(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월13일
(11) 등록번호 10-2768669
(24) 등록일자 2025년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) *A61K 35/76* (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 35/76 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7033014
(22) 출원일자(국제) 2019년04월15일
심사청구일자 2022년04월14일
(85) 번역문제출일자 2020년11월16일
(65) 공개번호 10-2021-0005637
(43) 공개일자 2021년01월14일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2019/082608
(87) 국제공개번호 WO 2019/201192
국제공개일자 2019년10월24일
(30) 우선권주장
201810338046.2 2018년04월16일 중국(CN)
(56) 선행기술조사문헌
US20180085411 A1*
CN103981152 A
CN101065144 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
시아먼 유니버시티
중국 361005 시아먼 후지안 시밍 디스트릭트 시밍 난 로드 넘버 422
양셍탕 컴퍼니 리미티드
중국, 저지앙 항저우시 시후 디스트릭트, 슈앙푸 타운, 런두 로드 17, 205호
(72) 발명자
쳉, 통
중국 푸젠 361005 샤먼 쓰밍 디스트릭트 쓰 밍 난 로드 넘버 422
왕, 웨이
중국 푸젠 361005 샤먼 쓰밍 디스트릭트 쓰 밍 난 로드 넘버 422
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
공병옥

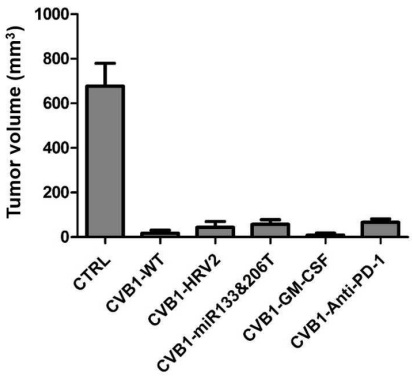
전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **종양 치료용 콕삭키바이러스 B**

(57) 요 약

콕삭키바이러스(Coxsackie virus) CVB1 또는 이의 변이형, 또는 CVB1 또는 이의 변이형을 포함하는 지놈 서열 또는 cDNA 서열, 또는 상기 지놈 서열 또는 cDNA 서열의 상보 서열(complement sequence)의 핵산 분자, 인간을 포함하는 대상(subject)에서 종양을 치료하기 위한 이의 용도, 및 인간을 포함하는 대상(subject)에서 종양을 치료하기 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한 이의 용도를 제공한다. 또한 CVB1 또는 이의 변이형, 또는 CVB1 또는 이의 변이형을 포함하는 지놈 서열 또는 cDNA 서열, 또는 상기 지놈 서열 또는 cDNA 서열의 상보 서열의 핵산 분자를 이를 필요로 하는 대상(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양을 치료하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 2770/32321 (2013.01)
C12N 2770/32332 (2013.01)
(72) 발명자
예, 시앙종
중국 푸젠 361005 샤먼 쓰밍 디스트릭트 쓰 밍 난 로드 넘버 422
푸, 웬쿤
중국 푸젠 361005 샤먼 쓰밍 디스트릭트 쓰 밍 난 로드 넘버 422
판, 더취안
중국 푸젠 361005 샤먼 쓰밍 디스트릭트 쓰 밍 난 로드 넘버 422
장, 준
중국 푸젠 361005 샤먼 쓰밍 디스트릭트 쓰 밍 난 로드 넘버 422
시아, 닝샤오
중국 푸젠 361005 샤먼 쓰밍 디스트릭트 쓰 밍 난 로드 넘버 422

명 세 서

청구범위

청구항 1

야생형 콕삭키바이러스 B1(Coxsackievirus B1, CVB1) 또는 변이된 CVB1 또는 핵산 분자를 포함하는, 대상에서 종양 치료용 약제학적 조성물:

상기 핵산 분자는 다음에서 선택되는 서열을 포함한다;

(1) 상기 야생형 CVB1 또는 변이된 CVB1의 지놈 서열 또는 cDNA 서열; 및

(2) 상기 지놈 서열 또는 cDNA 서열의 상보적(complementary) 서열;

상기 야생형 CVB1은 서열번호 12에 나타낸 지놈 서열, 서열번호 1에 나타낸 cDNA 서열, 또는 이들의 조합을 가지고;

상기 변이된 CVB1의 지놈은 야생형 CVB1의 지놈과 비교하여 다음으로부터 선택되는 하나 이상의 변형(modification)을 가짐:

1) 5' 비번역 부위(5' UTR)에 있는 IRES(internal ribosome entry site) 서열의 외인성 IRES 서열로의 치환(substitution); 및

2) 사이토카인을 인코딩하는 핵산 서열, 항종양 단백질 또는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열, 마이크로RNA의 표적 서열, 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 외인성 핵산의 삽입.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 외인성 IRES 서열은 인간 라이노바이러스 2(HRV2)의 IRES(internal ribosome entry site) 서열인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 다음의 특성 중 하나 또는 그 이상을 특징으로 하는, 약제학적 조성물:

(1) 상기 사이토카인은 GM-CSF이고;

(2) 상기 항종양 단백질 또는 폴리펩타이드는 PD-1 또는 PD-L1에 대한 scFv이며;

(3) 상기 마이크로RNA는 miR-133 및/또는 miR-206으로부터 선택된다.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 변이된 CVB1은 다음의 특성 중 하나를 갖는 것인, 약제학적 조성물:

(1) 상기 변이된 CVB1은 서열번호 13 내지 16 중 어느 하나로 나타낸 지놈 서열을 포함하고; 및

2) 상기 변이된 CVB1은 서열번호 8 내지 11 중 어느 하나로 나타낸 cDNA 서열을 포함한다.

청구항 5

제1항에 있어서, 다음의 특성 중 하나를 특징으로 하는, 약제학적 조성물:

(1) 상기 핵산 분자는 상기 야생형 CVB1 또는 변이된 CVB1의 지놈 서열로 이루어지거나; 또는

(2) 상기 핵산 분자는 상기 야생형 CVB1 또는 변이된 CVB1의 cDNA 서열, 또는 cDNA 서열의 상보적 서열을 포함하는 벡터이다.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열번호 12 내지 16 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖거나, 또는 서열번호 1, 8 내지 11 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 상보적 서열을 포함하는 벡터인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 CVB1 또는 변이된 CVB1, 또는 분리된 핵산 분자는 항-종양 활성을 갖는 추가적인 약제학적 활성제와 함께 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 추가적인 약제학적 활성제는 추가적인 항암 바이러스(oncolytic virus), 화학요법제(chemotherapeutic agent) 또는 면역요법제(immunotherapeutic agent)로부터 선택되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 추가적인 약제학적 활성제는 다음의 하나 또는 그 이상을 특징으로 하는 것인, 약제학적 조성물:

(1) 상기 추가적인 항암 바이러스는 헤르페스바이러스(herpes virus), 아데노바이러스(adenovirus), 파르보바이러스(parvovirus), 레오바이러스(reovirus), 뉴캐슬병바이러스(Newcastle disease virus), 수포성구내염바이러스(vesicular stomatitis virus), 홍역바이러스(measles virus) 또는 이의 임의의 조합으로부터 선택되며;

(2) 상기 화학요법제는 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 미토마이신(mitomycin), 메토트렉세이트(methotrexate), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 다카바진(dacarbazine), 미톡산트론(mitoxantrone), 안트라사이클린(anthracycline), 에토포시드(etoposide), 백금 화합물(platinum compound), 탁산(taxane), 또는 이의 임의의 조합으로부터 선택되고;

(3) 상기 면역요법제는 면역 관문 억제제(immune checkpoint inhibitor), 종양-특이적 표적 항체, 또는 이의 임의의 조합으로부터 선택된다.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 다음의 특성 중 적어도 하나를 갖는 것인, 약제학적 조성물:

(1) 상기 종양은 대장암(colorectal cancer), 위암(gastric cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 흑색종(melanoma), 유방암(breast cancer), 신장암(kidney cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 림프종(lymphoma), 골육종(osteogenic sarcoma), 전립선암(prostate cancer), 신경교종(glioma), 신경아세포종(neuroblastoma), 설암(tongue cancer), 비인두암(nasopharyngeal cancer), 비중격의 편평세포암종(squamous cell carcinoma of nasal septum), 인두 편평세포암종(pharyngeal squamous cell carcinoma), 악하선의 편평세포암종(squamous cell carcinoma of submandibular gland), 후두암(laryngeal cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 갑상선 관암종(thyroid ductal carcinoma) 및 방광암(bladder cancer)으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

(2) 상기 대상(subject)은 인간이다.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 바이러스 분야 및 종양 치료에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 대상(subject)(예를 들어, 인간)에서 종양을 치료하기 위한, 및 대상(예를 들어, 인간)에서 종양을 치료하기 위해 약제를 제조하기 위한, CVB1 또는 이의 변이형, 또는 CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적 서열을 포함하는 핵산 분자의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 CVB1 또는 이의 변이형, 또는 CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적 서열을 포함하는 핵산을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 종양 치료 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 악성 종양의 치료를 위한 현재의 방법은 주로 수술, 화학요법 및 방사선요법을 포함한다. 이러한 전통적인 요법은 전이된 종양의 치료에 만족스럽지 않으며, 또한 환자의 건강에 큰 해를 끼칠 수 있다. 대조적으로, 새로운 유형의 치료법으로서, 항암 바이러스(oncolytic virus)를 이용한 종양 치료 방법은 높은 특이성, 우수한 효과, 및 적은 부작용의 특징을 가지므로, 현재 종양 치료를 위한 유망한 방법으로 간주되고 있다.

[0003] 항암 바이러스는 종양 세포에서 자가-복제(self-replicate)하여, 종양 세포를 사멸(killing)시키거나, 용해(lysing)시키거나, 또는 종양 세포의 성장을 저지(arresting)할 수 있는 바이러스이다. In vivo 치료에서 사용되는 경우, 항암 바이러스는 종양 세포에 대한 특이적인 선택성을 나타내고 종양 세포의 사멸을 직접적으로 유도할 수 있지만, 정상 세포에는 거의 또는 전혀 영향을 미치지 않는다. 한편, 항암 바이러스는 또한 면역계에서 B 림프구 및 T 림프구의 반응을 유도함으로써 종양 세포를 간접적으로 사멸시킬 수 있다.

[0004] 현재까지 보고된 항암 활성이 있는 엔테로바이러스(enterovirus)에는 악성 신경교종과 같은 인간 고형 종양의 치료를 위한 키메라 폴리오바이러스(chimeric poliovirus)(Dobrikova et al., Mol Ther 2008, 16(11): 1865-1872); 인간 위암 세포 및 난소암 세포를 사멸하는 에코바이러스 ECHO1(echovirus ECHO1)(Shafren et al., Int J Cancer 2005, 115(2): 320-328; Haley et al., J Mol Med (Berl) 2009, 87(4): 385-399) 등이 포함된다. 그러나 종양 특이성과 종양 사멸 활성을 모두 가진 바이러스를 얻을 필요가 여전히 있다.

[0005] CVB1(Coxsackievirus B1)은 피코르나바이러스 과(Picomaviridae family)의 엔테로바이러스 속(enterovirus genus)에 속한다. CVB1은 일반적으로 감염 후 감염된 사람에서 열, 재채기, 및 기침과 같은 경증만을 유발하지만, 또한 신생아, 유아 및 면역결핍증 성인에서 바이러스성 심근염, 췌장염, 간염, 무균성 수막염 및 인슐린-의존성 당뇨병과 같은 심각한 만성 자가면역 질환을 유발할 수 있다는 연구가 있다(Rinehart et al., J Virol 1997, 71(5): 3986-3991). 현재, 당업계에서 CVB1의 항암 활성은 보고된 바가 없다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명에서, 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 과학 및 기술 용어는 당업자에게 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 또한, 본 명세서에서 사용된 세포 배양, 생화학, 세포 생물학, 핵산 화학 등의 운용 단계는 해당 분야에서 널리 사용되는 통상적인 단계이다. 한편, 본 발명을 보다 잘 이해하기 위해, 관련된 용어의 정의 및 설명은 아래에 제공된다.

[0007] 본 발명에서 사용된, 용어 "CVB1(Coxsackievirus B1, 콕삭키바이러스 B1)"은 피코르나바이러스 과(family)의 엔테로바이러스 속(genus)의 콕삭키바이러스 B의 한 종(species)을 의미하며, 이의 지놈(genome)은 5' 비-코딩 부위(non-coding region)(5' UTR), 하나의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)(ORF), 3' 비-코딩 부위(non-coding region)(3' UTR) 및 폴리(A) 테일로 이루어진 단일-가닥의 양-방향 RNA이다. 전구체 다단백질(polyprotein)을 인코딩하는 ORF는 자체 프로테아제에 의해 가수분해되고 절단되어, 구조 단백질 VP1 내지 VP4와 비-구조 단백질 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C 및 3D를 생성할 수 있다. 본 발명을 보다 명확하게 설명하기 위해, CVB1 지놈에서 상술한 단백질에 해당하는 핵산 서열을 VP1 유전자, VP2 유전자, VP3 유전자, VP4 유전자, 2A 유전자, 2B 유전자, 2C 유전자, 3A 유전자, 3B 유전자, 3C 유전자 및 3D 유전자라고 하였다. 본 발명에서, 표현 "콕삭키바이러스 B1(Coxsackievirus B1, CVB1)"은 야생형 CVB1을 의미하며, 이는 자연의 공급원으로부터 분리될 수 있고 의도적 및 인공적으로 변형되지 않으며, 이의 예에는 프로토타입 균주 Conn-5 및 다양한 임상적 분리체(예를 들어, 본 발명의 실시예 1에 기술된 임상적 분리체)가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 야생형 CVB1의 지놈 서열 또는 cDNA 서열은 당업계에 잘 공지되어 있고, 다양한 공개 데이터베이스(예를 들어, GenBank 데이터 베이스 수탁 번호: MG780414)에서 찾을 수 있다.

[0008] 본 발명에서 사용된 용어, 바이러스의 "변이형(modified form)"은 야생형 바이러스를 변형하여 얻은 변이형 바이러스를 의미하며, 이는 야생형 바이러스의 원하는 활성(예를 들어, 항암 활성)을 유지한다. 본 발명에서, CVB1의 "변이형(modified form)"은 변이형 CVB1 바이러스를 포함하지만, 이에 제한되지는 않으며, 이의 지놈 서열은 야생형 CVB1의 것과 비교하여 하나 또는 그 이상의 치환, 삽입 또는 결실을 갖고, 최소한 CVB1의 항암 활성을 유지한다.

[0009] 본 발명에서 사용된 용어, "항암 바이러스(oncolytic virus)"는 종양 세포를 감염시킬 수 있거나, 종양 세포에

서 복제할 수 있거나, 종양 세포의 사멸 및 용해를 유도할 수 있거나, 또는 종양 세포의 성장을 차단할 수 있는 바이러스를 의미한다. 바람직하게, 상기 바이러스는 비-종양 세포에 대해서는 최소한의 독성 효과를 가진다.

[0010] 본 발명에서 사용된 용어, "종양-특이성(tumor-specificity)"은 종양 세포에서 생물학적 기능 또는 활성을 선택적으로 나타내는 것을 의미한다. 예를 들어, 본 발명에서, 용어 "종양 특이성(tumor specificity)"이 바이러스의 사멸 선택성을 기술하기 위해 사용되는 경우, 이는 상기 바이러스가 비-종양 세포를 사멸시키지 않거나 실질적으로 사멸시키지 않고 종양 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있음을 의미하거나, 또는 상기 바이러스가 비-종양 세포를 사멸시키기보다는 종양 세포를 사멸시키는 데 더 효과적임을 의미한다.

[0011] 본 발명에서 사용된 용어, "항암 활성(oncolytic activity)"은 주로 종양-사멸 활성을 포함한다. 바이러스의 항암 활성을 기술하는 경우, 상기 바이러스의 항암 활성은 전형적으로 이의 종양 세포 감염 능력, 이의 종양 세포에서의 복제 능력, 및/또는 이의 종양 세포 사멸 능력에 의해 측정될 수 있다. 바이러스의 항암 활성은 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 바이러스의 종양 세포 감염 능력은 주어진 백분율의 종양 세포(예를 들어, 세포의 50%)를 감염시키는 데 필요한 바이러스의 용량을 측정함으로써 평가될 수 있고; 종양 세포에서 복제 능력은 종양 세포에서 바이러스의 성장을 측정함으로써 평가될 수 있으며; 종양 세포 사멸 능력은 세포변성 효과(cytopathic effect, CPE)를 모니터링하거나 종양 세포 활성을 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0012] 본 발명에서 사용된 표현, "CVB1의 cDNA 서열"은 바이러스 지놈 RNA 서열의 DNA 형태를 의미하며, 이는 RNA 서열에서 리보뉴클레오타이드(ribonucleotide)가 상응하는 디옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide)로 대체된다는 점에서만 RNA 서열과 다른데, 예를 들면, 우라실 리보뉴클레오타이드(UMP)가 티민 디옥시리보뉴클레오타이드(dTMP)로 대체된다는 점에서 그렇다.

