자충이다. 톡소포자충은 세포 내 기생충(obligare intercellular parasite)으로서 전 세계적으로 분포하는 인간 및 동물에 대한 톡소포자충증(Toxoplasmosis)을 야기하는 원인 원충이다. 톡소포자충은 크게 난포낭(oocyst, 오시스트), 영양형(tachyzoit, 타키조이트), 감염형(bradyzoit, 브래디조이트), 분열체(schizont, 시존트) 및 생식모체(gametocyte, 거미토사이트) 단계의 5가지 발육 단계를 거친다. 톡소포자충은 종숙주인 고양이 분변의 난포낭(oocyst)에 의해 오염된 물 또는 야채를 섭취함으로써 감염되거나, 중간숙주인 돼지, 양, 소 등의 육류에 낭포로 존재하는 톡소포자충을 섭식할 때 감염될 수 있다. 예컨대, 상기 톡소포자충 원충은 *Toxoplasma gondii* ME49 strain일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 구체적으로 상기 ROP4는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

[0017] 예컨대, 상기 ROP4는 Genebank Accession No. ABU24469.1로 표현되는 아미노산 서열일 수 있다.

[0018] 또한, 상기 ROP4는 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 기능적 동등물을 포함한 것일 수 있다.

[0019] 본 발명에서 용어 "기능적 동등물"은 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 가장 구체적으로는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 것으로, 서열번호 1의 아미노산 서열과 실질적으로 동질의 생리활성을 가지는 단백질을 의미한다.

[0020] 본 발명에서 용어 "실질적으로 동등한 생리활성"은 상기 ROP4와의 구조적, 기능적 상동성으로 인해 톡소포자충에 대한 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 활성을 의미한다.

[0021] 보다 구체적으로 상기 ROP4는 서열번호 2의 핵산 서열에 의해 암호화될 수 있다. 예컨대, 상기 ROP4는 Genebank Accession No. EU047558.1로 표현되는 유전자일 수 있다.

[0022] 본 발명에서 "백신 조성물"은 백신 효과를 가지는 단백질 항원을 투여함으로써 이후의 병원균 감염을 예방할 수 있는 조성물을 의미한다. 상기 백신 조성물은 톡소포자충에 대한 항원성을 나타내는 조성물일 수 있다.

[0023] 구체적으로, 상기 백신 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 보조제, 면역 자극제 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[0024] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 당업계에 공지되어있으며, 단백질, 설탕 등을 포함한다. 상기 담체는 수용액 또는 비-수용액, 현탁액 및 에멀전일 수 있다. 비-수용액 담체는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식용유 예컨대 올리브 오일 및 주사 가능한 유기 에스테르 예컨대 에틸 올리에이트를 포함한다. 수용액 담체는 식용수 및 완충배지를 포함하는 물, 알코올/수용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 담체는 염화나트륨 용액, 링거 덱스트로오스, 덱스트로오스 및 염화나트륨, 유산처리 링거 또는 고정 오일을 포함한다. 정맥주사용 담체는 링거 덱스트로오스를 기본으로 하는 것과 같은 전해질 보충제, 액체 및 영양 보충제 등을 포함한다. 방부제

및 기타 첨가제로서 항미생물제제, 항산화제, 킬레이트제, 불활성 가스 등과 같은 것을 추가로 포함할 수 있다. 방부제로는 포르말린 티메로살, 네오마이신, 폴리믹신 B 및 암포테리신 B를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 상기 백신 조성물은 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 면역반응의 향상 및/또는 접종 후 흡수 속도를 촉진하는 화합물 또는 혼합물을 칭하는 것으로 임의의 흡수-촉진제를 포함한다. 허용가능한 보조제는 프로인트 완전보존제, 프로인트 불완전보존제, 사포닌, 미네랄 젤 예컨대 수산화 알루미늄, 계면활성제 예컨대 리소레시틴, 플루론 폴리올, 다가음이온, 펩타이드, 오일 또는 탄화수소 에멀전, 키홀림펫 헤모시아닌, 디니트로페놀 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 상기 백신 조성물은 면역 자극제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 면역 자극제는 인공적으로 합성된 레바미솔, 이소프레노신 및 사이토카인을 포함할 수 있다. 사이토카인의 일 예로서 인터페론-α, 인터류킨-2, GM-CSF, GCSF 등이 있다. 상기 백신 조성물은 상기 바이러스-유사입자 또는 이의 농축액을 포함하는 형태이거나, 형질전환 숙주 세포 자체 또는 형질전환 세포의 건조 분말 형태로 사용할 수 있다. 또한, 상기 백신 조성물은 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있으며 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0027] 상기 백신 조성물은 안정제, 유화제, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, pH 조정제, 계면활성제, 리포솜, 이스콤(iscom) 보조제, 합성 글리코펩티드, 증량제, 카복시폴리메틸렌, 세균 세포벽, 세균 세포벽의 유도체, 세균백신, 동물 폭스바이러스 단백질, 바이러스 일부(subviral) 입자 보조제, 콜레라 독소, N, N-디옥타데실-N',N'-비스(2-하이드록시에틸)-프로판디아민, 모노포스포릴 지질 A, 디메틸디옥타데실-암모늄 브로마이드 및 이의 혼합물로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 제2보조제를 더 포함할 수 있다.