[0013] 본 발명에서 사용된 용어, "외인성 핵산(exogenous nucleic acid)"은 원래 서열과는 이질적(foreign)이면서 인공적으로 도입된 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 외인성 핵산은 바이러스 지놈에서 발견되지 않는 임의의 유전자 또는 뉴클레오타이드 서열을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 그러나, 본 발명에서, 외인성 핵산은 최대 1500개, 예를 들어 최대 1200개, 최대 1000개의 뉴클레오타이드로 구성되는 것이 특히 바람직하다. 일부 경우에, 바람직하게는, 외인성 핵산은 사이토카인, 또는 항-종양 단백질 또는 폴리펩타이드와 같은, 항-종양 사멸 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩타이드를 코딩하거나; 또는, 외인성 핵산은 마이크로RNA(miRNA)의 표적 서열을 포함한다. 본 발명에서, 마이크로RNA는 바람직하게는 정상 세포에서 보다 종양 세포에서 유의하게 낮은 발현 수준을 갖고/갖거나 명백한 조직 특이성을 갖는 마이크로RNA로서, 이의 예에는 간 조직에서 특이적으로 발현되는 miR-122, miR-192, miR-483 등; 췌장 조직에서 특이적으로 발현되는 miR216a/b, miR217 및 miR-375; 심장에서 특이적으로 발현되는 miR-1, miR-133a/b, miR-208 등; 신장 조직에서 특이적으로 발현되는 miR-192, miR-196a/b, miR-204, miR-215 등; 근육 조직에서 특이적으로 발현되는 miR-133a/b, miR-206 등; 뇌 조직에서 특이적으로 발현되는 miR-124a, MiR-125a/b, miR-128a/b, miR-138 등; 및 간 종양 조직에서 저-발현되는(under-expressed) miR-34, miR-122a, miR-26a; 췌장 종양 조직에서 저-발현되는 miR-107, miR-96 및 miR-196; 신장 종양 조직에서 저-발현되는 miR-34; 방광 종양 조직에서 저-발현되는 miR-143, miR-133a/b; 폐 종양 조직에서 저-발현되는 miR-Let-7, miR-29; 등(예를 들어, Ruiz AJ and Russell S J. MicroRNAs and oncolytic viruses. [J]. Curr Opin Virol, 2015, 13: 40-48 참조; 이의 전문은 본원에 참고로 포함됨)이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0014] 본 발명에서, 변이된 CVB1이 상술한 마이크로RNA의 표적 서열을 포함하는 경우, 이는 마이크로RNA가 높게 발현되거나 특이적으로 발현되는 세포/조직에서 마이크로RNA에의해 조절되어, 항암 바이러스의 복제는 약화되고 심지어 사멸 활성을 잃게 되는 반면, 이는 마이크로RNA가 낮게 발현되거나 발현되지 않는 종양 세포/조직에서는 정상적으로 복제할 수 있으므로, 종양 세포를 사멸한다.

[0015] 본 발명에서 사용된 용어, "사이토카인(cytokine)"은 당업자에게 잘 공지된 의미를 갖는다. 그러나, 본 발명에서, 본 발명의 항암 바이러스가 종양을 치료하기 위해 사용되는 경우, 사이토카인은 종양 치료에 사용될 수 있는 사이토카인인 것이 특히 바람직하다. "사이토카인"의 예에는 인터류킨(interleukin)(예, IL-2, IL-12 및 IL-15), 인터페론(interferon)(예, IFNα, IFNβ, IFNɣ), 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor)(예, TNFα), 콜로니 자극 인자(colony stimulating factor)(예, GM-CSF), 및 이의 임의의 조합(예를 들어, Ardolino M, Hsu J, Raulet D H. Cytokine treatment in cancer immunotherapy [J]. Oncotarget, 2015, 6 (23): 19346-19347 참조)이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0016] 본 발명에 사용된 용어, "항-종양 단백질 또는 폴리펩타이드(anti-tumor protein or polypeptide)"는 종양에

대한 치료 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩타이드를 의미하며, 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다: (1) 세포에 독성이 있거나, 또는 세포 증식을 억제할 수 있거나, 또는 세포사멸(apoptosis)을 유도할 수 있는 단백질 또는 폴리펩타이드, 이의 예에는 티미딘 키아나제(thymidine kinase TK; TK/GCV), TRAIL 및 FasL(예를 들어, Candolfi M, King GD, Muhammad AG, et al. Evaluation of proapototic transgenes to use in combination with Flt3L in an immune-stimulatory gene therapy approach for Glioblastoma multiforme (GBM) [J]. FASEB J, 2008, 22: 1077.13 참조)이 포함되지만 이에 제한되는 것은 아니다; (2) 면역치료 효과를 갖는 단백질 또는 폴리펩타이드, 이의 예에는 CTLA-4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4)에 대한 단쇄(scFv) 항체(항-CTLA-4), PD-1(programmed death receptor 1)에 대한 단쇄(scFv) 항체 (항-PD-1) 및 PDL-1(programmed death ligand 1)에 대한 단쇄(scFv) 항체(예를 들어, Nolan E, Savas P, Policheni AN, et al. Combined immune checkpoint blockade as a therapeutic strategy for BRCA1-mutated breast cancer [J]. Science Trans Med, 2017, 9: eaal4922 참조; 이의 전문이 본원에 참조로 포함됨)가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다; (3) 종양 혈관신생성(tumor angiogenesis)을 억제하는 단백질 또는 폴리펩타이드, 이의 예에는, VEGF(vascular endothelial growth factor)에 대한 단쇄(scFv) 항체, VEGF-유래 폴리펩타이드(예, $_{D}$(LPR), KSRVRKGKGQKRKRKKSRYK 등), 및 ATN-161(예를 들어, Rosca EV, Koskimaki JE, Rivera CG, et al. Anti-angiogenic peptides for cancer therapeutics [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2011, 12 (8): 1101-1116 참조; 이의 전문이 본원에 참조로 포함됨)이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에서 사용된 용어, "scFv"는 중쇄 가변 영역(heavy chain variable region; VH) 및 경쇄 가변 영역(a light chain variable region; VL)을 포함하는 단일 폴리펩타이드 사슬(single polypeptide chain)을 의미하며, 상기 VL 및 VH는 링커(linker)에 의해 연결된다(예를 들어, Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); 및 Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Volume 113, edited by Roseburg and Moore, Springer-Verlag, New York, pages 269-315 (1994) 참조). 이러한 scFv 분자는 다음의 일반적인 구조를 가질 수 있다: NH_2-VL-linker-VH-COOH 또는 NH_2-VH-linker-VL-COOH.

[0018] 본 발명에서 사용된 용어, "동일성(identity)"은 2개의 단백질/폴리펩타이드 사이 또는 2개의 핵산 사이의 일치 정도를 의미한다. 비교를 위한 2개의 서열이 특정 부위에서 염기(base) 또는 아미노산의 동일한 단량체(monomer) 서브-유닛(sub-unit)을 갖는 경우(예, 2개의 DNA 분자 각각이 특정 부위에서 아데닌(adenine)을 갖거나, 또는 2개의 단백질/폴리펩타이드 각각이 특정 부위에서 리신(lysine)을 갖는 경우), 상기 2개의 분자는 그 부위에서 동일하다. 2개의 서열 사이의 동일성 백분율(percent identity)은 비교할 부위의 총 수에 대한 2개의 서열에 의해 공유된 동일한 부위의 수 × 100으로 계산한다. 예를 들어, 두 서열의 10개 부위 중 6개가 일치하면, 이 두 서열은 60% 동일성을 갖는다. 예를 들어, DNA 서열: CTGACT 및 CAGGTT는 50%의 동일성을 공유한다 (6개 부위 중 3개가 일치함). 일반적으로, 두 서열의 비교는 최대 동일성을 생성하는 방식으로 수행된다. 이러한 정렬(alignment)은 예를 들어 Needleman, et al.(J. Mol. Biol. 48:443-453, 1970)의 방법에 기반한 Align program(DNAstar, Inc.)과 같은 컴퓨터 프로그램을 이용하여 수행될 수 있다. 두 아미노산 서열 사이의 동일성 백분율은 또한 12의 갭 길이 패널티(gap length penalty) 및 4의 갭 패널티(gap penalty)로 PAM120 중량 잔류 테이블(weight residue table)을 사용하여, ALIGN 프로그램(version 2.0)에 포함된 E. Meyers 및W. Miller(Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))의 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. 또한, 두 아미노산 서열 사이의 상동성의 백분율은, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 갭 중량(gap weight) 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 중량(length weight)으로 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스 둘 중 하나를 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지(http://www.gcg.com 에서 이용가능)에 있는 GAP 프로그램에 포함된, Needleman 및 Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970))의 알고리즘에 의해 결정될 수 있다.

[0019] 본 발명에서 사용된 용어, "벡터(vector)"는 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)에 삽입될 수 있는 핵산 운반체(nucleic acid vehicle)를 의미한다. 벡터가 삽입된 폴리뉴클레오타이드에 의해 인코딩된 단백질의 발현을 가능하게 하는 경우, 벡터는 발현 벡터(expression vector)를 의미한다. 벡터는 형질전환(transformation), 형질도입(transduction), 또는 형질감염(transfection)에 의해 숙주 세포로 도입될 수 있어서, 벡터에 의해 운반된 유전 물질 요소는 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 상기 벡터는 당업자에게 잘 공지되어 있으며, 다음을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다: 플라스미드(plasmid); 파지미드(phagemid); 코스미드(cosmid); 효모 인공 염색체(yeast artificial chromosomes, YAC), 박테리아 인공 염색체(bacterial artificial chromosomes, BAC) 또는 P1-유래 인공 염색체(P1-derived artificial chromosomes, PAC)와 같은 인공 염색체(artificial chromosome); λ-파지 또는 M13 파지와 같은 박테리오파지(bacteriophages) 및 동물 바이러스. 벡터로 사용될

수 있는 동물 바이러스는 레트로바이러스(retrovirus)(렌티바이러스(lentivirus) 포함), 아데노바이러스(adenovirus), 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus), 헤르페스바이러스(herpesvirus)(예컨대 단순포진바이러스(herpes simplex virus)), 폭스바이러스(poxvirus), 바큘로바이러스(baculovirus), 유두종바이러스(papillomavirus), 및 파포바이러스(papovavirus)(예컨대 SV40)를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 벡터는 프로모터 서열(promoter sequence), 전사 개시 서열(transcription initiation sequence), 인핸서 서열(enhancer sequence), 선별 요소(elements for selection) 및 리포터 유전자(reporter gene)를 포함하는 발현을 조절하는 다양한 요소를 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 벡터는 복제 개시 부위(replication initiation site)를 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명에서 사용된 용어, "IRES(internal ribosome entry site)"는 5' 캡(5' cap) 구조를 필요로 하지 않고 번역을 개시할 수 있는 메신저RNA(mRNA) 서열에 위치한 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. IRES는 일반적으로 5' 비번역 부위(5' untranslated region, 5'UTR)에 위치하지만, mRNA의 다른 부분에도 또한 위치할 수 있다.

[0021] 본 발명에서 사용된 용어, "인간 라이노바이러스 2(human rhinovirus 2, HRV2)"는 피코르나바이러스 과(family of picornaviridae)의 바이러스를 의미하고, 이의 지놈 서열은 또는 cDNA 서열은 당업계에 잘 공지되어 있으며, 다양한 공개 데이터베이스(예를 들어, GenBank 데이터베이스 수탁 번호 X02316.1)에서 찾을 수 있다.

[0022] 본 발명에서 사용된 표현, "CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열을 포함하는 핵산 분자" 또는 "핵산 분자는 CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열을 포함한다"는 당업자에게 일반적으로 이해되는 의미를 가지며, 즉, 핵산 분자가 DNA인 경우, 핵산 분자는 DNA의 형태로 CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열을 포함하고; 핵산 분자가 RNA인 경우, 핵산 분자는 CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열을 포함한다.

[0023] 본 발명에서 사용된 용어, "약제학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제(pharmaceutically acceptable carrier and/or excipient)"는 대상(subject)과 활성 성분이 약제학적으로 및/또는 생리학적으로 양립 가능한 담체 및/또는 부형제를 의미하고, 이는 당업계에 널리 공지되어 있으며(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995 참조), 다음을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다: pH 조절제(pH adjusting agent), 계면 활성제(surfactant), 이온 강도 증가제(ionic strength enhancer), 삼투압 유지제(agent to maintain osmotic pressure), 흡수 지연제(agent to delay absorption), 희석제(diluent), 보강제(adjuvant), 보존제(preservative), 안정제(stabilizer) 등. 예를 들어, pH 조절제는 인산 완충 생리식염수(phosphate buffered saline)를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 계면 활성제는 양이온성(cationic), 음이온성(anionic) 또는 비-이온성(non-ionic) 계면 활성제, 예컨대 Tween-80를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이온 강도 증가제는 염화나트륨을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 삼투압 유지제는 당(sugar), NaCl 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 흡수 지연제는 모노스테아레이트(monostearate) 및 젤라틴(gelatin)을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 희석제는 물, 수성 완충제(aqueous buffers)(예컨대 완충 식염수(buffered saline)), 알코올 및 폴리올(예컨대 글리세롤) 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 보강제는 알루미늄 보강제(예컨대 수산화 알루미늄(aluminum hydroxide)), 프로인드 보강제(Freund's adjuvant)(예컨대 완전 프로인드 보강제(complete Freund's adjuvant)) 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 보존제는 다양한 항균제(antibacterial agent) 및 항진균제(antifungal agent), 예컨대 티메로살(thimerosal), 2-페녹시에탄올(2-phenoxyethanol), 파라벤(paraben), 트리클로로-t-부탄올 (trichloro-t-butanol), 페놀(phenol), 소르브산(sorbic acid) 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 안정제는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가지며, 이는 약물에서 활성 성분의 원하는 활성(예컨대 항암 활성)을 안정화시킬 수 있고, 글루타민산 나트륨(sodium glutamate), 젤라틴(gelatin), SPGA, 당(sugar)(예를 들어, 소르비톨(sorbitol), 만니톨(mannitol), 녹말(starch), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 덱스트란(dextran), 또는 글루코스(glucose)), 아미노산(예를 들어, 글루탐산(glutamic acid), 글리신(glycine)), 단백질(예를 들어, 건조 유청(dried whey), 알부민(albumin), 또는 카세인(casein)) 또는 이들의 분해 산물(예를 들어, 락트알부민 가수분해물(lactalbumin hydrolysates))을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명에서 사용된 용어, "치료하는(treating)"은 질병(예를 들어, 종양)을 치료하는(treating) 또는 치유하는(curing) 것, 질병(예를 들어, 종양)의 증상 발현을 지연시키는 것, 및/또는 질병(예를 들어, 종양)의 발달을 지연시키는 것을 의미한다.

[0025] 본 발명에서 사용된 용어, "유효량(effective amount)"은 의도된 목적을 효과적으로 달성할 수 있는 양을 의미한다. 예를 들어, 치료적 유효량은 질병(예를 들어, 종양)을 치료(treat) 또는 치유(cure)하는 데, 질병(예를

들어, 종양)의 증상 발현을 지연시키는 데, 및/또는 질병(예를 들어, 종양)의 발달을 지연시키는 데 효과적이거나 충분한 양일 수 있다. 이러한 유효량은 당업자 또는 의사에 의해 용이하게 결정될 수 있고, 의도된 목적(예컨대 치료), 일반적인 건강 상태, 나이, 성별, 대상(subject)의 체중, 치료될 질병의 중증도(severity), 합병증, 투여 경로 등과 관련될 수 있다. 이러한 유효량의 결정은 당업자의 능력 범위 내에 있다.

[0026] 본 발명에서 사용된 용어, "대상(subject)"은 포유동물, 예컨대 영장류, 예컨대 인간을 의미한다. 특정 구현예에 있어서, 대상(subject)(예를 들어, 인간)은 종양을 갖거나, 또는 종양을 가질 위험이 있다.

[0027] 많은 실험과 반복된 탐구 끝에, 본 발명자들은 CVB1이 광범위한 스펙트럼의 유의한 종양 세포 사멸 활성을 가지고 있음을 예상치 못하게 발견하였다. 이러한 발견을 기반으로, 본 발명자들은 종양을 치료하기 위한 신규한 항암 바이러스(oncolytic virus)와 상기 바이러스를 기반으로 한 종양 치료 방법을 개발하였다.

[0028] 따라서, 첫 번째 양태에 따르면, 본 발명은 대상(subject)에서 종양을 치료하기 위한, 또는 대상에서 종양을 치료하기 위해 약제를 제조하기 위한, 콕삭키바이러스 B1(Coxsackievirus B1, CVB1) 또는 이의 변이형 또는 핵산 분자의 용도를 제공하며; 상기 핵산 분자는 다음에서 선택된 서열을 포함한다:

[0029] (1) 상기 CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열 또는 cDNA 서열; 및

[0030] (2) 상기 지놈 서열 또는 cDNA 서열의 상보적(complementary) 서열.

[0031] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 CVB1은 야생형 CVB1이다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 CVB1은 콕삭키바이러스 B1에 감염된 개체(individual)로부터 분리된 임상 분리체(clinical isolate)일 수 있다.

[0032] 특정 바람직한 구현예에 있어서, CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열은 서열번호 12에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성(sequence identity)을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열은 서열번호 12에 나타낸 뉴클레오타이드 서열이다.

[0033] 특정 바람직한 구현예에 있어서, CVB1 또는 이의 변이형의 cDNA 서열은 서열번호 1에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, CVB1 또는 이의 변이형의 cDNA 서열은 서열번호 1에 나타낸 뉴클레오타이드 서열이다.

[0034] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 변이형은 야생형 CVB1과 비교하여 이의 지놈에서 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드의 치환(substitution), 삽입(insertion) 또는 결실(deletion)을 갖는 변이된 CVB1이다.

[0035] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 야생형 CVB1과 비교하여, 상기 변이된 CVB1은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 변형(modification)을 갖는다:

[0036] (1) 비번역 부위(untranslated region)(예를 들어, 5'UTR 또는 3'UTR)에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이(mutation);

[0037] (2) 하나 또는 그 이상의 외인성(exogenous) 핵산의 삽입;

[0038] (3) 하나 또는 그 이상의 내인성(endogenous) 유전자의 결실 또는 돌연변이; 및

[0039] (4) 상기 세 항목의 임의의 조합.

[0040] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1은 5' 비번역 부위(5'UTR)에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함한다.

[0041] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1은 5'UTR 서열의 전부 또는 일부의 치환을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1의 5'UTR에서 IRES(internal ribosome entry site) 서열은 인간 라이노바이러스 2(human rhinovirus 2, HRV2)의 IRES 서열과 같은 외인성 IRES 서열로 치환된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 인간 라이노바이러스 2(HRV2)의 IRES 서열은 서열번호 2에 나타나 있다.

[0042] 인간 라이노바이러스 2(HRV2)의 IRES 서열의 사용은 예를 들어 항암 바이러스의 종양 특이성을 개선하는 데 일부 경우에서 유리하다. 정상적인 인간 신경 세포에서, 인간 라이노바이러스 2의 IRES 서열은 숙주 RNA-결합 단백질(DRBP76 및 NF45)에 의해 특이적으로 결합됨으로써, eIF4G와 같은 인자의 동원을 막는 것으로 이전에 보고된 바가 있다(Merrill et al. J Virol 2006,80 (7): 3147-3156; Merrill and Gromeier, J Virol 2006,80

(14): 6936-6942; Neplioueva et al. PLoS One 2010,5(7): e11710); 한편, Raf/Erk1/2/MAPK 및 다른 신호 전달 경로의 지원 없이는, 리보솜은 인간 라이노바이러스 2의 IRES 서열에 결합할 수 없으므로, 바이러스 단백질의 번역은 개시될 수 없다(Dobrikov et al., Mol Cell Biol 2011, 31 (14): 2947-2959; Dobrikov et al., Mol Cell Biol 2013, 33 (5): 937-946). 인간 신경교종 종양 세포에서, 인간 라이노바이러스 2의 IRES는 상기 2개 인자에 의해 영향을 받지 않으므로, 바이러스 단백질의 전사 및 번역을 정상적으로 개시할 수 있다. 따라서, 일부 경우에, CVB1의 IRES 서열을 인간 라이노바이러스 2의 IRES 서열로 대체하는 것은 인간 신경교종의 치료에서 상기 바이러스의 사용에 대한 영향을 미치지 않으면서, 정상 인간 신경 세포에 대한 본 발명의 상기 바이러스의 독성 및 부작용을 피하거나 감소시키는 데 유리하다.

[0043] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1은 외인성 핵산을 포함한다.

[0044] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 외인성 핵산은 사이토카인(예를 들어, GM-CSF, 바람직하게는 인간 GM-CSF), 또는 항-종양 단백질 또는 폴리펩타이드(예를 들어, PD-1 또는 PD-L1에 대한 scFv, 바람직하게는, 인간 PD-1 또는 PD-L1에 대한 scFv)를 인코딩한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 외인성 핵산은 변이된 CVB1의 지놈의 5'UTR 및 VP4 유전자 사이, 또는 VP1 유전자 및 2A 유전자 사이에 삽입된다.

[0045] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 외인성 핵산은 마이크로RNA(microRNA, miRNA)(예를 들어, miR-133 또는 miR-206)의 표적 서열(target sequence)을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 마이크로RNA의 표적 서열은 변이된 CVB1의 지놈의 3' 비번역 부위(3'UTR)에 삽입된다.

[0046] 종양 세포에서 특정 마이크로RNA의 발현 수준은 정상 세포에서 보다 유의하게 더 낮고/낮거나 명백한 조직 특이성을 갖는다고 이전에 보고된 바 있다. 따라서, 일부 경우에, 본 발명의 변이된 CVB1이 이러한 마이크로RNA의 표적 서열을 포함하는 것이 유리한 데, 왜냐하면 정상 세포 또는 조직에서 높게 발현되는 이러한 마이크로RNA는 상응하는 표적 서열을 통해서 정상 세포 또는 조직에서 변이된 CVB1의 복제를 감소시키거나 심지어 차단시킬 수 있어, 비-종양 세포에 대한 변이된 CVB1의 독성 및 부작용을 감소시키거나 심지어 회피할 수 있기 때문이다. 이러한 마이크로RNA는 miR-133, miR-206, miR-1, miR-143, miR-145, miR-217, let-7, miR-15, miR-16 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. (예를 들어, PCT 국제 출원 WO2008103755A1, US 특허 출원 US20160143969A1, 또는 Baohong Zhang et al., Developmental Biology, Volume 302, Issue 1, 1 February 2007, Pages 1-12 참조; 이들 모두는 본원에 그 전문이 참조로 포함된다).

[0047] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 외인성 핵산은 상술한 바와 같이 하나 또는 그 이상(예를 들어, 2, 3 또는 4)의 마이크로RNA의 표적 서열을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 외인성 핵산은 miR-133 및/또는 miR-206의 표적 서열을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, miR-133의 표적 서열은 서열번호 3에 나타나 있다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, miR-206의 표적 서열은 서열번호 4에 나타나 있다. 일부 경우에서, miR-133 및/또는 miR-206의 표적 서열의 삽입은 유리하다. 이는 miR-133 및 miR-206이 근육 조직에서 특이적으로 발현되기 때문으로, miR-133 및/또는 miR-206의 표적 서열을 변이된 CVB1으로 삽입하면 항암 바이러스의 조직 향성(tissue tropism)을 변화시킬 수 있어, 정상적인 근육 조직의 손상을 감소시키거나 피할 수 있게 하기 때문이다.

[0048] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1은 상술한 바와 같이 외인성 핵산의 적어도 하나의 삽입 및/또는 상술한 바와 같이 비번역 부위에서 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다.

[0049] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1의 지놈 서열은 서열번호 13 내지 16에 나타낸 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92 %, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1의 지놈 서열은 서열번호 13 내지 16에 나타낸 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 어느 하나이다.

[0050] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1의 cDNA 서열은 서열번호 8 내지 11에 나타낸 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92 %, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1의 cDNA 서열은 서열번호 8내지 11에 나타낸 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 어느 하나이다.

[0051] 본 발명의 변이된 CVB1은 역유전학 기술에 의해 얻을 수 있으며, 이는 당업계에 공지되어 있는데, 예를 들어, Yang LS, Li SX, Liu YJ, et al. Virus Res, 2015, 210: 165-168; Hou WH, Yang LS, Li SX, et al. Virus

Res, 2015, 205: 41-44를 참조하며; 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다. 이러한 구현예에 있어서, 야생형 CVB1의 cDNA는 변이된 CVB1을 얻기 위해서 전형적으로 변형된다(예를 들어, 외인성 핵산의 삽입, 내인성 유전자의 결실 또는 돌연변이, 또는 비번역 부위에서 돌연변이).

[0052] 본 발명에 따른 CVB1 또는 이의 변이형은 대상(subject)에서 바이러스에 대한 면역 반응을 감소시키거나 제거하기 위해 전처리(pretreatment)될 수 있고, 상기 전처리는 다음을 포함한다: 리포좀(liposome) 또는 미셀(micelle)에 CVB1을 패키징(packaging)하는 단계, 및/또는 숙주 세포에서 바이러스에 대한 체액성 및/또는 세포성 면역을 감소시키기 위하여 상기 바이러스의 캡시드 단백질(capsid protein)을 제거하기 위한 프로테아제(protease)(예를 들어, 키모트립신(chymotrypsin) 또는 트립신(trypsin))를 사용하는 단계.

[0053] 본 발명에서, 본 명세서에 기술된 바와 같이 CVB1 또는 이의 변이형은 종양 세포에서 적응(adaptation)을 위해 연속적으로 계대 배양될 수 있다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 종양 세포는 당업계에 공지된 종양 세포주(tumor cell line) 또는 종양 세포주(tumor cell strain)이거나, 또는 종양이 있는 개체(예를 들어, 대상(subject)로부터 in vivo 외과적 절제 또는 임상적 분리에 의해 얻은 종양 세포일 수 있다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, CVB1 또는 이의 변이형은 종양이 있는 개체(예를 들어, 대상)로부터 얻은 종양 세포에서 적응을 위해 연속적으로 계대 배양된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 종양 세포는 종양이 있는 개체(예를 들어, 대상)로부터 외과적 절제 또는 임상적 분리에 의해 얻어진다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 적응을 위한 연속적인 계대 배양 방법은 다음 과정으로 이루어진 복수(예를 들어, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20)의 사이클을 포함한다: 1) 표적 종양 세포를 바이러스로 감염시키는 단계; 2) 상층액에서 바이러스를 수확하는 단계; 및 3) 새로운 표적 종양 세포를 획득한 바이러스로 재감염시키는 단계.

[0054] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상술한 바와 같이 CVB1 및 이의 변이형은 병용될 수 있다. 따라서, 약제는 하나 또는 수 개의 CVB1 및 이의 변이형을 포함할 수 있다.

[0055] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자는 CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열 또는 cDNA 서열, 또는 상기 지놈 서열 또는 cDNA 서열의 상보적인 서열로 이루어진다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자는 CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 핵산 분자는 RNA이다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 핵산 분자는 서열번호 12 내지 16 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0056] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자는 CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열 또는 cDNA 서열, 또는 상기 지놈 서열 또는 cDNA 서열의 상보적인 서열을 포함하는 벡터(예를 들어, 클로닝 벡터 또는 발현 벡터)이다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자는 CVB1 또는 이의 변이형의 cDNA 서열, 또는 상기 cDNA 서열의 상보적 서열을 포함하는 벡터(예를 들어, 클로닝 벡터 또는 발현 벡터)이다.

[0057] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 핵산 분자는 CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열의 상보적 서열을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상보적 서열은 다음으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 상보적이다:

[0058] (1) 서열번호 12에 나타낸 뉴클레오타이드 서열;

[0059] (2) 서열번호 12에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열;

[0060] (3) 서열번호 13 내지 16 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오타이드 서열; 및

[0061] (4) 서열번호 13 내지 16 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열.

[0062] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 핵산 분자는 CVB1 또는 이의 변이형의 cDNA 서열의 상보적인 서열을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상보적인 서열은 다음으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 상보적이다:

[0063] (1) 서열번호 1에 나타낸 뉴클레오타이드 서열;

[0064] (2) 서열번호 1에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또

는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열;

[0065] (3) 서열번호 8 내지 11 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오타이드 서열; 및

[0066] (4) 서열번호 8 내지 11 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열.

[0067] 본 발명의 핵산 분자는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 전달될 수 있으며, 예를 들어, 네이키드(naked) 핵산 분자(예를 들어, 네이키드 RNA)는 직접적으로 주사될 수 있거나, 또는 비-바이러스성 전달 시스템이 사용될 수 있다. 비-바이러스성 전달 시스템은 당업계에 널리 공지된 다양한 물질로부터 얻어질 수 있고, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 "Yin H, et al. Nat Rev Genet. 2014 Aug; 15(8): 541-55." 및 "Riley MK, Vermerris W. Nanomaterials (Basel). 2017 Apr 28; 7(5). Pii: E94."에 상세히 기술된 물질, 예컨대 리포좀(liposome), 무기 나노입자(inorganic nanoparticle)(예컨대 금 나노입자), 중합체(polymer)(예컨대 PEG)를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0068] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본원에 기재된 바와 같은 약제(medicament)는 CVB1 및/또는 이의 변이형의 치료적 유효량, 또는 핵산 분자의 치료적 유효량을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 약제는 의료 분야에 공지된 임의의 형태일 수 있다. 예를 들어, 상기 약제는 정제(tablet), 환제(pill), 현탄액(suspension), 유제(emulsion), 용액(solution), 겔(gel), 캡슐(capsule), 분말(powder), 과립(granule), 엘릭시르(elixir), 로렌지(lozenge), 좌제(suppository), 또는 주사(injection)(주사 용액, 동결 건조된 분말을 포함) 등의 형태일 수 있다. 일부 구현예에 있어서, 상기 약제는 주사 용액(injection liquid) 또는 동결 건조된 분말(lyophilized powder)이다.

[0069] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 약제는 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 약제는 안정제를 포함한다.

[0070] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 약제는 선택적으로 추가적인 약제학적 활성제를 더 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본 발명에 따른 CVB1 또는 이의 변이형, 또는 본 발명의 핵산 분자는 추가적인 약제학적 활성제와 병용된다. 바람직한 일 구현예에 있어서, 추가적인 약제학적 활성제는 항-종양 활성을 갖는 약물, 예컨대 추가적인 항암 바이러스, 화학요법제 또는 면역요법제이다.

[0071] 본 발명에서, 상기 추가적인 항암 바이러스는 헤르페스바이러스(herpes virus), 아데노바이러스(adenovirus), 파르보바이러스(parvovirus), 레오바이러스(reovirus), 뉴캐슬병바이러스(Newcastle disease virus), 수포성구내염바이러스(vesicular stomatitis virus), 홍역바이러스(measles virus), 또는 이의 임의의 조합을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 화학요법제는 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 미토마이신(mitomycin), 메토트렉세이트(methotrexate), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 다카바진(dacarbazine), 미톡산트론(mitoxantrone), 안트라사이클린(anthracycline)(예를 들어, 에피루비신(epirubicin) 또는 독소루비신(doxorubicin)), 에토포시드(etoposide), 백금 화합물(platinum compound)(예를 들어, 카보플라틴(carboplatin) 또는 시스플라틴(cisplatin)), 탁산(taxane)(예를 들어, 파클리탁셀(paclitaxel) 또는 도세탁셀(docetaxel)), 또는 이의 임의의 조합을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 면역요법제는 면역 관문 억제제(immune checkpoint inhibitor)(예를 들어, PD-L1/PD-1 억제제 또는 CTLA-4 억제제), 종양-특이적 표적 항체(tumor-specific targeting antibody)(예를 들어, 리툭시맙(rituximab) 또는 허셉틴(herceptin)), 또는 이의 임의의 조합을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0072] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 약제는 CVB1 및/또는 이의 변이형의 단위 용량(unit dose)을 포함하고, 예를 들어, CVB1 및/또는 이의 변이형의 적어도 $1X10^{2}$ pfu, 적어도 $1X10^{3}$ pfu, 적어도 $1X10^{4}$ pfu, $1X10^{5}$ pfu, $1X10^{6}$ pfu, 적어도 $1X10^{7}$ pfu, 적어도 $1X10^{8}$ pfu, 적어도 $1X10^{9}$ pfu, 적어도 $1X10^{10}$ pfu, 적어도 $1X10^{11}$ pfu, 적어도 $1X10^{12}$ pfu, 적어도 $1X10^{13}$ pfu, 적어도 $1X10^{14}$ pfu 또는 적어도 $1X10^{16}$ pfu를 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 약제는 CVB1 및/또는 이의 변이형의 $1X10^{2}$ pfu 내지 $1X10^{17}$ pfu를 포함한다.