[0028] 상기 백신 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 제제화할 경우에는 통상적으로 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제가 함께 사용될 수 있다.

[0029] 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트calcium carbonate), 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등이 함께 사용될 수 있다. 또한 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.

[0030] 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다.

[0031] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 사용될 수 있다. 비수용성제제, 현탁제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명에서 용어 “벡터”는 연결되어 있는 핵산 단편을 운반하는데 이용되는 핵산 분자를 의미한다. 상기 벡터는 박테리아, 플라스미드, 파지, 코스미드, 에피솜, 바이러스 및 삽입가능한 DNA 단편(즉, 상동재조합에 의해 숙주 세포 게놈 안으로 삽입 가능한 단편)이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 플라스미드는 벡터의 일종으로서 내부에 추가적으로 DNA 단편을 연결시킬 수 있는 고리형의 이중 가닥 DNA 루프를 의미한다. 또한, 바이러스 벡터는 추가적인 DNA를 바이러스 게놈 안에 연결시킬 수 있다.

[0033] 본 발명에서 용어 “발현 벡터”는 작동 가능하도록 연결된 목적 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 지시할 수 있는 벡터를 의미한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술의 사용에서 발현 벡터는 플라스미드 형태이므로, 용어 플라스미드 및 벡터가 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 바이러스 벡터와 같이 동일한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터들도 포함할 수 있다.

[0034] 구체적으로, 상기 벡터는 베큘로바이러스(Baculovirus) 벡터일 수 있다. 상기 베큘로바이러스(Baculovirus)는 사람이나 척추동물에는 병원성이 없으며, 곤충에 대해서만 병원성을 가지고 있는 병원성 바이러스를 의미한다.

[0035] 상기 발현 벡터는 숙주 세포 내로 도입되고, 상기 도입된 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포는 상기 바이러스-유사입자를 생산할 수 있다. 이 때, 상기 벡터는 숙주 생물체에 의해 인지되는 프로모터를 포함할 수 있다.

[0036] 상기 ROP4를 암호화하는 핵산 서열은 상기 프로모터 서열과 작동 가능하게 연결될(operably linked) 수 있다. 상기 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또

는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 의미한다. 즉, 상기 바이러스-유사입자를 암호화하는 유전자는 벡터 내에 있는 프로모터와 작동 가능하게 연결되어 발현이 조절될 수 있다.

[0037] 또한, 상기 발현 벡터는 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는데 필요한 적절한 마커 유전자를 포함할 수 있다. 상기 마커 유전자는 항생제 저항성 유전자 또는 형광 단백질 유전자일 수 있으며, 상기 항생제 저항성 유전자는 히그로마이신 저항성 유전자, 카나마이신 저항성 유전자, 클로람페니콜 저항성 유전자 및 테트라사이클린 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 형광 단백질 유전자는 효모-강화 녹색 형광 단백질(yeast-enhanced green fluorescent protein, yEGFP) 유전자, 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP) 유전자, 청색 형광 단백질(blue fluorescent protein, BFP) 유전자 및 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP) 유전자로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에서 “형질 감염”은 상기 벡터를 미생물 또는 특정 세포 내로 운반하는 방법을 의미하며, 형질 감염 대상 세포가 원핵세포인 경우에는, CaCl2 방법, 하나한 방법 및 전기 천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 형질 감염 대상 세포가 진핵세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법 및 유전자 밤바드먼트 등을 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 효모와 같은 진균의 형질 감염의 경우에는, 일반적으로 리튬 아세테이트 및 열 충격을 이용한 형질 감염법과 전기천공법에 의해 실시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 또한, 본 발명은 톡소포자충 항원 곤봉체 단백질 4(rhoptry protein 4; ROP4)를 발현하는 재조합 발현 벡터로 바이러스 세포를 형질 감염시키는 단계; 및 상기 바이러스 세포를 배양하여 ROP4를 발현시키는 단계를 포함하는 톡소포자충에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 백신 제조 방법을 제공한다.

[0040] 바람직하게는, 상기 ROP4는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

[0041] 바람직하게는, 상기 바이러스는 베큘로바이러스(Baculovirus)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[0043] **<실시예 1> 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*) 곤봉체 단백질 4(rhoptry protein 4; ROP4)를 발현하는 베큘로바이러스 백신 제조**

[0044] 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*) tachyzoite를 마우스에 IP 경로로 감염시킨 후 4-5일째 복강에서 대량의 tachyzoite를 수집하였다. Invitrogen사 RNA 추출키트로 톡소포자충 RNA를 추출하고 톡소포자충 항원 곤봉체 단백질(rhoptry protein 4; ROP4)을 RT-PCR 방법으로 증폭시켰다. 증폭된 ROP4를 pFastBac 벡터에 산입하였다. DH10Bac competent cell을 이용하여 형질전환하였고 bacmid DNA를 colony PCR 방법으로 bacmid DNA에 유전자 ROP4가 포함된 것을 확인하였다. ROP4를 발현하는 베큘로바이러스 제작을 위하여 colony PCR법으로 확인된 컨스트럭트(construct)를 Cellfectin Ⅱ(Invitrogen) 및 Sf-900™ II SFM 배지를 이용하여 27℃에서 곤충세포 Sf9에 형질감염(Transfection)시켜 재조합 베큘로바이러스를 제작하고 scale up 함. 증폭된 베큘로바이러스 역가를 측정하고 동물실험에 사용하였다.