[0073] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본원에 기재된 바와 같은 약제는 핵산 분자의 단위 용량(unit dose)을 포함하고, 예를 들어, 핵산 분자의 $3X10^{10}$ 내지 $3X10^{14}$ 바이러스 지놈 카피를 포함한다.

[0074] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 약제는 추가적인 요법과 함께 투여될 수 있다. 이 추가적인 요법은 수술

(surgery), 화학요법(chemotherapy), 방사선 요법(radiation therapy), 면역요법(immunotherapy), 호르몬요법(hormone therapy), 또는 유전자 요법(gene therapy)과 같은 종양을 위한 공지된 임의의 요법일 수 있다. 이 추가적인 요법은 상기 약제의 투여 전, 동시에, 또는 후에 투여될 수 있다.

[0075] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 종양은 대장암(colorectal cancer), 위암(gastric cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 흑색종(melanoma), 유방암(breast cancer), 신장암(kidney cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 림프종(lymphoma), 골육종(osteogenic sarcoma), 전립선암(prostate cancer), 신경교종(glioma), 신경아세포종(neuroblastoma), 설암(tongue cancer), 비인두암(nasopharyngeal cancer), 비중격의 편평세포암종(squamous cell carcinoma of nasal septum), 인두 편평세포암종(pharyngeal squamous cell carcinoma), 악하선의 편평세포암종(squamous cell carcinoma of submandibular gland), 후두암(laryngeal cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 갑상선 관암종(thyroid ductal carcinoma) 및 방광암(bladder cancer)으로부터 선택된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 종양은 폐암, 식도암(esophageal cancer), 난소암, 자궁내막암, 췌장암, 설암, 신장암, 전립선암, 비인두암, 및 방광암으로부터 선택된다.

[0076] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 대상(subject)은 인간과 같은 포유동물이다.

[0077] 두 번째 양태에 따르면, 본 발명은 CVB1 또는 이의 변이형의 유효량 또는 핵산 분자의 유효량을 이를 필요로 하는 대상(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양을 치료하기 위한 방법을 제공한다; 상기 핵산 분자는 다음으로부터 선택된 서열을 포함한다:

[0078] (1) CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열 또는 cDNA 서열; 및

[0079] (2) 지놈 서열 또는 cDNA 서열의 상보적 서열.

[0080] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 대상(subject)은 CVB1을 투여받는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, CVB1은 야생형 CVB1이다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, CVB1은 콕삭키바이러스 B1에 감염된 개체로부터 분리된 임상적 분리체(clinical isolate)일 수 있다.

[0081] 특정 바람직한 구현예에 있어서, CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열은 서열번호 12에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열은 서열번호 12에 나타낸 뉴클레오타이드 서열이다.

[0082] 특정 바람직한 구현예에 있어서, CVB1 또는 이의 변이형의 cDNA 서열은 서열번호 1에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, CVB1 또는 이의 변이형의 cDNA 서열은 서열번호 1에 나타낸 뉴클레오타이드 서열이다.

[0083] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 대상(subject)은 CVB1의 변이형을 투여받는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이형은 변이된 CVB1이고, 이는 야생형 CVB1와 비교하여 지놈에서 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드의 치환, 삽입 또는 결실을 갖는다.

[0084] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1은 야생형 CVB1과 비교하여 다음에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 변형:

[0085] (1) 비번역 부위(예를 들어, 5'UTR 또는 3'UTR)에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이;

[0086] (2) 하나 또는 그 이상의 외인성 핵산의 삽입;

[0087] (3) 하나 또는 그 이상의 내인성 유전자의 결실 또는 돌연변이; 및

[0088] (4) 상기 세 항목의 임의의 조합.

[0089] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1은 5' 비번역 부위(5'UTR)에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함한다.

[0090] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1은 5'UTR 서열의 전부 또는 일부의 치환을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1의 5'UTR에서 IRES(internal ribosome entry site) 서열은 인간 라이노바이러스 2(HRV2)의 IRES 서열과 같은 외인성 IRES 서열로 대체된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 인간 라이노바이러

스 2(HRV2)의 IRES 서열은 서열번호 2에 나타나 있다.

[0091] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1은 외인성 핵산을 포함한다.

[0092] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 외인성 핵산은 사이토카인(예를 들어, GM-CSF, 바람직하게는 인간 GM-CSF), 또는 항-종양 단백질 또는 폴리펩타이드(예를 들어, PD-1 또는 PD-L1에 대한 scFv, 바람직하게는, 인간 PD-1 또는 PD-L1에 대한 scFv)를 인코딩한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 외인성 핵산은 변이된 CVB1의 지놈의 5'UTR 및 VP4 유전자 사이, 또는 VP1 유전자 및 2A 유전자 사이에 삽입된다.

[0093] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 외인성 핵산은 마이크로RNA(miRNA)(예를 들어, miR-133 또는 miR-206)의 표적 서열을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 마이크로RNA의 표적 서열은 변이된 CVB1의 지놈의 3' 비번역 부위(3'UTR)에 삽입된다.

[0094] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상술한 바와 같이 외인성 핵산은 하나 또는 그 이상(예를 들어, 2, 3 또는 4)의 마이크로RNA의 표적 서열을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 외인성 핵산은 miR-133 및/또는 miR-206의 표적 서열을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, miR-133의 표적 서열은 서열번호 3에 나타나 있다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, miR-206의 표적 서열은 서열번호 4에 나타나 있다.

[0095] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1은 상술한 바와 같이 외인성 핵산의 적어도 하나의 삽입 및/또는 상술한 바와 같이 비번역 부위에서 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다.

[0096] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1의 지놈 서열은 다음에서 선택된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92 %, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다: 서열번호 13 내지 16에 나타낸 뉴클레오타이드 서열. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1의 지놈 서열은 서열번호 13 내지 16에 나타낸 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 어느 하나이다.

[0097] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1의 cDNA 서열은 다음에서 선택된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92 %, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 상동성을 갖는다: 서열번호 8 내지 11에 나타낸 뉴클레오타이드 서열. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1의 cDNA 서열은 서열번호 8 내지 11에 나타낸 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 어느 하나이다.

[0098] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상술한 바와 같이 CVB1 및 이의 변이형은 병용될 수 있다. 따라서, CVB1 및 이의 변이형의 하나 또는 그 이상은 대상(subject)에게 투여될 수 있다.

[0099] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자는 대상(subject)에게 투여된다.

[0100] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자는 CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열 또는 cDNA 서열, 또는 상기 지놈 서열 또는 cDNA 서열의 상보적인 서열로 이루어진다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자는 CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 핵산 분자는 RNA이다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 핵산 분자는 서열번호 12 내지 16 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0101] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자는 CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열 또는 cDNA 서열, 상기 지놈 서열 또는 cDNA 서열의 상보적 서열을 포함하는 벡터(예를 들어, 클로닝 벡터 또는 발현 벡터)이다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 핵산 분자는 본원에 기재된 바와 같은 CVB1 또는 이의 변이형의 cDNA 서열, 또는 상기 cDNA 서열의 상보적 서열을 포함하는 벡터(예를 들어, 클로닝 벡터 또는 발현 벡터)이다.

[0102] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 핵산 분자는 CVB1 또는 이의 변이형의 지놈 서열의 상보적 서열을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상보적 서열은 다음에서 선택되는 뉴클레오타이드 서열과 상보적이다:

[0103] (1) 서열번호 12에 나타낸 뉴클레오타이드 서열;

[0104] (2) 서열번호 12에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열;

[0105] (3) 서열번호 13 내지 16 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오타이드 서열; 및

[0106] (4) 서열번호 13 내지 16 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열.

[0107] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 핵산 분자는 CVB1 또는 이의 변이형의 cDNA 서열의 상보적 서열을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상보적 서열은 다음으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 상보적이다:

[0108] (1) 서열번호 1에 나타낸 뉴클레오타이드 서열;

[0109] (2) 서열번호 1에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열;

[0110] (3) 서열번호 8 내지 11 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오타이드 서열; 및

[0111] (4) 서열번호 8 내지 11 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열.

[0112] 본 발명에서, 본 발명의 핵산 분자는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 전달될 수 있고, 예를 들어, 네이키드 핵산 분자(예를 들어, 네이키드 RNA)는 직접적으로 주사될 수 있거나, 또는 비-바이러스성 전달 시스템이 사용될 수 있다. 비-바이러스성 전달 시스템은 당업계에 널리 공지된 다양한 물질로부터 얻을 수 있고, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 "Yin H, et al. Nat Rev Genet. 2014 Aug; 15(8): 541-55." 및 "Riley MK, Vermerris W. Nanomaterials (Basel). 2017 Apr 28; 7(5). Pii: E94."에 상세히 기술된 물질, 예컨대 리포좀, 무기 나노입자(예컨대 금 나노입자), 중합체(예컨대 PEG)를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0113] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본원에 기재된 바와 같은 CVB1 및/또는 이의 변이형, 또는 핵산 분자는 약제학적 조성물(pharmaceutical composition)로서 제형화될 수 있고 투여될 수 있다. 이러한 약제학적 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 CVB1 및/또는 이의 변이형의 치료적 유효량, 또는 핵산 분자의 치료적 유효량을 포함할 수 있다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 약제학적 조성물은 의료 분야에 공지된 임의의 형태일 수 있다. 예를 들어, 약제학적 조성물은 정제, 환제, 현탄액, 유제, 용액, 겔, 캡슐, 분말, 과립, 엘릭시르, 로렌지, 좌제, 주사(주사 용액, 동결 건조된 분말을 포함), 및 기타 형태일 수 있다. 일부 구현예에 있어서, 약제학적 조성물은 주사 용액 또는 동결 건조된 분말이다.

[0114] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 약제학적 조성물은 안정제를 포함한다.

[0115] 본 발명에서, 본원에 기재된 바와 같은 CVB1 및/또는 이의 변이형, 또는 핵산 분자는 다양한 적절한 경로에 의해 대상(subject)에게 투여될 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기재된 바와 같은 CVB1 및/또는 이의 변이형 또는 핵산 분자의 투여 경로는 종양의 위치와 종류에 의존한다. 예를 들어, 쉽게 접근 가능한 고형 종양의 경우, 바이러스 또는 핵산 분자는 종양(예를 들어, 종양내 주사(intratumoral injection))에 직접적인 주사에 의해 선택적으로 투여되고; 조혈계(hematopoietic system)의 종양의 경우, 바이러스 또는 핵산 분자는 정맥내(intravenous) 또는 다른 혈관내(intravascular) 경로에 의해 투여될 수 있으며; 체내에서 쉽게 접근 가능하지 않은 종양(예를 들어, 전이(metastases))의 경우, 바이러스 또는 핵산 분자는 투여되어 전신에 걸쳐서 종양에 도달할 수 있도록 전신으로(systematically) 투여될 수 있다(예를 들어, 정맥내 또는 근육내(intramuscular) 주사). 선택적으로, 본 발명의 바이러스 또는 핵산 분자는 피하(subcutaneous), 복강내(intraperitoneal), 척수강내(intrathecal)(예를 들어, 뇌종양을 위해), 국소(topical)(예를 들어, 흑색종을 위한), 경구(예를 들어, 구강암 또는 식도암을 위한), 비강내(intranasal) 또는 흡입 스프레이(inhalation spray)(예를 들어, 폐암을 위한) 경로 등을 통해 투여될 수 있다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본 발명의 CVB1 및/또는 이의 변이형, 또는 본원에 기재된 바와 같은 핵산은 피내(intradermal), 피하(subcutaneous), 근육내(intramuscular), 정맥내(intravenous) 및 경구 경로 등을 통해 투여될 수 있다.

[0116] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 방법은 항-종양 활성을 갖는 추가적인 약제학적 활성제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 추가적인 약제학적 활성제는 본원에 기재된 바와 같은 CVB1 및/또는 이의 변이형, 또는 핵산 분자의 투여 전에, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 투여될 수 있다.

[0117] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 추가적인 약제학적 활성제는 항암 바이러스, 화학요법제, 또는 면역요법제를

포함한다.

[0118] 본 발명에서, 상기 추가적인 항암 바이러스는 헤르페스바이러스, 아데노바이러스, 파르보바이러스, 레오바이러스, 뉴캐슬병바이러스, 수포성구내염바이러스, 홍역바이러스, 또는 이의 임의의 조합을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 화학요법제는 5-플루오로우라실, 미토마이신, 메토트렉세이트, 하이드록시우레아, 사이클로포스파미드, 다카바진, 미톡산트론, 안트라사이클린(예를 들어, 에피루비신 또는 독소루비신), 에토포시드, 백금 화합물(예를 들어, 카보플라틴 또는 시스플라틴), 탁산(예를 들어, 파클리탁셀 또는 도세탁셀), 또는 이의 임의의 조합을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 면역요법제는 면역 관문 억제제(예를 들어, PD-L1/PD-1 억제제 또는 CTLA-4 억제제), 종양-특이적 표적 항체(예를 들어, 리툭시맙 또는 허셉틴), 또는 이의 임의의 조합을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0119] 특정 바람직한 구현예에 있어서, CVB1 및/또는 이의 변이형은 대상(subject)의 체중의 1 pfu/kg 내지 $1X10^{15}$ pfu/kg의 임의의 양으로 투여될 수 있으며, 예를 들어, CVB1 및/또는 이의 변이형은 대상(subject)의 체중의 적어도 $1X10^{3}$ pfu/kg, 적어도 $1X10^{4}$ pfu/kg, $1X10^{5}$ pfu/kg, $1X10^{6}$ pfu/kg, 적어도 $1X10^{7}$ pfu/kg, 적어도 $1X10^{8}$ pfu/kg, 적어도 $1X10^{9}$ pfu/kg, 적어도 $1X10^{10}$ pfu/kg, 적어도 $1X10^{11}$ pfu/kg, 또는 적어도 $1X10^{12}$ pfu/kg의 양으로 투여될 수 있다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자는 대상(subject)의 체중의 kg 당 $3X10^{10}$ 내지 $3X10^{14}$ 바이러스 지놈 카피의 임의의 양으로 투여될 수 있다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 본원에 기재된 바와 같은 CVB1 및/또는 이의 변이형 또는 핵산 분자는 1일 3회, 1일 2회, 1일 1회, 2일 1회, 또는 1주 1회로 투여될 수 있고, 상술한 투약 용법(dosage regimen)은 선택적으로 매주 또는 매월 적절하게 반복될 수 있다.

[0120] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 방법은 추가적인 요법을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 이 추가적인 요법은 수술, 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 호르몬요법, 또는 유전자요법과 같은 종양에 대해 공지된 임의의 요법일 수 있다. 이 추가적인 요법은 상기 기술된 바와 같은 방법의 투여 전, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 투여될 수 있다.

[0121] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 대상(subject)은 인간과 같은 포유동물이다.

[0122] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 대장암, 위암, 폐암, 간암, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 흑색종, 유방암, 신장암, 췌장암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신경교종, 신경아세포종, 설암, 비인두암, 비중격의 편평세포암종, 인두 편평세포암종, 악하선의 편평세포암종, 후두암, 갑상선암, 갑상선 관암종 및 방광암으로부터 선택된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 폐암, 식도암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암, 설암, 신장암, 전립선암, 비인두암, 및 방광암으로부터 선택된다.

[0123] 세 번째 양태에 따르면, 본 발명은 또한 첫 번째 또는 두 번째 양태에서 정의된 CVB1 및/또는 이의 변이형, 또는 첫 번째 또는 두 번째 양태에서 정의된 핵산 분자를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0124] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 의료 분야에 공지된 임의의 형태일 수 있다. 예를 들어, 상기 약제학적 조성물은 정제, 환제, 현탄액, 유제, 용액, 겔, 캡슐, 분말, 과립, 엘릭시르, 로렌지, 좌제, 주사(주사 용액, 동결 건조된 분말을 포함), 및 다른 형태일 수 있다. 일부 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 주사 용액 또는 동결 건조된 분말이다.

[0125] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 안정제를 포함한다.

[0126] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 선택적으로 추가적인 약제학적 활성제를 추가로 포함한다. 바람직한 구현예에 있어서, 상기 추가적인 약제학적 활성제는 추가적인 항암 바이러스, 화학요법제 또는 면역요법제와 같은 항-종양 활성을 갖는 약물이다.

[0127] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 대상(subject)에서 종양을 치료하기 위해 사용된다.

[0128] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 대상(subject)은 인간과 같은 포유동물이다.

[0129] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 대장암, 위암, 폐암, 간암, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 흑색종, 유방암, 신장암, 췌장암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신경교종, 신경아세포종, 설암, 비인두암, 비중격의 편평세포암종, 인두 편평세포암종, 악하선의 편평세포암종, 후두암, 갑상선암, 갑상선 관암종 및 방광암으로부

터 선택된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 폐암, 식도암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암, 설암, 신장암, 전립선암, 비인두암, 및 방광암으로부터 선택된다.

[0130] 네 번째 양태에 따르면, 본 발명은 또한 약제로서 사용하기 위한 첫 번째 또는 두 번째 양태에서 정의된 CVB1 및/또는 이의 변이형, 또는 첫 번째 또는 두 번째 양태에서 정의된 핵산 분자에 관한 것이다.

[0131] 다섯 번째 양태에 따르면, 본 발명은 야생형 CVB1과 비교하여 5'UTR의 IRES(internal ribosome entry site) 서열을 인간 라이노바이러스 2(HRV2)의 IRES 서열로 치환한 변이된 CVB1을 제공한다.

[0132] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 인간 라이노바이러스 2(HRV2)의 IRES(internal ribosome entry site) 서열은 서열번호 2에 나타나 있다.

[0133] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 야생형 CVB1의 지놈 서열은 서열번호 12에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91 %, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 야생형 CVB1의 지놈 서열은 서열번호 12에 나타낸 뉴클레오타이드 서열이다.

[0134] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 야생형 CVB1의 cDNA 서열은 서열번호 1에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91 %, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 야생형 CVB1의 cDNA 서열은 서열번호 1에 나타낸 뉴클레오타이드 서열이다.

[0135] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1은 또한 외인성 핵산을 포함한다.

[0136] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 외인성 핵산은 사이토카인(예를 들어, GM-CSF, 바람직하게 인간 GM-CSF), 또는 항-종양 단백질 또는 폴리펩타이드(예를 들어, PD-1 또는 PD-L1에 대한 scFv, 바람직하게, 인간 PD-1 또는 PD-L1에 대한 scFv)를 인코딩한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 외인성 핵산은 변이된 CVB1의 지놈의 5'UTR 및 VP4 유전자 사이, 또는 VP1 유전자 및 2A 유전자 사이에 삽입된다.

[0137] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 외인성 핵산은 마이크로RNA(miRNA)(예를 들어, miR-133 또는 miR-206)의 표적 서열(target sequence)을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 마이크로RNA의 표적 서열은 변이된 CVB1의 지놈의 3' 비번역 부위(3'UTR)에 삽입된다.

[0138] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 외인성 핵산은 상술한 바와 같은 하나 또는 그 이상(예를 들어, 2, 3 또는 4)의 마이크로RNA의 표적 서열을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 외인성 핵산은 miR-133 및/또는 miR-206의 표적 서열을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, miR-133의 표적 서열은 서열번호 3에 나타나 있다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, miR-206의 표적 서열은 서열번호 4에 나타나 있다.

[0139] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1은 상술한 바와 같은 외인성 핵산의 적어도 하나의 삽입을 포함한다.

[0140] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1의 지놈 서열은 서열번호 13에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92 %, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1의 지놈 서열은 서열번호 13에 나타낸 뉴클레오타이드 서열이다.

[0141] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1의 cDNA 서열은 서열번호 8에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92 %, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1의 cDNA 서열은 서열번호 8에 나타낸 뉴클레오타이드 서열이다.

[0142] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 변이된 CVB1은 대상(subject)에서 종양을 치료하기 위해, 또는 종양을 치료하기 위한 약제를 제조하기 위해 사용된다.

[0143] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 대장암, 위암, 폐암, 간암, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 흑색종, 유방암, 신장암, 췌장암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신경교종, 신경아세포종, 설암, 비인두암, 비중격의 편평세포암종, 인두 편평세포암종, 악하선의 편평세포암종, 후두암, 갑상선암, 갑상선 관암종 및 방광암으로부터 선택된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 폐암, 식도암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암, 설암, 신장암, 전립선암, 비인두암, 및 방광암으로부터 선택된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 갑상

선암이다.

[0144] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 대상(subject)은 인간과 같은 포유동물이다.

[0145] 여섯 번째 양태에 따르면, 본 발명은 다음으로부터 선택되는 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다:

[0146] (1) 다섯 번째 양태에 기재된 바와 같은 변이된 CVB1의 지놈 서열 또는 cDNA 서열; 및

[0147] (2) 상기 지놈 서열 또는 cDNA 서열의 상보적 서열.

[0148] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 핵산 분자는 상술한 바와 같은 변이된 CVB1의 지놈 서열 또는 cDNA 서열, 또는 상기 지놈 서열 또는 cDNA 서열의 상보적 서열을 포함한다.

[0149] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 핵산 분자는 상술한 바와 같은 변이된 CVB1의 지놈 서열을 갖는다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 핵산 분자는 RNA이다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 핵산 분자는 서열번호 13에 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0150] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 핵산 분자는 본원에 기재된 바와 같은 변이된 CVB1의 지놈 서열 또는 cDNA 서열, 또는 상기 지놈 서열 또는 cDNA 서열의 상보적 서열을 포함하는 벡터(예를 들어, 클로닝 벡터 또는 발현 벡터)이다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 핵산 분자는 본원에 기재된 바와 같은 변이된 CVB1의 cDNA 서열, 또는 상기 cDNA 서열의 상보적 서열을 포함하는 벡터(예를 들어, 클로닝 벡터 또는 발현 벡터)이다.

[0151] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 핵산 분자는 변이된 CVB1의 지놈 서열의 상보적 서열을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 상보적 서열은 다음으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열과 상보적이다:

[0152] (1) 서열번호 13에 나타낸 뉴클레오타이드 서열; 및

[0153] (2) 서열번호 13에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열.

[0154] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 핵산 분자는 상술한 바와 같은 변이된 CVB1의 cDNA 서열의 상보적 서열을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 상보적 서열은 다음으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열과 상보적이다:

[0155] (1) 서열번호 8에 나타낸 뉴클레오타이드 서열; 및

[0156] (2) 서열번호 8에 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열.

[0157] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 핵산 분자는 대상(subject)에서 종양을 치료하기 위해, 또는 대상에서 종양을 치료하기 위한 약제를 제조하기 위해 사용된다.

[0158] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 대장암, 위암, 폐암, 간암, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 흑색종, 유방암, 신장암, 췌장암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신경교종, 신경아세포종, 설암, 비인두암, 비중격의 편평세포암종, 인두 편평세포암종, 악하선의 편평세포암종, 후두암, 갑상선암, 갑상선 관암종 및 방광암으로부터 선택된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 폐암, 식도암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암, 설암, 신장암, 전립선암, 비인두암, 및 방광암으로부터 선택된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 갑상선암이다.

[0159] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 대상은 인간과 같은 포유동물이다.

[0160] 일곱 번째 양태에 따르면, 본 발명은 다섯 번째 양태에 따른 변이된 CVB1, 또는 여섯 번째 양태에 따른 핵산 분자를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0161] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 의료 분야에 공지된 임의의 형태일 수 있다. 예를 들어, 상기 약제학적 조성물은 정제, 환제, 현탄액, 유제, 용액, 겔, 캡슐, 분말, 과립, 엘릭시르, 로렌지, 좌제, 주사(주사 용액, 동결 건조된 분말을 포함) 및 다른 형태일 수 있다. 일부 구현예에 있어서, 약제학적 조성물은 주사 용액 또는 동결 건조된 분말이다.

[0162] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로

포함한다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 안정제를 포함한다.

[0163] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 선택적으로 추가적인 약제학적 활성제를 추가로 포함한다. 바람직한 일 구현예에 있어서, 상기 추가적인 약제학적 활성제는 추가적인 항암 바이러스, 화학요법제 또는 면역요법제와 같은 항-종양 활성이 있는 약물이다.

[0164] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 대상(subject)에서 종양을 치료하기 위해 사용된다.

[0165] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 대장암, 위암, 폐암, 간암, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 흑색종, 유방암, 신장암, 췌장암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신경교종, 신경아세포종, 설암, 비인두암, 비중격의 편평세포암종, 인두 편평세포암종, 악하선의 편평세포암종, 후두암, 갑상선암, 갑상선 관암종 및 방광암으로부터 선택된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 폐암, 식도암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암, 설암, 신장암, 전립선암, 비인두암, 및 방광암으로부터 선택된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 갑상선암이다.

[0166] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 대상(subject)은 인간과 같은 포유동물이다.

[0167] 여덟 번째 양태에 따르면, 본 발명은 또한 대상(subject)에서 종양을 치료하기 위해, 또는 대상(subject)에서 종양을 치료하기 위한 약제를 제조하기 위해, 다섯 번째 양태에 따른 변이된 CVB1, 또는 여섯 번째 양태에 따른 핵산 분자의 용도에 관한 것이다.

[0168] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 대장암, 위암, 폐암, 간암, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 흑색종, 유방암, 신장암, 췌장암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신경교종, 신경아세포종, 설암, 비인두암, 비중격의 편평세포암종, 인두 편평세포암종, 악하선의 편평세포암종, 후두암, 갑상선암, 갑상선 관암종 및 방광암으로부터 선택된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 폐암, 식도암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암, 설암, 신장암, 전립선암, 비인두암, 및 방광암으로부터 선택된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 갑상선암이다.

[0169] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 대상(subject)은 인간과 같은 포유동물이다.

[0170] 아홉 번째 양태에 따르면, 본 발명은 또한 다섯 번째 양태에 기재된 변이된 CVB1의 유효량, 또는 여섯 번째 양태에 기재된 핵산 분자의 유효량을 이를 필요로 하는 대상(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0171] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 대장암, 위암, 폐암, 간암, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 흑색종, 유방암, 신장암, 췌장암, 림프종, 골육종, 전립선암, 신경교종, 신경아세포종, 설암, 비인두암, 비중격의 편평세포암종, 인두 편평세포암종, 악하선의 편평세포암종, 후두암, 갑상선암, 갑상선 관암종 및 방광암으로부터 선택된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 폐암, 식도암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암, 설암, 신장암, 전립선암, 비인두암, 및 방광암으로부터 선택된다. 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 종양은 갑상선암이다.

[0172] 특정 바람직한 구현예에 있어서, 상기 대상(subject)은 인간과 같은 포유동물이다.

발명의 효과

[0173] 본 발명의 유익한 효과

[0174] 종래의 기술과 비교하여, 본 발명의 기술적 해결책은 적어도 다음의 유익한 효과를 갖는다:

[0175] 본 출원의 발명자는 CVB1이 광범위한 스펙트럼의 종양 사멸 활성을 갖는다는 것을 처음으로 발견하였다. 이러한 발견을 기반으로, 본 발명은 또한 더 높은 종양 사멸 활성 및 종양 특이성을 갖는 CVB1을 기반으로 한 항암 바이러스를 추가로 제공하므로, 종양의 치료에 단독으로 사용될 수 있고, 또한 전통적인 종양 치료에 대한 보조 방법, 또는 다른 치료 방법이 없는 경우 치료 방법으로서 사용될 수 있다.

[0176] 본 발명에 따른 CVB1 또는 이의 변이형은 정상 세포에는 거의 또는 전혀 영향을 미치지 않고, 대상(subject)(예컨대, 인간)에게 안전하게 투여될 수 있다. 그러므로, 본 발명에 따른 CVB1 또는 이의 변이형은 높은 임상적 가치를 갖는다.

[0177] 본 발명의 구현예는 도면 및 실시예를 참조하여 아래에서 상세하게 기술될 것이지만, 당업자는 다음의 도면 및 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니라, 단지 본 발명을 설명하기 위해 사용된다는 것을 이해할 것이

다. 본 발명의 다양한 목적 및 이점은 다음의 도면의 상세한 설명 및 바람직한 실시예로부터 당업자에게 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0178] 도 1a 내지 1d는 인간 췌관 상피 세포주(human pancreatic ductal epithelial cell line) hTERT-HPNE, 인간 비인두암종 세포주(human nasopharyngeal carcinoma cell line) CNE, 인간 간암 세포주(human liver cancer cell line) HepG2, 인간 자궁내막암 세포주(human endometrial cancer cell line) Ishikawa, 인간 유방암 세포주(human breast cancer cell line) BT-474, 인간 비소세포폐암 세포주(human non-small cell lung cancer cell line) EBC-1, 인간 후두암 세포주(human laryngeal cancer cell line) HEp-2, 인간 설암 세포주(human tongue cancer cell line) SCC-25, 인간 대장암 세포주(human colorectal cancer cell line) HT-29, 인간 난소암 세포주(human ovarian cancer cell line) A2780, 인간 췌장암 세포주(human pancreatic cancer cell line) AsPC-1, 및 인간 전립선암 세포주(human prostate cancer cell line) DU145에 대한 야생형 CVB1의 실시예 2에서 in vitro 사멸 실험의 현미경 사진을 나타내며, MOCK은 바이러스에 감염되지 않은 세포를 나타낸다. 상기 결과는 1의 감염다중도(multiplicity of infection, MOI)로 감염 72 시간 후, CVB1이 인간 종양 세포주, CNE, HepG2, Ishikawa, BT-474, EBC-1, HEp-2, SCC-25, HT-29, A2780, AsPC-1 및 DU14에 대한 유의한 항암 효과를 보였으나, 인간 비-종양 세포 hTERT-HPNE에는 효과가 없었음을 나타낸다.

도 2는 실시예 2의 시험관내 전사(in vitro transcription) 방법에 의해 얻어진 야생형CVB1 바이러스 지놈 RNA(genomic RNA)의 한 개의 샘플의 전기영동도(electropherogram)를 나타낸다.

도 3은 실시예 2에서 야생형 CVB1 바이러스 지놈 RNA의 인간 자궁경부암 세포주 Hela에 대한 사멸 효과를 나타낸다. 결과는 CVB1 지놈 RNA에 감염된 Hela 세포가 감염 후 48 시간에 거의 완전하게 용해되었고(lysed) 죽었음을 나타낸다.

도 4a 내지 4i는 본 발명의 실시예 3에서 인간 유방암 세포주(human breast cancer cell line) BcaP37 (A), 인간 비소세포폐암 세포주(human non-small cell lung cancer cell line) A549 (B) 및 SPC-A-1 (C), 인간 버킷림프종 세포주(human Burkitt's lymphoma cell line) Raji (D), 인간 자궁내막암 세포주(human endometrial cancer cell line) Ishikawa (E) 및 HEC-1-B (F), 인간 자궁경부암 세포주(human cervical cancer cell line) Hela (G) 및 C-33A (H), 및 인간 신경교종 세포주(human glioma cell line) GBM (I)에 대한 야생형 CVB1의 in vivo 항-종양 실험의 결과를 나타낸다. 결과는 챌린지 실험군(challenge experiment group)에서, 종양 질량(tumor mass) 당 10^6 TCID50의 CVB1이 2일 마다 종양내로 주사되었음을 나타낸다. 총 5회 처리 후, SCID 마우스에서 BcaP37, A549, SPC-A-1, Raji, Ishikawa, HEC-1-B, Hela, C-33A 또는 GBM 세포의 피하 접종에 의해 형성된 종양의 성장이 유의하게 느려졌고 정지되었으며, 종양은 심지어 용해되었고 사라졌다. 대조적으로, 항암 바이러스를 처리하지 않은 음성 대조군(negative group, CTRL)의 종양은 정상적인 성장을 유지하였고, 이의 종양 부피는 챌린지 실험군의 종양 부피보다 유의하게 더 컸다.

도 5는 실시예 3에서 인간 신경교종 세포주 GBM에 대한 CVB1-WT, CVB1-HRV2, CVB1-miR133&206T, CVB1-GM-CSF, 및 CVB1-Anti-PD-1의 in vivo 항-종양 실험의 결과를 나타낸다. 결과는 챌린지 실험군에서, 종양 질량 당 10^6 TCID50의 CVB1 또는 이의 변이형이 2일 마다 종양내로 주사되었음을 나타냈다. 10일 동안 총 5회 처리 후, SCID 마우스에서 GBM 세포의 피하 접종에 의해 형성된 종양의 성장은 정지되었고, 종양은 심지어 용해되었고 사라졌다. 대조적으로, 항암 바이러스를 처리하지 않은 음성 대조군(CTRL)의 종양은 정상적인 성장을 유지하였고, 이의 종양 부피는 챌린지 실험군의 종양 부피보다 유의하게 컸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0179] 서열정보

[0180] 본 발명과 관련된 서열의 일부 정보를 다음의 표 1에 제공한다.