[0045] **<실시예 2> 동물모델에서 백신효능 검증**

[0046] 톡소포자충 ROP4 재조합 베큘로바이러스 백신을 마우스에 접종시킨 후 수집한 혈청에서 항체반응 확인하였다.

[0047] 실험방법: 혈액 샘플 준비는 마우스에 rBV-ROP4 백신을 접종 후 1주, 3주차에 안와채혈로 200μl 혈액을 수집하였으며, 3000rpm, 4℃, 20분간 원심분리기를 이용해 혈청을 수집하였다. 96well 플레이트에 ME49 항원을 (4 μg/ml)로 코팅하여 4℃ 16시간 반응하였다. 수집된 혈청은 1:50으로 희석하여 사용했으며, 톡소포자충 특이적 IgG (도 1A)와 IgA (도 1B) 항체반응을 ELISA 리더기를 이용해 490nm에서 측정하였다.

[0048] 실험결과: rBV-ROP4 백신 접종 그룹은 톡소포자충으로부터 비 면역화 마우스 그룹과 비교하여 높은 수준으로 증가하는 것을 확인하였다. 경구 경로와 비강 경로 모두 2차 접종 시 혈청에서 높은 IgA 항체반응이 급격히 증가되었다.

[0049] 톡소포자충 ROP4 재조합 베큘로바이러스 백신을 마우스에 접종시킨 후 수집한 점막 조직에서 항체반응 확인하였다.

[0050] 실험방법: 각 점막 샘플 획득은 면역화 4주 후 톡소포자충을 치사량의 약 50배로 감염시킨 후 16 dpi에 희생되었다. 내장(Intestine)은 마우스 위에서 약 1-2cm 아래에서부터 5cm 기준으로 잘라 1× PBS 500 μl가 담긴 튜브에 수집하였다. 분변(Fecal)은 0.1g당 1× PBS를 100 μl로 계산하여 튜브에 수집하였다. 질(Vagainal) 샘플은 1× PBS 200 μl로 질관을 반복적으로 세척한 이후 튜브에 수집하였다. 수집된 점막 샘플은 37℃ 인큐베이션을 1시간 반응시킨 후 5000rpm 10분간 원심분리기를 통해 상등액을 얻었다. 수집된 점막 샘플은 ELISA를 이용해 측정하였다. 96well 플레이트에 ME49 항원을 (4 μg/ml)로 코팅하여 4℃, 16시간 반응하였다.

[0051] 각 점막 샘플 내장(intestine)은 1:100, 분변(fecal) 1:2, 질(vagainal) 1:20로 1× PBS로 희석하였으며 1차 항체로 37℃ 한 시간 반응시켰다. 2차 항체로 HRP conjugated goat anti-mouse IgG와 IgA(1:2000 희석)를 한 시간, 37℃에서 반응 후 ELISA 리더기를 이용해 490nm로 측정하였다.

[0052] 실험결과: 획득된 점막 샘플은 면역 유도를 평가하기 위해 마우스의 점막 조직에서 항체 생산을 평가했하였다. 16 dpi에서 면역화되지 않은 Naive+Cha 그룹보다 백신 접종된 그룹에서 *T. gondii* 특이적 IgG 및 IgA 반응이 관찰되었다. 도 2A 및 도 2D: 내장(Intestine) 조직에서 rBV-ROP4로 마우스를 면역화하면 IgG에 대해 경구 경로 면역과 Naive + Cha 그룹과 비교 시, 더 많은 양의 *T. gondii* 특이적 IgG가 유도되었으며, 점막 항체반응인 IgA 항체가 높게 수준으로 유도되었다. 도 2B 및 도 2E: 분변(fecal) 조직에서 백신 접종 그룹에서 Naive + Cha에 비해 *T. gondii* IgG 및 IgA가 증가가 관찰되었다. 도 2C 및 도 2F: rBV-ROP4로 마우스를 면역화하면 질(vaginal) 조직에서 IgG 및 IgA 항체 반응이 증가하였다.

[0053] 톡소포자충 ROP4 재조합 베큘로바이러스 백신을 마우스에 접종시킨 후 유세포 분석기를 통해 면역세포 활성을 확인하였다.

[0054] 실험방법: 비장 세포 및 장간막 림프절 세포는 유세포 분석을 위해 비장 세포 (1×10^6 세포/마우스) 및 림프절 세포(1×10^5 세포/마우스)의 단일 세포 현탁액을 2시간 동안 5% CO_2에서 37℃에서 *T. gondii* ME49 항원 (4 μg/ml)로 자극시켰다. 자극 이후 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포뿐만 아니라 마우스의 비장 및 장간막 림프절(Mesenteric lymp node)의 Germinal center B 세포의 증식을 평가하기 위해 유세포 분석을 수행하였다. 각 항체는 BD Biosciences(Franklin Lakes NJ USA) 및 Invitrogen(Waltham MA USA)에서 구입한 다음 형광 접합 항체로 염색하였다. 염색된 세포는 Accuri C6 유세포 분석기를 사용하여 획득하고 C6 Accuri 소프트웨어(BD Biosciences Franklin Lakes NJ USA)로 분석하였다.