표 1

[0181] 서열 설명

서열번호	설명
1	야생형 CVB1(CVB1-WT)의 cDNA 서열

2	인간 라이노바이러스 2(HRV2)의 IRES(internal ribosome entry site)의 RNA 서열
3	miR-133 표적 서열의 RNA 서열
4	miR-206 표적 서열의 RNA 서열
5	miR-133 표적 서열 및 miR-206 표적 서열의 텐덤(tandem) 서열의 RNA 서열
6	인간 과립구-대식세포 콜로니-자극인자(GM-CSF) 유전자의 DNA 서열
7	항-PD-1 단쇄 항체(항-PD-1 scFv)의 DNA 서열
8	CVB1의 변이형(CVB1-HRV2)의 cDNA 서열
9	CVB1의 변이형(CVB1-miR133&206T)의 cDNA 서열
10	CVB1의 변이형(CVB1-GM-CSF)의 cDNA 서열
11	CVB1의 변이형(CVB1-Anti-PD1)의 cDNA 서열
12	야생형 CVB1(CVB1-WT)의 지놈 서열
13	CVB1의 변이형(CVB1-HRV2)의 지놈 서열
14	CVB1의 변이형(CVB1-miR133&206T)의 지놈 서열
15	CVB1의 변이형(CVB1-GM-CSF)의 지놈 서열
16	CVB1의 변이형(CVB1-Anti-PD1)의 지놈 서열
17	miR-133 표적 서열의 DNA 서열
18	miR-206 표적 서열의 DNA 서열
19	miR-133 표적 서열 및 miR-206 표적 서열의 텐덤(tandem) 서열의 DNA 서열
20	인간 라이노바이러스 2(HRV2)의 IRES(internal ribosome entry site) 서열의 DNA 서열

[0182] **발명을 실시하기 위한 구체적인 모델**

[0183] 본 발명은 이제 발명을 설명하고자 다음의 실시예를 참조로 하여 기술될 것이다(본 발명을 제한하기 위해서가 아님).

[0184] 달리 명시되지 않는 한, 본 발명에서 사용된 분자 생물학 실험 방법과 면역분석법은 대체로 J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 및 FM Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., 1995를 참조하였다. 제한 효소의 사용은 제조사가 권장하는 조건에 따랐다. 실시예에서 구체적인 조건이 기재되어 있지 않은 경우, 종래의 조건 또는 제조사가 권장하는 조건을 따라야 한다. 제조사에 의해 제공되지 않은, 사용된 시약 또는 기기는 모두 시판되는 종래의 제품이다. 당업자는 실시예가 일 예로서 본 발명을 설명하는 것이지, 본 발명의 청구된 범위를 제한하려는 것은 아님을 이해한다. 본원에 언급된 모든 출판물과 기타 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함되어 있다.

[0185] 실시예 1: CVB1 및 이의 변이형의 획득 및 제조

[0186] 1.1 환자의 검체로부터 엔테로바이러스 CVB1의 분리

[0187] (1) 중국 시아먼시(Xiamen City)의 질병 통제 및 예방 센터(Center for Disease Control and Prevention)로부터 환자의 인두 및 항문 면봉(swab)을 얻었고; 아프리카 녹색원숭이 신장 세포(African green monkey kidney cell)(Vero 세포; ATCC® 번호: CCL-81™)는 중국 시아먼 대학(Xiamen University)의 국립 감염병 진단(법) 및 백신 개발 협회(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases)에 보존되었고, 10% 소태아혈청(fetal bovine serum), 글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신이 보충된 MEM 배지에서 배양되었다.

[0188] (2) 샘플 처리: 면봉에 부착된 바이러스 및 바이러스-함유 세포를 씻어내기 위해서 환자의 인두 면봉 및 항문 면봉을 검체 보존 용액에서 충분히 교반한 다음, 검체 보존 용액을 4℃에서 30분 동안 고속 원심분리하였다;

[0189] (3) 접종 및 관찰:

[0190] A. Vero 세포는 1 X 10^5 세포/웰 씩 24-웰 플레이트(24-well plate)에 접종되었다. 성장 배지(MEM 배지, 10% 소태아혈청, 글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함)는 흡인되었고(aspirated), 1 mL의 유지 배지(MEM 배지, 2% 송아지태아혈청(fetal calf serum), 글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함)는 각 웰(well)에 첨가되었다. 그 후 음성대조군 웰(well)을 제외하고, 각 웰은 50 μL의 샘플 상층액으로 접종되었고, 37℃ 및 5% CO_2의 인큐베이터에서 배양되었다.

[0191] B. 세포는 일주일 동안 매일 현미경으로 관찰되었고, 접종된 웰에서 특정 세포변성 효과(cytopathic effect, CPE)의 발생이 기록되었다.

[0192] C. 7일 이내에 접종된 웰(well)의 세포에서 엔테로바이러스-특이적 세포변성 효과가 세포에서 발생하는 경우, 세포와 상층액을 모아 -80℃에서 얼렸고; 7일 후에 CPE가 발생하지 않은 경우, 세포는 블라인드 계대배양(blind passage)되었다.

[0193] D. 여섯 번의 블라인드 계대배양 이내에 CPE가 발생하는 경우, 세포와 상층액을 모아 -80℃에서 얼렸고; 여섯 번의 블라인드 계대배양 후에도 CPE가 발생하지 않는 경우, 세포는 음성(negative)으로 결정되었다.

[0194] (4) 바이러스 분리 및 클로닝:

[0195] 검체로부터 분리된 바이러스는 RT-PCR(Hou et al., Virus Res 2015, 205: 41-44)과 특정 항체-기반 고착화효소 항체법(specific antibody-based enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT)(Yang et al. Clin Vaccine Immunol 2014, 21(3): 312- 320)에 의해 확인되었고, 콕삭키바이러스 B1 양성 배양을 선택하여 적어도 3회의 클로닝 실험을 하였다. 각 실험에서 한계희석법(limiting dilution method)에 의해 얻어진 바이러스 클론은 또한 RT-PCR 및 ELISPOT에 의해 확인되었고, 콕삭키바이러스 B1 양성 클론을 선택하여 다음 번의 클로닝을 하였다. 강력한 성장 생존 능력을 가진 콕삭키바이러스 B1의 단일 균주는 후보 항암 바이러스 균주로서 선택되었다.

[0196] 1.2 감염성 클로닝(infectious cloning) 및 역유전학 기술(reverse genetics technology)을 기반한 CVB1 및 이의 변이형의 구조 균주(rescued strain)의 획득

[0197] 본 실시예는 역유전학 기술에 의한 본 발명에서 사용된 CVB1 및 이의 변이형을 얻는 방법을 나타내는 일 예로서 야생형 CVB1(서열번호 1)을 사용하였다. 상세한 방법은 다음과 같다.

[0198] (1) 바이러스성 감염성 클론(viral infectious clone)의 구축: 야생형 CVB1(CVB1-WT로 명명)의 cDNA 서열을 서열번호 1에 나타냈고, 이의 지놈 RNA 서열을 서열번호 12에 나타냈다; 또는 유전자 삽입 또는 대체는 야생형 CVB1(서열번호1)의 cDNA를 기반으로 하였고, 다음을 포함한다:

[0199] 변이형 1: 서열번호 13에 나타낸 지놈 RNA 서열을 갖는, 재조합 바이러스(CVB1-HRV2로 명명)의 cDNA(서열번호 8)을 얻기 위해서, 야생형 CVB1의 IRES(internal ribosome entry site) 서열은 인간 라이노바이러스 2(서열번호 20에 나타낸 DNA 서열을 가짐)의 IRES 서열로 대체되었다;

[0200] 변이형 2: 서열번호 14에 나타낸 지놈 RNA 서열을 갖는, 재조합 바이러스(CVB1-miR133&206T로 명명)의 cDNA(서열번호 9)를 얻기 위해서, miR-133 표적 서열(서열번호 17에 나타낸 DNA 서열을 가짐) 및 miR-206 표적 서열(서열번호 18에 나타낸 DNA 서열을 가짐)의 텐덤 서열(서열번호 19에 나타낸 DNA 서열을 가짐)은 야생형 CVB1의 cDNA(서열번호 1)의 3' 비번역 부위의 7303 bp 내지 7304 bp 사이에 삽입되었다;

[0201] 변이형 3: 서열번호 15에 나타낸 지놈 RNA 서열을 갖는, 재조합 바이러스(CVB1-GM-CSF로 명명)의 cDNA(서열번호 10)를 얻기 위해서, 인간 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 유전자(서열번호 6)는 야생형 CVB1의 cDNA(서열번호 1)의 VP1 유전자 및 2A 유전자 사이에 삽입되었다;

[0202] 변이형 4: 서열번호 16에 나타낸 지놈 RNA 서열을 가진, 재조합 바이러스(CVB1-Anti-PD-1로 명명)의 cDNA(서열번호 11)를 얻기 위해서, 항-PD-1 scFv(single chain antibody against human programmed death receptor 1)를 인코딩하는 서열(서열번호 7)은 야생형 CVB1의 VP1 유전자 및 2A 유전자 사이에 삽입되었다.

[0203] 상기 다섯 가지의 항암 바이러스의 cDNA 서열(서열번호 1, 8 내지 11)은 전체 유전자 합성을 위해 유전자 합성 회사(Shanghai Shenggong Bioengineering Co., Ltd.)로 보내졌으며, pSVA 플라스미드(Hou et al. Human, Virus Res 2015, 205: 41-44)에 라이게이션(ligation)되어, CVB1 또는 이의 변이형(즉, CVB1-WT, CVB1-HRV2, CVB1-miR133&206T, CVB1-GM-CSF 및 CVB1-Anti-PD-1)의 감염성 클로닝 플라스미드를 얻었다.

[0204] (2) 플라스미드 미니-키트와 *E coli.* DH5α 수용성 세포(competent cell)를 Beijing Tiangen Biochemical Technology 유한 회사에서 구매하였다; Hela 세포(ATCC® 번호: CCL-2™) 및 인간 횡문근육종 세포(rhabdomyosarcoma cell, RD 세포; ATCC® 번호: CCL-136™)는 중국 시아먼 대학의 국립 감염병 진단(법) 및 백신 개발 협회에서 관리되었으며, 10% 소태아혈청, 글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신을 첨가한, DMEM 및 MEM 배지에서 각각 배양되었다; 형질감염(transfection) 시약인 Lipofactamine2000과 Opti-MEM을 Thermo Fisher Scientific 회사로부터 구매하였다.

[0205] (3) 상기 다섯 가지의 항암 바이러스의 cDNA 서열을 포함하는 감염성 클로닝 플라스미드는 *E coli* DH5α 수용성 세포로 형질전환되었고, 클론의 성장(outgrowth) 후 단일 클론 균주(monoclonal strain)를 골라내어 진탕(shaken)시켰으며, 플라스미드는 플라스미드 미니-키트를 이용하여 추출되었고, 그 후 서열 분석을 위해 회사(Shanghai Biotech Engineering Co., Ltd.)로 보내졌다.

[0206] (4) 바이러스로 구조(rescue)하기 위해서 정확한 서열을 갖는 감염성 클로닝 플라스미드 및 헬퍼 플라스미드(helper plasmid) pAR3126는 세포에 공동-형질감염(co-transfection)되었다(Hou et al. Virus Res 2015, 205: 41-44). 먼저 Hela 세포는 형질감염 시약의 지시 사항에 따라 형질감염되었고; 그 후 현미경으로 관찰되었다. Hela 세포에 CPE가 발생했을 때, 세포 및 배양 상층액은 수확되었고, RD 세포로 접종되었으며, 그 다음 계대 및 배양을 하였다. 이렇게 얻어진 구조 균주(rescued strain)는 항암 바이러스의 후보 균주로서 사용될 수 있다.

[0207] 실시예 2: CVB1 및 이의 변이형의 in vitro 항-종양 실험

[0208] 2.1 사용된 바이러스 및 세포주

[0209] (1) 바이러스: 본 실시예에서, 실시예 1에서 제공된 CVB1-WT(서열번호 12), CVB1-HRV2(서열번호 13), CVB1-miR133&206T(서열번호 14), CVB1-GM-CSF(서열번호 15) 및 CVB1-Anti-PD-1(서열번호 16)과 야생형 콕삭키바이러스 B 유형 3(이하에서 다음과 같이 명명: CVB3-WT; GenBank 데이터베이스 수탁 번호: KY286529.1)의 균주가 사용되었다.

[0210] (2) 세포주: 인간 횡문근육종 세포(human rhabdomyosarcoma cell) RD(ATCC® 번호: CCL-136™); 인간 대장암 세포주(human colorectal cancer cell line) SW1116(ATCC® 번호: CCL-233™), SW480(ATCC® 번호: CCL-228™) 및 HT-29(ATCC® 번호: HTB-38™); 인간 위암 세포주(human gastric cancer cell line) AGS(ATCC® 번호: CRL-1739™), SGC7901(CCTCC 기탁 번호: GDC150), BGC823(CCTCC 기탁 번호: GDC151) 및 NCI-N87(ATCC® 번호: CRL-5822™); 인간 식도암 세포주(human esophageal cancer cell line) TE-1(중국과학원 산하 상하이생물학연구단 소속 세포자원센터(Cell Resource Center, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences)로부터 구매함, 번호 3131C0001000700089); 인간 소세포폐암 세포주(human small cell lung cancer cell line) DMS114(ATCC® 번호: CRL-2066™); 인간 비소세포폐암 세포주(human non-small cell lung cancer cell line) SPC-A-1(CCTCC 기탁 번호: GDC050), NCI-H1975(ATCC® 번호: CRL-5908™), NCI-H1299(ATCC® 번호: CRL-5803™), A549(ATCC® 번호: CCL-185™), NCI-H661(ATCC® 번호: HTB-183™), EBC-1(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호: 11875101) 및 NCI-H1703(ATCC® 번호: CRL-5889™); 인간 간암 세포주(human liver cancer cell line) C3A(ATCC® 번호: CRL-10741™), HepG2(ATCC® 번호: HB-8065™), SMMC7721(중국의과학원 산하 기초의과학연구단 소속 기초의학세포센터(Basic Medical Cell Center, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences)로부터 구매함, 번호: 3111C0001CCC000087), BEL7402(CCTCC 기탁 번호: GDC035), BEL7404(중국과학원 산하 상하이생물학연구단 소속 세포자원센터로부터 구매함, 번호: 3131C0001000700064), Huh7(CCTCC 기탁 번호: GDC134) 및 PLC/PRF/5(ATCC® 번호: CRL-8024™); 인간 난소암 세포주(human ovarian cancer cell line) SKOV3(ATCC® 번호: HTB-77™) 및 Caov3(ATCC® 번호: HTB-75™); 인간 자궁내막암 세포주(human endometrial cancer cell line) Hec-1-A(ATCC® 번호: HTB-112™), Hec-1-B(ATCC® 번호: HTB-113™) 및 Ishikawa(ECACC 번호 99040201); 인간 자궁경부암 세포주(human cervical cancer cell line) Hela(ATCC® 번호: CCL-2™), Caski(ATCC® 번호: CRL-1550™) 및 C-33A(ATCC® 번호: HTB-31™); 인간 흑색종 세포주(human melanoma cell line) SK-MEL-1(ATCC® 번호: HTB-67™) 및 MeWo(ATCC® 번호: HTB-65™); 인간 유방암 세포주(human breast cancer cell line) BcaP37(CCTCC 기탁 번호: GDC206), BT-474(ATCC® 번호: HTB-20™) 및 MDA-MB-231(ATCC® 번호: HTB-26™); 인간 신장암 세포주(human kidney cancer cell line) A-498(ATCC® 번호: HTB-44™) 및 786-O(ATCC® 번호: CRL-1932™); 인간 췌장암 세포주(human pancreatic cancer cell line) Capan-2(ATCC® 번호: HTB-80™), AsPC-1(ATCC® 번호: CRL-1682™), SW1990(ATCC® 번호: CRL-2172™), HPAF-2(ATCC® 번호: CRL-1997™) 및 CFPAC-1(ATCC® 번호: CRL-1918™); 인간 골육종 세포주(human osteosarcoma cell line) U2OS(ATCC® 번호: HTB-96™); 인간 전립선암 세포주(human prostate cancer cell line) DU145(ATCC® 번호: HTB-81™) 및 LNCap(ATCC® 번호: CRL-1740™); 인간 신경교종 세포주(human neuroglioma cell line) GBM(환자 종양 조직으로부터 분리된 원발성 종양 세포주(primary tumor cell line)); 인간 신경아세포종 세포주(human neuroblastoma cell line) SH-SY5Y(ATCC® 번호: CRL-2266™); 인간 혀 편평상피암 세포주(human tongue squamous carcinoma cell line) CAL27(ATCC® 번호: CRL-2095™) 및 SCC-25(ATCC® 번호: CRL-1628™); 인간 비인두암종 세포주(human nasopharyngeal carcinoma cell line) CNE(중국의과학원 산하 기초의과학연구단 소속 기초의학세포센터로부터 구매함, 번호: 3131C0001000700013); 인간 비중격 편평세포암종 세포주(human nasal septum squamous cell carcinoma cell