[0055] 실험결과: MLN에서 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 집단 유도는 Naive + Cha와 rBV-ROP4 백신을 경구 경로로 접종한 그룹 간에 유사했다. 그러나 rBV-ROP4를 비강내 투여 시 T 세포 증식이 활성화되었다(도 3A 및 도 3B). 비장 세포에서 관찰된 Germinal center B 세포 반응은 MLN 세포의 반응은 백신 접종 그룹 모두 높게 측정되었다. 면역화되지 않은 마우스에서 *T. gondii* 감염은 Germinal center B 세포 반응을 유도했으나 이것은 백신으로 면역화시 극적으로 증가하였다. 두 가지 면역 경로는 비장과 MLN 모두에서 Germinal center B 세포 높은 유도 반응을 기여하였다(도 3C 및 도 3D).

[0056] **<실시예 3> 톡소포자충 재조합 베큘로바이러스 백신 방어효능**

[0057] 톡소포자충 ROP4 재조합 베큘로바이러스 백신을 마우스에 접종시키고 T*oxoplasma gondii* (ME49 strain) 치사량의 50배 이상을 마우스에 감염시킨 후, 뇌에서 염증성 사이토카인을 확인하였다.

[0058] 실험방법: 16 dpi에서 마우스의 뇌 조직을 500 μl의 1× PBS에 넣어 개별적으로 균질화 이후 원심분리기를 통해 상득액을 수집하였다. 전 염증성 사이토카인 IFN-gamma 및 IL-6는 BD OptEIA ELISA 키트(BD Biosciences Franklin Lakes NJ USA)를 사용하여 *T. gondii*에 감염된 마우스의 뇌 상등액을 이용해 570nm로 ELISA 측정기를 이용하여 생성된 표준곡선을 사용하여 사이토카인 농도를 계산하였다.

[0059] 실험결과: 전 염증성 사이토카인 IFN-gamma 및 IL-6 생산량을 결정하기 위해 치사량의 톡소포자충을 감염시킨 후 16 dpi에 뇌의 상등액을 수집하여 염증반응을 확인하였다(도 4A 및 도 4B). 비 면역화 감염 대조군(Naive+Cha)과 비교하였을 때, rBV-ROP4로 면역화된 그룹(Immunization)은 뇌 상등액에서 현저히 낮은 수준의 IFN-gamma가 검출되었다. 전 염증성 사이토카인 IL-6는 비 면역화 감염 대조군 (Naive+Cha)와 비교 시 백신 접종그룹은 낮은 수준이 검출되는 것을 확인하였다(도 4B).

[0060] 톡소포자충 ROP4 재조합 베큘로바이러스 백신을 마우스에 접종시키고 *Toxoplasma gondii* (ME49 strain) 치사량의 50배 이상 마우스에 감염시킨 후, 뇌 조직에서 톡소포자충 cyst의 수를 측정하고, 마우스의 몸무게 및 생존

율을 확인하였다.

[0061] 실험방법: 16 dpi에서 마우스 뇌 조직을 1× PBS로 균질화 이후 44% percoll과 혼탁하여 67% percoll 위에 쌓아 밀도구배 원심분리법을 이용해 12100rpm, 4℃, 20분을 사용 후 3개의 층에서 가운데 층만 획득하여 RBC 용액을 이용해 적혈구를 제거하였다. 이후 1× PBS를 넣어 원심분리기를 통해 6000rpm, 20분간 사용해 다른 용액은 제거하고 톡소포자충만 획득하였다. 수집된 cyst는 현미경(Leica DMi8, Leica,Wetzlar, Germany)을 통해 슬라이드글라스에서 5개의 다른 영역에서 수를 측정 후 평균을 계산하여 측정하였다. 몸무게와 생존율은 톡소포자충 감염 이후 5일 간격으로 측정하였으며, 비 면역화 감염 대조군의 몸무게가 75% 이하로 체중이 손실되었을 때 동물실험을 진행하였다.

[0062] 실험결과: 비 면역화 마우스와 rBV-ROP4 백신 면역화 마우스에 치사량은 선행연구보다 50배 이상으로 매우 높은 양의 톡소포자충을 감염시킨 후 뇌를 수집하여 cyst 수를 확인하였다(도 5A). rBV-ROP4 백신을 접종한 그룹은 비 면역화 감염 대조군(Naive + Cha)은 약 6000개 이상의 cyst 수가 검출되었다. 그러나 백신 접종 그룹은 cyst 수는 약 2000개 이하로 3배 이상 낮은 cyst 수를 확인하였다. 그러므로 몸무게 측정 시 16일 차에 감염 대조군은 75%로 체중 손실이 높았다. 반면에 백신 접종 그룹의 체중감소율은 80% 이상으로 보호되었다. 생존율 결과에서 백신 접종 그룹은 100%에 생존율을 나타냈다. 그러나 비 면역화 감염 대조군의 생존율은 0%이었다.

[0063] 이러한 결과는 rBV-ROP4 백신은 치사량의 50배가 넘는 톡소포자충으로 감염시킴에도 불구하고 rBV-ROP4가 매우 우수한 수준으로 톡소포자충에 대한 높은 백신 보호 효과를 나타낸다는 것을 뒷받침한다.

[0064] 한편, 1) VLP-ROP4과 관련된 선행연구는 450개의 cyst를 감염시켜 비 면역화 감염 대조군의 경우 약 600개의 cyst가 검출되었으며 VLP-ROP4 백신을 비강으로 감염 시 300개의 cyst 수가 검출되어 약 2배 낮은 cyst 수를 확인하였다. 그러나 본 발명은 치사량의 약 50배로 매우 높은 양의 톡소포자충을 감염시켰음에도 불구하고 비 면역화 감염 대조군과 비교 시 백신 접종그룹은 3배 이상 낮은 수의 cyst 수를 확인하였다.

[0065] 2) 바이러스 유사입자 (VLP) 백신은 경구 경로로 접종 시 위산에 의해 단백질 변성이 일어나 백신으로서 효능이 떨어지나, 본 발명ㅇ에서 사용된 재조합 베큘로바이러스(rBV)는 경구 경로로 접종했음에도 불구하고 백신으로서 높은 수준의 보호 효능을 보였다.

[0066] 3) 경구 경로와 비강 경로의 백신 접종은 바늘을 사용하지 않아 접종 편의성도 높으며 의료진의 안전과 환자의 피부에 상처를 내지 않기에 본 발명에서 사용된 rBV-ROP4를 백신으로 이용 시 톡소포자충에 대한 예방효과를 크게 높을 것으로 전망된다.

[0067] 결론적으로, (1) 톡소포자충 베큘로러바이러스 백신 효능 평가 연구는 국내외에서 본 발명자들이 처음으로 진행하였다. 그동안 진행해왔던 VLPs 백신연구와 비교 시 베큘로바이러스 백신은 많은 장점(경제적이고, 제조과정 빠르고, 제조 및 정제 과정 간단함)을 갖추고 있다.

[0068] (2) 본 발명에서 사용된 경구 및 비강 백신 모두 점막 면역 및 전신 면역(systemic immunity)을 일으켜 톡소포자충의 소화기 점막 경로 감염을 차단하는 동시에 충의 이동 및 충이 정착시 전신 면역(systemic immunity)으로 인한 항체가 충에 작용하여 충의 증식을 억제한다.

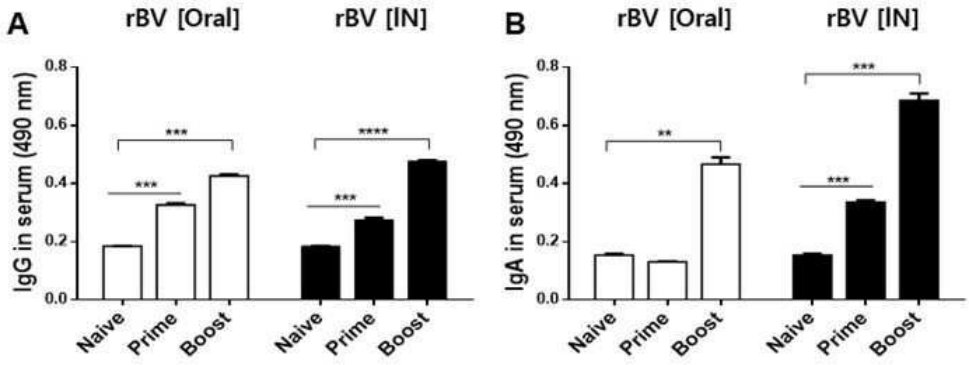
[0069] (3) 경구백신은 전통적인 기존 근육주사 접종이 아닌 간호사가 필요 없고 주사바늘 사용 없기에 통증이 없고 병원 또는 보건소에 갈 필요 없이 약국에서 사다가 섭취할 수 있는 아주 편리하고 안전한 경로로서 아주 이상적인 바람직한 최고의 접종 경로이다.

[0070] 통상적으로 백신이 경구로 섭취 시 위에서 위산(pH2-3)의 작용에 의해 백신 단백질 항원성이 파괴되어 백신효능을 볼 수 없다. 그럼에도 불구하고 본 발명에서 톡소포자충 항원을 발현하는 베큘로바이러스의 경구 경로 접종으로 높은 백신 효능을 확인하였다.

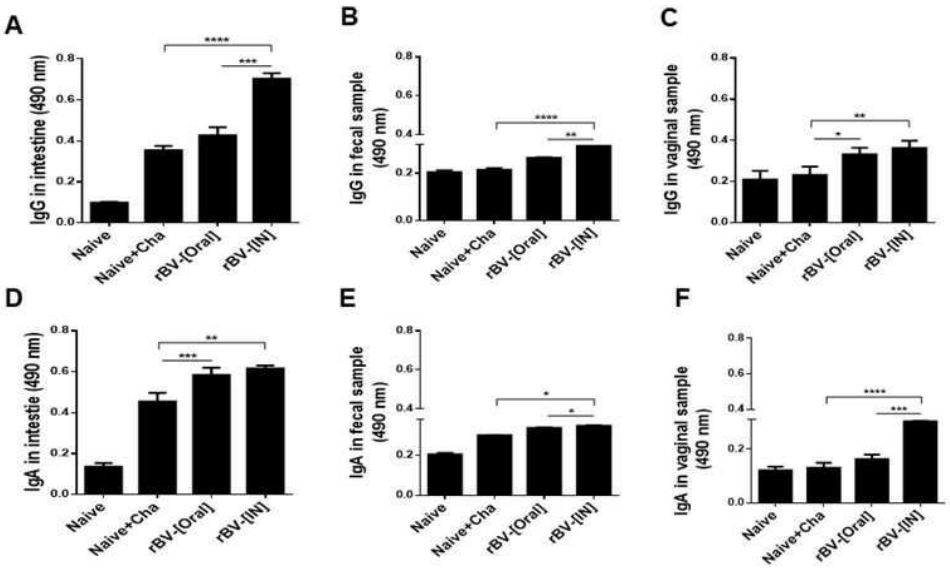
[0071] (4) 경구백신 또한 비강백신 보다 안전하고 편리하다. 비강경로는 비강으로 백신 물질이 들어가기에 어느 정도 불쾌함이 생길 수 있고, 의료인이 도움 없이 섭취과정에 백신 손실(loss)이 생길 가능성이 있어 백신 효능에 영향을 줄 수 있다.