line) RPMI 2650(ATCC® 번호: CCL-30™); 인간 후두암 세포주(human laryngeal carcinoma cell line) HEp-2(ATCC® 번호: CCL-23™); 인간 갑상선암 세포주(human thyroid cancer cell line) SW579(국립 공학연구센터 감염병 진단 시약 및 백신 연구단(National Engineering Research Center for Diagnostic Reagents and Vaccines for Infectious Disease)에 보존됨) 및 인간 갑상선 관암종 세포주(human thyroid ductal carcinoma cell line) TT(ATCC® 번호: CRL-1803™); 인간 방광암 세포주(human bladder cancer cell line) J82(ATCC® 번호: HTB-1™) 및 5637(ATCC® 번호: HTB-9™); 인간 버킷림프종 세포주(human Burkitt's lymphoma cell line) Daudi(ATCC® 번호: CCL-213™) 및 Raji(ATCC® 번호: CCL-86™); 다음을 포함하는 인간 정상 세포주(human normal cell line): 인간 췌관 상피 세포주(human pancreatic ductal epithelial cell line) hTERT-HPNE(ATCC® 번호: CRL-4023™), 인간 피부 케라틴세포 세포주(human skin keratinocyte cell line) HaCat(CCTCC, 기탁 번호: GDC106), 인간 배아 폐 섬유아세포 세포주(human embryonic lung fibroblast cell line) MRC-5(ATCC® 번호: CCL-171™), 인간 포피 섬유아세포 세포주(human foreskin fibroblast cell line) HFF-1(ATCC® 번호: SCRC-1041™), 인간 전립선 기질 세포주(human prostate stromal cell line) WPMY-1(ATCC® 번호: CRL-2854™), 인간 제대정맥 내피 세포주(human umbilical vein endothelial cell line) HUVEC(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호: C01510C) 및 분화된 인간 간 전구세포 세포주(human liver progenitor cell line) HepaRG(1차 간세포의 특징을 가짐; Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호: HPRGC10). 상기 세포들은 중국 시아먼 대학의 국립 감염병 진단(법) 및 백신 개발 협회에 의해 보존되었다. HepaRG 세포는 WME 배지(1.5% DMSO가 첨가됨)에서 배양되었다; AGS 및 TT는 F-12K 배지에서 배양되었다; SH-SY5Y는 DMEM:F12(1:1) 배지에서 배양되었다; CFPAC-1는 IMDM 배지에서 배양되었다; RD, C-33A, EBC-1, SK-MEL-1, J82 및 DU145는 MEM 배지에서 배양되었다; Raji, Daudi, 5637, 786-O, TE-1, Caski, NCI-H1299, NCI-H1703, NCI-H1975, NCI-H661, SGC7901, BGC823, SW1116, HEp-2 및 LNCap는 RPMI-1640 배지에서 배양되었다; 그리고 다른 세포는 DMEM 배지에서 배양되었다. 이러한 배지는 모두 10% 소태아혈청, 글루타민 및 페니실린-스트렙토마이신으로 보충되었다. 상기 모든 세포는 37℃ 및 5% CO_2의 표준 조건 하에서 배양되었다.

[0211] 2.2 바이러스 배양

[0212] RD 세포는 10% 소태아혈청, 글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 MEM 배지와 37℃, 5% CO_2, 및 포화된 습도의 배양 조건 하에서 10 cm 세포 배양 플레이트에 균일하게 접종되었다. 세포 밀집도(cell confluence)가 90% 또는 그 이상에 도달하면, 세포 배양 배지는 무-혈청(serum-free) MEM 배지로 교체되었고, 각 플레이트는 CVB1-WT, CVB1-HRV2, CVB1-miR133&206T, CVB1-GM-CSF 또는 CVB1-Anti-PD-1의 10^7 TCID50로 접종되었다. 24 시간의 연속적인 배양 후, CVB1 또는 이의 변이형은 RD 세포에서 증식했고 세포에서 CPE를 유발하였다. 90% 이상의 세포가 수축되고 둥글게 변하고, 증가된 입자성(graininess)을 나타내고, 분리되고 용해될(lysed) 때, 세포와 이의 세포 상층액을 거둬들였다. 3회 주기의 동결-해동(freeze-thawing) 후, 세포 찌꺼기(cell debris)를 제거하기 위해 배양 상층액을 모아, 4000 rpm, 10분, 및 4℃의 원심분리 조건으로 원심분리하였다. 마지막으로, 상층액은 세포 찌꺼기 및 다른 불순물을 제거하기 위해 0.22 μm 일회용 필터(Millipore)로 여과하였다.

[0213] 2.3 바이러스 역가(titer) 결정

[0214] RD 세포는 10^4 세포/웰의 세포 밀도로 96-웰 플레이트에 접종되었다. 세포가 부착된 후, 실시예 2.2에서 얻은 바이러스 용액은 무-혈청 MEM 배지로 10배에서 시작해 10배 구배로 희석되었다. 희석된 바이러스 50 μl는 세포가 들어 있는 웰에 첨가되었다. 7일 후, CPE가 발생한 웰은 모니터링되었고 기록되었으며, 그 다음 Karber 법을 이용하여 계산하였고, 계산 식은 lg^{TCID50} = L - D (S-0.5), L: 최대 희석의 로그, D: 희석의 로그 사이의 차이, S: 양성 웰의 비율의 합이다. 따라서 계산된 TCID50의 단위는 TCID50/50μl이며, TCID50/ml으로 변환되어야 한다.

[0215] 2.4 바이러스의 in vitro 항-종양 실험

[0216] 인간 종양 세포 및 정상 세포는 웰(well) 당 10^4씩 96-웰 플레이트에 접종되었다. 세포가 부착된 후, 각 웰의 배지는 혈청이 없는 해당 세포 배양 배지로 교체되었고, 바이러스는 각각 10, 1, 0.1 및 0.01의 MOI로 접종되었다. 그 후, 세포의 CPE는 현미경에 의해 매일 모니터링되었다.

[0217] 도 1a 내지 1d는 바이러스에 감염되지 않았거나(음성 대조군, Mock), 또는 72 시간 동안 MOI = 1의 CVB1-WT가 처리된, 인간 췌관 상피 세포주 hTERT-HPNE, 인간 비인두암종 세포주 CNE, 인간 간암 세포주 HepG2, 인간 자궁

내막암 세포주 Ishikawa, 인간 유방암 세포주 BT-474, 인간 비소세포폐암 세포주 EBC-1, 인간 후두암 세포주 HEp-2, 인간 설암 세포주 SCC-25, 인간 대장암 세포주 HT-29, 인간 난소암 세포주 A2780, 인간 췌장암 세포주 AsPC-1 및 인간 전립선암 세포주 DU145의 현미경사진을 나타낸다. 결과는 1의 MOI(multiplicity of infection)로 감염 72시간 후, 종양 세포 수의 유의한 감소, 현저한 수축(shrinking) 및 용해(lysis) 등이 바이러스-감염 군에서 발견되었음을 나타냈다; 반면에 Mock 그룹에서 비-종양 세포와 비교하여, 바이러스에 감염된 비-종양 세포는 세포 형태에 거의 변화가 없었다. 결과는 CVB1이 인간 비인두암 세포주 CNE, 인간 간암 세포주 HepG2, 인간 자궁내막암 세포주 Ishikawa, 인간 유방암 세포주 BT-474, 인간 비소세포폐암 세포주 EBC-1, 인간 후두암 세포주 HEp-2, 인간 설암 세포주 SCC-25, 인간 대장암 세포주 HT-29, 인간 난소암 세포주 A2780, 인간 췌장암 세포주 AsPC-1 및 인간 전립선암 세포주 DU145에 대한 유의한 항암 효과를 보였으나, 인간 췌관 상피 세포주 hTERT-HPNE와 같은 비-종양 세포에는 효과가 없었음을 나타냈다.

[0218] 바이러스 감염 및 배양 72시간 후, 세포 생존율을 측정하기 위해 Cell Counting Kit-8(CCK-8 kit; Shanghai Biyuntian Biotechnology Co., Ltd.)이 사용되었다. 상세한 방법은 다음과 같다:

[0219] 부착성 세포(adherent cell)의 경우, 96-웰 세포 배양 플레이트에서 원래 배지는 바로 버렸다; 부유성 세포(suspension cell)의 경우, 96-웰 세포 배양 플레이트에서 원래 배지는 원심분리 후 조심히 버렸다; 그리고 그 후 100 μl의 신선한 무-혈청 배지를 각 웰에 첨가하였다. 10 μl의 CCK-8 용액은 세포가 접종된 각 웰에 첨가되었고, 음성 대조군으로서 동량의 CCK-8 용액은 또한 빈(blank) 배양 배지에 첨가되었으며, 그 다음 0.5 내지 3 시간 동안 세포 배양 인큐베이터에서 37℃로 배양하였다. 흡광도(absorbance)는 마이크로플레이트 판독기(microplate reader)를 이용하여 450 nm에서 0.5, 1, 2, 3 시간에 각각 측정되었으며, 흡광도가 적정 범위 이내인 시점이 세포 생존율에 대한 기준으로 선택되었다. 각 종류의 세포에 대한 CVB1-WT의 CCK-8 테스트 결과는 표 2에 나타냈고, "-"는 바이러스 처리 후 세포 생존율이 MOCK 그룹과 유의한 차이가 없음을 나타냈으며; "+"는 바이러스 처리 후, 세포 수가 감소되었고, 생존율은 여전히 50% 이상이지만 MOCK 그룹과 유의한 차이가 있음을 나타냈고; "++"는 바이러스 처리 후 세포 생존율이 50% 미만이고, MOCK 그룹과 유의한 차이가 있음을 나타냈다.

[0220] 세포 생존율의 계산식은 다음과 같다:

[0221]
$$\text{세포 생존율}(\%) = \frac{(\text{테스트 그룹의 판독값(reading)} - \text{음성 그룹의 판독값(reading)})}{(\text{양성 그룹의 판독값(reading)} - \text{음성 그룹의 판독값(reading)})} \times 100\%.$$

표 2

[0222] CVB1-WT의 in vitro 항-종양 테스트의 결과

세포주 \ MOI	10	1	0.1	0.01
RD	++	++	++	+
SW1116	++	++	++	+
SW480	++	++	++	++
HT29	++	++	++	++
AGS	++	++	++	++
SGC7901	++	++	++	+
BGC823	++	++	++	++
NCI-N87	++	++	++	-
TE-1	++	++	++	+
DMS114	++	++	++	++
SPC-A-1	++	++	++	++
NCI-H1975	++	++	++	+
NCI-H1299	++	++	++	++
A549	++	++	++	+
NCI-H661	++	++	++	++
EBC-1	++	++	++	++
NCI-H1703	++	++	++	+
C3A	++	++	++	++
HepG2	++	++	++	++
SMMC7721	++	++	++	++

BEL7404	++	++	++	++
BEL7402	++	++	++	++
Huh7	++	++	++	++
PLC/PRF/5	++	++	++	++
SKOV3	++	++	+	-
CaOV3	++	++	++	-
HEC-1-A	++	++	++	+
HEC-1-B	++	++	++	++
Ishikawa	++	++	++	++
Hela	++	++	++	++
CaSki	++	++	++	++
C-33A	++	++	++	++
SK-MEL-1	++	++	++	+
MeWo	++	++	+	-
BcaP37	++	++	++	++
BT-474	++	++	++	++
MDA-MB-231	++	++	+	-
A498	++	++	++	+
786-O	++	++	+	-
Capan-2	++	++	+	-
HPAF-2	++	++	+	+
AsPC-1	++	++	++	++
SW1990	++	++	++	+
CFPAC-1	++	++	++	+
U2OS	++	+	-	-
DU145	++	++	++	++
LNCap	++	++	++	+
GBM	++	++	++	++
SH-SY5Y	++	++	++	++
CAL27	++	++	++	+
SCC-25	++	++	++	++
CNE	++	++	++	+
RPMI 2650	++	++	+	+
HEp-2	++	++	++	++
TT	++	++	++	-
SW579	++	+	-	-
J82	++	+	-	-
5637	++	++	++	++
Daudi	++	++	+	-
Raji	++	++	+	-
hTERT-HPNE	+	-	-	-
differentiated RG	+	-	-	-
Hacat	-	-	-	-
MRC-5	-	-	-	-
HFF-1	-	-	-	-
wpmy-1	-	-	-	-
HUVEC	-	-	-	-

[0223] 주: "-"는 바이러스 처리 그룹 및 MOCK 그룹 간의 세포 생존율이 유의한 차이가 없음을 나타냈다; "+"는 바이러스 처리 후, 세포 수가 감소하였고, 생존율이 50% 이상이지만 MOCK 그룹과 유의한 차이가 있음을 나타냈다; "++"는 바이러스 처리 후 세포 생존율이 50% 미만이고, MOCK 그룹과 유의한 차이가 있음을 나타낸다.

[0224] CVB1-WT가 대부분의 관측된 종양 세포에 대한 사멸 효과가 있음을 표 2로부터 알 수 있다. 특히, 상기 바이러스는 대장암 세포주, 위암 세포주, 폐암 세포주, 간암 세포주, 자궁경부암 세포주, 자궁내막암 세포주, 췌장암 세포주, 전립선암 세포주, 비인두암 세포주, 설암 세포주, 후두암 세포주, 신경교종 세포주 및 신경아세포종 세포주에 대한 유의한 사멸 효과를 갖는다. 한편, 상기 바이러스는 인간 배아 폐 섬유아세포 세포주 MRC-5, 인간 포피 섬유아세포 세포주 HFF-1, 인간 피부 케라틴세포 세포주 HaCat, 인간 전립선 기질 세포주 WPMY-1, 및 인간

제대정맥 내피 세포주 HUVEC를 포함하는, 테스트된 비-종양 세포주에 실질적으로 비-독성이었으며, 예외적으로 인간 정상 췌관 상피 세포주 hTERT-HPNE 및 분화된 인간 간 전구세포 세포주 HepaRG에는 MOI=10에서 특정한 독성을 갖는다.

[0225] 특히 주목할 만한 점은 콕삭키바이러스에 속하는, CVB1-WT 및 야생형 콕삭키바이러스 B 유형 3 균주(CVB3-WT; GenBank 데이터베이스 수탁 번호: KY286529.1)가 특정 종양에 대한 특정 사멸 활성을 갖는다고 보고되어 있을지라도, 이 둘 사이의 유전체-전반 뉴클레오타이드 상동성(homology)은 72.8%에 불과하였고, 코딩 영역의 뉴클레오타이드 상동성은 71%에 불과하였으므로, 즉, 이들은 2개의 완전히 상이한 바이러스라는 것이다. 특히, 본 발명자는 상이한 종류의 종양 세포에 대한 CVB1-WT 및 CVB3-WT의 사멸 효능을 비교함으로써(표 3), CVB1이 CVB3과 비교하여 적어도 10배, 또는 심지어 100배의 대부분의 관측된 종양 세포에 대한 사멸 활성을 갖고, 유의하게 보다 우수한 종양 사멸 효과를 갖는다는 것을 발견하였다. 이로부터 본 발명의 CVB1이 보다 강력한 항-종양 활성을 상대적으로 낮은 투여량에서 생산할 수 있어, 투여의 안정성을 크게 향상시키면서 동시에 치료 효능은 보장할 수 있으므로, 항-종양 치료에 특히 적합하다는 것을 알 수 있다.

표 3

CVB1-WT 및 CVB3-WT의 in vitro 항-종양 테스트의 결과 비교

세포주		CVB1-WT				CVB3-WT				효능 배수 (EC50 ratio)
		MOI			EC50 (MOI)	MOI			EC50 (MOI)	
		1	0.1	0.01		1	0.1	0.01		
폐암 세포주	NCI-H1975	++	++	+	0.02	++	-	-	0.97	48.5
	A549	++	++	+	0.02	++	+	+	0.82	41
	EBC-1	++	++	++	<0.01	++	++	+	0.08	>8
	NCI-H1703	++	++	+	0.03	++	+	+	0.89	29.6
식도암 세포주	TE-1	++	++	+	0.04	+	-	-	15.23	380.75
난소암 세포주	CaOV3	++	++	-	0.03	++	+	-	0.78	26
자궁내막암 세포주	HEC-1-A	++	++	+	0.05	+	-	-	13.34	266.8
췌장암 세포주	Capan-2	++	+	-	0.08	-	-	-	>10	>125
	AsPC-1	++	++	++	<0.01	++	+	-	0.96	>96
	SW1990	++	++	+	0.02	++	+	-	0.82	41
	CFPAC-1	++	++	+	0.03	+	-	-	25.71	857
설암 세포주	CAL27	++	++	+	0.03	+	-	-	17.20	573.3
	SCC-25	++	++	++	<0.01	++	+	-	0.78	>78
신장암 세포주	786-O	++	+	-	0.05	+	-	-	17.84	356.8
전립선암 세포주	DU145	++	++	++	<0.01	++	++	+	0.05	>5
비인두암 세포주	CNE	++	++	+	0.03	++	+	-	0.88	29.33
방광암 세포주	5637	++	++	++	<0.01	++	+	-	0.53	53

[0226]

[0227] 주: "-"는 바이러스 처리 그룹과 MOCK 그룹 간의 세포 생존율이 유의한 차이가 없음을 나타낸다; "+"는 바이러스 처리 후, 세포 수가 감소하였고, 세포 생존율이 50% 이상이지만 MOCK 그룹과 유의한 차이가 있음을 나타낸다; "++"는 바이러스 처리 후 세포 생존율이 50% 미만이고, MOCK 그룹과 유의한 차이가 있음을 나타낸다; EC50는 유효 투여량의 절반으로, 본원에서 세포 생존율이 50%로 떨어지는 바이러스의 MOI를 의미한다; 효능 배수(potency multiple)는 본원에서 특정 세포에 대한 CVB1 및 CVB3의 항암 효능의 배수, 즉, EC50 비율(ratio)을 의미한다.