도면

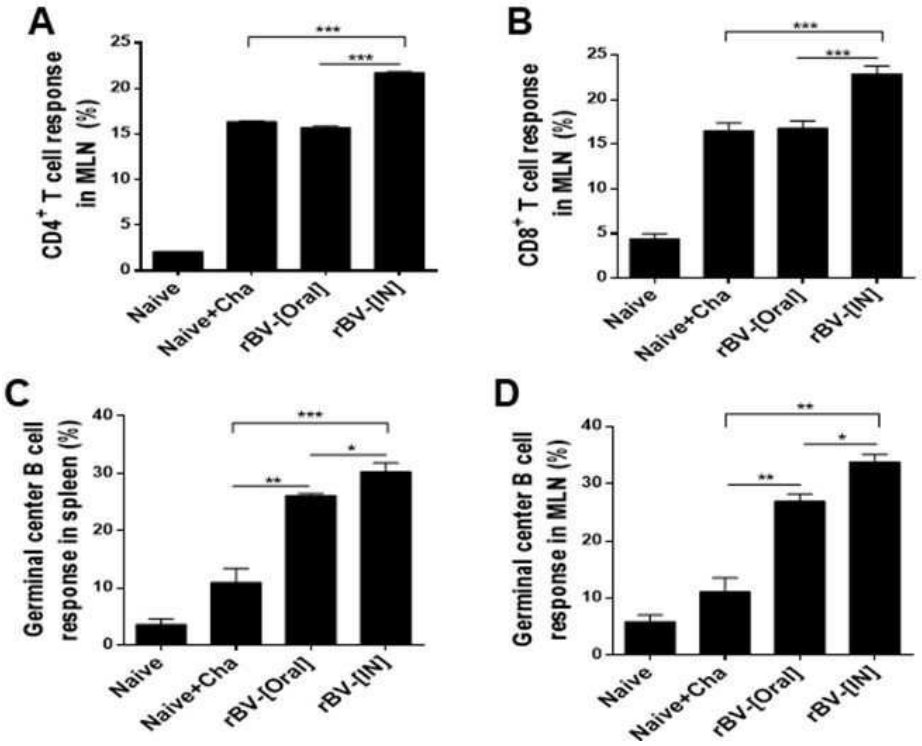
도면1


A
rBV [Oral]
rBV [IN]
IgG in serum (490 nm)
Naive
Prime
Boost
B
rBV [Oral]
rBV [IN]
IgA in serum (490 nm)
Naive
Prime
Boost

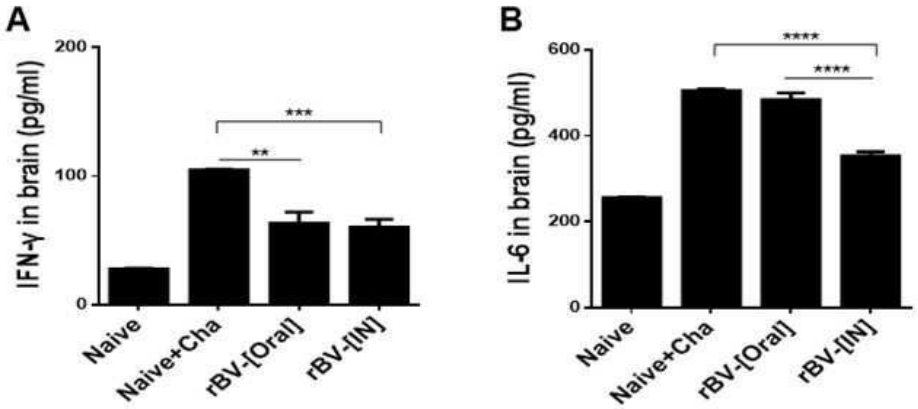
도면2


A
IgG in intestine (490 nm)
B
IgG in fecal sample (490 nm)
C
IgG in vaginal sample (490 nm)
D
IgA in intestie (490 nm)
E
IgA in fecal sample (490 nm)
F
IgA in vaginal sample (490 nm)
Naive
Naive+Cha
rBV-[Oral]
rBV-[IN]

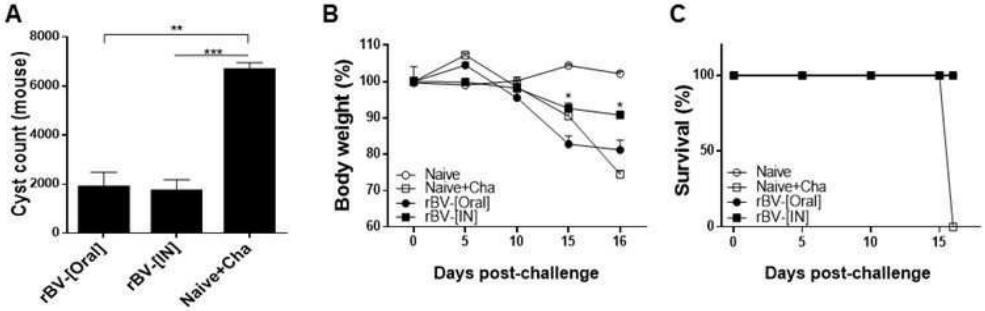
도면3


A
CD4+ T cell response in MLN (%)
B
CD8+ T cell response in MLN (%)
C
Germinal center B cell response in spleen (%)
D
Germinal center B cell response in MLN (%)
Naive
Naive+Cha
rBV-[Oral]
rBV-[IN]

도면4


A
IFN-γ in brain (pg/ml)
B
IL-6 in brain (pg/ml)
Naive
Naive+Cha
rBV-[Oral]
rBV-[IN]

도면5


A
Cyst count (mouse)
rBV-[Oral]
rBV-[IN]
Naive+Cha
B
Body weight (%)
Days post-challenge
Naive
Naive+Cha
rBV-[Oral]
rBV-[IN]
C
Survival (%)
Days post-challenge

서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Recombinant Baculovirus vaccines comprising antigen ROP4 of Toxoplasma gondii

<130> ADP-2021-0871

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 578

<212> PRT

<213> Toxoplasma gondii

<400> 1

Met Gly His Pro Thr Ser Phe Gly Gln Pro Ser Cys Leu Val Trp Leu
1 5 10 15

Ala Ala Ala Phe Leu Val Leu Gly Leu Cys Leu Val Gln Gln Gly Ala
20 25 30

Gly Arg Gln Arg Pro His Gln Trp Lys Ser Ser Glu Ala Ala Leu Ser
35 40 45

Val Ser Pro Ala Gly Asp Ile Val Asp Lys Tyr Ser Arg Asp Ser Thr
50 55 60

Glu Gly Glu Asn Thr Val Ser Glu Gly Glu Ala Glu Gly Ser Arg Gly
65 70 75 80

Gly Ser Trp Leu Glu Gln Glu Gly Val Glu Leu Arg Ser Pro Ser Gln
85 90 95

Asp Ser Gln Thr Gly Thr Ser Thr Ala Ser Pro Thr Gly Phe Arg Arg
100 105 110

Leu Leu Arg Arg Leu Arg Phe Trp Arg Arg Gly Ser Thr Arg Gly Ser
115 120 125

Asp Asp Ala Ala Glu Val Ser Arg Arg Thr Arg Val Pro Leu His Thr
130 135 140

Arg Leu Leu Gln His Leu Arg Arg Val Ala Arg Ile Ile Arg His Gly
145 150 155 160

Val Ser Ala Ala Ala Gly Arg Leu Phe Gly Arg Val Arg Gln Val Glu

165 170 175

Ala Glu Arg Pro Gln Pro Val Phe Thr Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu

180 185 190

Glu Thr Asn Ser Leu Tyr Tyr Arg Asp Lys Val Pro Gly Gln Gly Ile

195 200 205

Ile Gln Glu Ile Leu Arg Gln Lys Pro Gly Ile Ala His His Pro Glu

210 215 220

Ser Phe Ser Val Val Ala Ala Asp Glu Arg Val Ser Arg Thr Leu Trp

225 230 235 240

Ala Glu Gly Gly Val Val Arg Val Ala Ser Glu Leu Gly Gln Pro Gly

245 250 255

Arg Val Leu Val Arg Gly Arg Arg Ile Gly Leu Phe Arg Pro Gly Met

260 265 270

Gln Phe Glu Ala Thr Asp Gln Ala Thr Gly Glu Pro Met Thr Ala Leu

275 280 285

Val Gly His Thr Val Leu Glu Ala Thr Ala Arg Asp Val Asp Ser Met

290 295 300

Arg Asn Glu Gly Leu Ala Val Gly Leu Phe Gln Lys Val Lys Asn Pro

305 310 315 320

Tyr Leu Ala Asn Arg Tyr Leu Arg Phe Leu Ala Pro Phe Asp Leu Val

325 330 335

Thr Ile Pro Gly Lys Pro Leu Val Gln Lys Ala Lys Ser Arg Asn Glu

340 345 350

Val Gly Trp Val Lys Asn Leu Leu Phe Leu Leu Pro Pro Thr His Val

355 360 365

Asp Met Glu Thr Phe Val Asp Glu Ile Gly Arg Phe Pro Gln Glu Asp

370 375 380

Arg Pro Leu Ala Asp Ala Ala Arg Leu Tyr Leu Thr Val Gln Ala Val

385 390 395 400

Arg Leu Val Ala His Leu Gln Asp Glu Gly Val Val His Gly Lys Ile

405 410 415

Met Pro Asp Ser Phe Cys Leu Lys Arg Glu Gly Gly Leu Tyr Leu Arg

420 425 430

Asp Phe Gly Ser Leu Val Arg Ala Gly Ala Lys Val Val Val Pro Ala

435 440 445

Glu Tyr Asp Glu Tyr Thr Pro Pro Glu Gly Arg Ala Ala Ala Arg Ser

450 455 460

Arg Phe Gly Ser Gly Ala Thr Thr Met Thr Tyr Ala Phe Asp Ala Trp

465 470 475 480

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

485 490 495

Thr Lys Ser Gly Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Phe Phe Phe Ser Arg Cys

500 505 510

Arg Arg Val Pro Glu Asn Val Lys Leu Leu Val Tyr Lys Leu Ile Asn

515 520 525

Pro Ser Val Glu Ala Arg Leu Leu Ala Leu Gln Ala Ile Glu Thr Pro

530 535 540

Glu Tyr Arg Glu Met Glu Glu Gln Leu Ser Ala Ala Ser Arg Leu Tyr

545 550 555 560

Ser Gly Asp Gly Thr Leu Thr Gly Gly Asp Asp Asp Met Pro Pro Leu

565 570 575

Glu Thr

<210> 2

<211> 2039

<212> DNA

<213> Toxoplasma gondii

<400> 2

tccggcatgg aaaaaatgcg tctagctaac cgcgggcccc aatgtcgcac ggccttggtc 60

aagggacggc gcgacctgca gagacgggaa tccgagccaa gcgctgagtg tccttgcttc 120

tggctgagcc gccatcctgc ggcaccgtcc atgactgcgc acagcatccc gggagtatgg 180

tgattgtgtc agtcttattt cttttgaagg cacttcagat gtgtacttca gaatgttgtt 240

acgataattg cggatgcagc tgccacctct gaacggttga tttggttgtg agtcctccca 300

acatggggca ccctacctct ttcggacagc cgtcgtgtct tgtctggcta gctgcggcat 360

tccttgttct ggggctttgc ctcgtccagc aaggcgctgg cagacagcgg cctcaccagt 420

ggaagagctc ggaagccgct ttgagtgtca gtccggcagg agacatcgtg gacaagtatt 480

ctcgtgattc cactgaggga gaaaacactg tctcagaggg ggaagctgag ggcagtcggg 540

ggggttcatg gctggagcag gagggggttg aattaaggtc gccttcacag gacagccaga 600

caggaacctc gaccgcgtcc cccacaggct tcagaaggtt actcaggcgt ttgcgttttt 660

ggcgtcgtgg gagtacacgc ggatccgatg atgcagcaga agtttccagg aggactcggg 720

ttcctctgca tacccgtctg cttcagcatt tgcggcgagt agcgagaatc atccgacacg 780

gggtttcagc ggccgctggc agattgttcg ggcgagttcg gcaagttgag gcggaacgtc 840

cacaacccgt tttcactgaa ggtgatcctc cggatctcga gacgaattcc ttgtattatc 900

gcgacaaggt tccaggacag gggataatcc aggagatcct caggcagaag ccgggaatcg 960

cacaccaccc cgagtcattt agtgtggttg ctgctgacga gagagtatca cggactctgt 1020

gggctgaggg cggggttgtg agagttgctt cagaattggg ccaacctggg agagtgctcg 1080

tgaggggggag acgaatcggt ttgtttcgcc caggaatgca gtttgaagca acagaccagg 1140

cgacaggaga accgatgact gcgcttgttg gccatactgt gcttgaggcc acggcaagag 1200

acgtagattc gatgcgcaac gaaggattag ctgttgggtt gtttcaaaag gtgaagaacc 1260

catatctagc taacaggtat ctaagatttc tggccccgtt cgatttggtg acgatcccgg 1320

ggaagccatt agttcagaaa gctaagtcac gtaatgaggt tggctgggtc aaaaatctgt 1380

tgtttctgct tcctccaact catgtcgata tggaaacgtt tgtcgacgag attggtcgat 1440

ttccacaaga ggaccgcccc ctagctgatg ccgctcgatt gtatcttact gttcaggcgg 1500

tgaggttggt agcgcacctc caagacgaag gagtggtgca cgggaagata atgcctgatt 1560

cgttttgttt gaagcgtgag gggggcctgt acttgcgtga ctttggctct ctggtgagag 1620

cgggcgcaaa agtggtggtg cccgcggaat atgatgagta tacgccgcca gaaggtcgtg 1680

cggccgcccg aagtcgtttc ggctctgggg cgaccacgat gacgtacgca ttcgacgcct 1740

ggacactggg ttcggttata tttttaattt ggtgctctcg agctcccgat acaaaatcgg 1800

ggtacgaata cagtgtcgaa ttctttttt cgaggtgccg gcgggtgcca gagaacgtga 1860

aacttctggt ttacaagttg attaaccctt ctgtcgaggc ccgcctgctc gccttgcaag 1920

cgatagagac tccggaatac agggagatgg aagaacagct gtccgctgct tcgcgcctgt 1980

actcaggtga tgggacgttg acaggggggag acgatgacat gccaccactg gaaacgtga 2039