[0228] 게다가, CVB1-miR133&206T, CVB1-GM-CSF 및 CVB1-Anti-PD-1의 in vitro 항-종양 실험의 결과는 위에서 언급한 CVB1의 변이형 모두가 관측된 종양 세포에 대한 야생형 CVB1의 모균주(parental strain)의 사멸 효과를 유지하였고, 대장암 세포주, 위암 세포주, 폐암 세포주, 간암 세포주, 자궁경부암 세포주, 자궁내막암 세포주, 췌장암

세포주, 전립선암 세포주, 비인두암 세포주, 설암 세포주, 후두암 세포주, 신경교종 세포주, 및 신경아세포종 세포주에 대한 야생형 CVB1의 모균주의 유의한 사멸 효과를 유지하였음을 나타냈고, 인간 대장암 세포주 SW480, 인간 위암 세포주 AGS, 인간 자궁내막암 세포주 Ishikawa 및 인간 신경교종 세포주 GBM에 대한 항암 활성의 CCK-8 관측 결과는 표 4에 나타내었다.

[0229] CVB1-WT는 약한 사멸 활성을 보였던 일부 종양 세포에 대해 CVB1-HRV2가 유의한 사멸 활성을 갖는다는 것은 특히 주목할 가치가 있고, 상당히 유익한 기술적 효과를 가져온다; 인간 갑상선암 세포주 SW579에 대한 항암 활성의 CCK-8 측정 결과는 표 5에 나타내었다.

표 4

[0230] CVB1-miR133&206T, CVB1-GM-CSF 및 CVB1-Anti-PD-1의 in vitro 항-종양 테스트의 결과

MOI / 세포주		10	1	0.1	0.01
CVB1-miR133&206T	SW480	++	++	++	++
	AGS	++	++	++	++
	Ishikawa	++	++	++	++
	GBM	++	++	++	++
CVB1-GM-CSF	SW480	++	++	++	++
	AGS	++	++	++	++
	Ishikawa	++	++	++	++
	GBM	++	++	++	++
CVB1-Anti-PD-1	SW480	++	++	++	++
	AGS	++	++	++	++
	Ishikawa	++	++	++	++
	GBM	++	++	++	++

[0231] 주: "-"는 바이러스 처리 그룹과 MOCK 그룹 간의 세포 생존율이 유의한 차이가 없음을 나타낸다; "+"는 바이러스 처리 후, 세포 수가 감소하였고, 생존율이 50% 이상이지만 MOCK 그룹과 유의한 차이가 있음을 나타낸다; "++"는 바이러스 처리 후 세포 생존율이 50%이고, MOCK 그룹과 유의한 차이가 있음을 나타낸다.

표 5

[0232] 인간 갑상선암 세포주 SW579에 대한 CVB1-WT 및 CVB1-HRV2의 in vitro 항암 테스트의 결과 비교

MOI / 세포주	10	1	0.1	0.01
CVB1-WT	++	+	-	-
CVB1-HRV2	++	++	++	+

[0233] 주: "-"는 바이러스 처리 그룹과 MOCK 그룹 간의 세포 생존율이 유의한 차이가 없음을 나타낸다; "+"는 바이러스 처리 후, 세포 수가 감소하였고, 생존율이 50% 이상이지만 MOCK 그룹과 유의한 차이가 있음을 나타낸다; "++"는 바이러스 처리 후 세포 생존율이 50% 미만이고, MOCK 그룹과 유의한 차이가 있음을 나타낸다.

[0234] 2.5 적응(adaptation)을 위한 CVB1의 연속 계대(serial passaging)

[0235] 본 실시예에서, CVB1은 특정 종양 세포에서 적응(adaptation)을 위하여 연속적으로 계대 배양되어 종양 세포에 대한 향상된 사멸 활성을 가진 균주를 얻었다.

[0236] CVB1의 항암 효과가 그다지 유의하지 않았던 인간 골육종 세포주 U2OS, 인간 갑상선암 세포주 SW579 및 인간 방광암 세포주 J82에서 적응을 위하여 야생형 엔테로바이러스 CVB1은 연속적으로 계대 배양되었다. 상세한 방법은 다음과 같았다:

[0237] 상기 종양 세포 중 한 종류는 10 cm 세포 배양 플레이트에 균일하게 접종되었고, 배양 조건은 10% 소태아혈청,

글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 해당 세포 배양 배지와, 37℃, 5% CO_2, 포화된 습도였다. 세포 밀집도(cell confluence)가 90% 또는 그 이상에 도달했을 때, 세포 배양 배지는 무-혈청 세포 배양 배지로 교체되었고, 각 플레이트는 10^7 TCID50의 CVB1 바이러스로 접종되었으며, 배양 환경은 33℃, 5% CO_2, 포화된 습도로 바꿨다. CVB1이 종양 세포에서 증식하여 세포에서 CPE를 유발했을 때(감염 후 최대 3일 동안), 세포와 이의 배양 상층액을 거둬들였다. 3회 사이클의 동결-해동 후, 원심분리는 4000 rpm에서 10분 동안 4℃에서 수행되었다. 원심분리의 상층액을 취하여 세포 밀집도가 90% 이상인 새로운 종양 세포에 첨가하였고, 1회 바이러스 계대 배양을 완료하였다. 이러한 방법으로 계대 배양은 10회 이상 반복되었고, 계대 배양의 각 라운드의 바이러스 용액의 일부를 RD 세포에서 바이러스의 역가 측정을 위해 취하였으며, 상세한 방법은 실시예 2.3을 참고하였다. 일반적으로, 바이러스 복제 능력은 세대를 거치며 증가하며, 상대적으로 높은 감염 역가에 도달하고 바이러스 복제가 종양 세포에서 안정적일 때, 종양 세포에 대한 CVB1의 적응된 균주(adapted strain)를 획득하였다.

[0238] 이어서, 실시예 2.4에 기술된 in vitro 항-종양 실험의 방법에 의해 인간 종양 세포 U2OS, SW579 또는 J82은 10^4 세포/웰씩 96-웰 플레이트에 접종되었다. 세포가 부착된 다음, 각 웰의 배지는 혈청이 없는 해당 세포 배양 배지로 교체되었으며, 37℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 세포의 상기 종류 각각에 적응된 연속적으로 계대 배양된 CVB1 균주는 각각 10, 1, 0.1, 및 0.01의 MOI로 접종되었다(바이러스 역가는 RD 세포에서 측정됨). 이어서, 세포의 CPE는 현미경으로 매일 모니터링되었으며, 세포 생존율은 바이러스의 감염 및 배양 후 72시간에 CCK-8 방법을 이용하여 측정되었다.

[0239] 결과는 표 6에 나타내었다. CVB1이 좋지 못한(poor) 항암 효과를 가졌던 종양 세포의 종류에서 야생형 CVB1의 연속 계대 배양 후, 종양 세포에 대한 이의 사멸 활성은 유의하게 향상되었고, 이는 종양 세포에서 향상된 항암 효과를 갖는 CVB1 적응된 균주가 상술한 연속 계대 배양 방법에 의해 획득될 수 있음을 나타낸다.

표 6

[0240] 종양 세포에서 적응(adaptation)을 위한 연속 계대 배양 후 종양 세포에 대한 CVB1의 in vitro 사멸 실험의 결과

MOI / 세포주	10	1	0.1	0.01
U2OS	++	++	++	-
SW579	++	++	+	+
J82	++	++	++	+

[0241] 주: "-"는 바이러스 처리 그룹과 MOCK 그룹 간의 세포 생존율이 유의한 차이가 없음을 나타낸다; "+"는 바이러스 처리 후, 세포 수가 감소하였고, 생존율이 50% 이상이지만 MOCK 그룹과 유의한 차이가 있음을 나타낸다; "++"는 바이러스 처리 후 세포 생존율이 50% 미만이고, MOCK 그룹과 유의한 차이가 있음을 나타낸다.

[0242] 2.6 CVB1의 지놈 RNA의 항암 효과 평가

[0243] 본 실시예에서, CVB1의 감염성 생(live) 바이러스의 다량은 CVB1의 정제된 지놈 RNA를 특정 종류의 종양 세포에 형질감염시켜 생산될 수 있으며, 따라서 종양 세포를 사멸시킬 수 있다.

[0244] 바이러스 지놈 RNA는 먼저 시험관내 전사(in vitro transcription)에 의해 획득되었으며, 이 방법은, 예를 들어, Hadac E M, Kelly E J and Russell S J. Mol Ther, 2011, 19(6): 1041-1047에서 찾을 수 있다. 구체적으로, 실시예 1에서 획득한 야생형 CVB1의 감염성 클로닝 플라스미드는 선형화되었고(linearized), 다량의 바이러스 RNA를 생산하기 위해서 선형화된 플라스미드는 MEGAscript™ T7 Transcription Kit(Thermo Fisher Scientific, AM1333)를 이용하여 시험관내 전사(in vitro transcription)를 위한 주형(template)으로 사용되었다. 그리고 획득한 바이러스 RNA는 다음 사용을 위해 MEGAclear™ Transcription Clean-Up Kit(Thermo Fisher Scientific, AM1908)를 이용하여 정제되었다. 한 샘플의 RNA 전기영동도(electropherogram)를 도 2에 나타내었다.

[0245] 이어서, 실시예 2.4에 기술된 in vitro 항-종양 실험의 방법에 따르면, 인간 자궁경부암 종양 세포주 Hela는 10^5 세포/웰씩 24-웰 플레이트에 접종되었다. 세포가 부착한 후, 각 웰에서 배지를 혈청이 없는 해당 세포 배양

배지로 교체한 다음, 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후 Hela 세포는 형질감염 시약 Lipofectamine® 2000(Thermo Fisher Scientific, 11668019)을 이용하여 웰 당 1 μg으로 정제된 바이러스 RNA로 형질감염되었고, 음성 대조군은 관련 없는 RNA 핵산 분자로 형질감염되었다. 이어서, 세포의 CPE는 현미경으로 매일 모니터링되었다.

[0246] 결과는 감염 후 약 8시간에 CVB1의 지놈 RNA로 형질감염된 Hela 세포에서 CPE가 발생하기 시작하였고, 그 후 세포병변은 점차 증가되었음을 나타냈다. 48시간 후, 생존율은 CCK8 방법을 이용하여 측정되었고, Hela 세포는 거의 모두 죽었고 용해되었다. 그리고 감염 후 0 및 48 시간에 Hela 세포의 현미경사진을 도 3에 나타내었다. 배양 상층액은 새로운 Hela 세포에 접종되었고 CPE는 빠르게 생성되었다. 결과는 CVB1의 핵산을 직접 투여하는 것이 또한 우수한 사멸 활성을 가지며 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있음을 나타냈다.

[0247] 실시예 3: CVB1 및 이의 변이형의 in vivo 항-종양 실험

[0248] 3.1 바이러스, 세포주 및 실험동물

[0249] (1) 바이러스: 본 실시예에서는, 실시예 1에서 제공된 CVB1-WT(서열번호 12), CVB1-HRV2(서열번호 13), CVB1-miR133&206T(서열번호 14), CVB1-GM-CSF(서열번호 15) 및 CVB1-Anti-PD-1(서열번호 16)이 사용되었다. 바이러스 배양 및 바이러스 역가 측정 방법의 경우, 실시예 2.2 및 2.3을 각각 참조할 수 있다.

[0250] (2) 세포주: 인간 유방암 세포주 BcaP37(CCTCC 기탁 번호: GDC206), 인간 비소세포폐암 세포주 A549(ATCC® 번호: CCL-185™) 및 SPC-A-1(CCTCC 기탁 번호: GDC050), 인간 버킷림프종 세포주 Raji(ATCC® 번호: CCL-86™), 인간 자궁내막암 세포주 Ishikawa(ECACC 번호 99040201) 및 HEC-1-B(ATCC® 번호: HTB-113™), 인간 자궁경부암 세포주 Hela(ATCC® 번호: CCL-2™) 및 C-33A(ATCC® 번호: HTB-31™), 및 인간 신경교종 세포주 GBM(환자 종양 조직으로부터 분리된 원발성 종양 세포주). Raji는 RPMI-1640 배지를 사용하여 배양되었고 C-33A는 MEM 배지를 사용하여 배양되었다는 것을 제외하면, 상기 세포는 DMEM 배지를 사용하여 배양되었고, 상기 배지는 10% 소태아혈청, 글루타민 및 페니실린-스트렙토마이신이 첨가되었다. 상기 모든 세포는 37℃ 및 5% CO_2의 표준 조건 하에서 배양되었다.

[0251] (3) 실험 동물: 6 내지 8 주령의 암컷C.B17 SCID 마우스를 Shanghai Silaike Experimental Animal Co., Ltd.로부터 입수하였다; 시아먼 대학의 실험동물센터 및 윤리위원회(Experimental Animal Center and Ethics Committee)로부터 승인된 프로토콜에 따라 마우스를 SPF 조건에서 사육했다.

[0252] 3.2 바이러스의 in vivo 항-종양 실험

[0253] SCID 마우스에서 피하 종양 형성을 위해 사용된 종양 세포는 0.01% 트립신으로 분해되었고, 그 후 10% 소태아혈청을 포함하는 세포 배양 배지를 이용하여 단일 세포 현탁액으로 재현탁되었다. 현탄액의 세포 밀도가 카운트되었다. 세포는 1000 g에서 3분 동안 원심분리에 의해 침전되었고, 그 후 세포는 약 10^6 내지 10^7 세포/100 μl PBS의 농도에 도달하도록 적당한 부피의 PBS로 재현탁되었다. 종양 세포는 주사기로 SCID 마우스의 등에 10^6 내지 10^7 세포/100 μl PBS/부위 씩 피하 접종되었다. 약 14일 내지 21일 후 SCID 마우스의 피부 아래에 종양 세포가 약 100 mm^3의 종양 질량을 형성하였을 때, 종양-보유 SCID 마우스는 실험군(CVB1-WT, CVB1-HRV2, CVB1-miR133&206T, CVB1-GM-CSF 또는 CVB1-Anti-PD-1를 투여 받음) 및 음성 대조군으로, 그룹 당 4 마리 동물 씩(n=4) 무작위로 나누어졌다. 10^6 TCID50/100μl 무-혈청 배지/종양 질량 또는 동량의 무-혈청 배지에서 항암 바이러스(CVB1-WT, CVB1-HRV2, CVB1-miR133&206T, CVB1-GM-CSF 또는 CVB1-Anti-PD-1)는 2일 마다 총 5회 처리 동안 종양내에 주사되었다. 종양 크기는 버니어 캘리퍼(vernier caliper)로 측정되었으며 2일 마다 기록되었고, 종양 크기를 계산하는 방법은 다음과 같다:

[0254] 종양 크기(mm^3) = 종양 길이 값 X (종양 넓이 값)^2/2.

[0255] 상기 6종의 종양에 대한 CVB1-WT의 치료 결과를 도 4a 내지 4i에 각각 나타냈다. 결과는 CVB1-WT의 챌린지 후, BcaP37 (A), A549 (B), SPC-A-1 (C), Raji (D), Ishikawa (E), HEC-1-B (F), Hela (G), C-33A (H) 및 GBM (I)의 관측된 종양의 성장이 점차 느려지고 중단되었으며, 종양이 심지어 용해되었고 사라졌음을 나타냈다; 대조적으로, 음성 그룹(CTRL)의 종양은 정상적인 성장을 유지하였고, 종양 크기는 실험 그룹에서 보다 유의하게 보다 컸다.

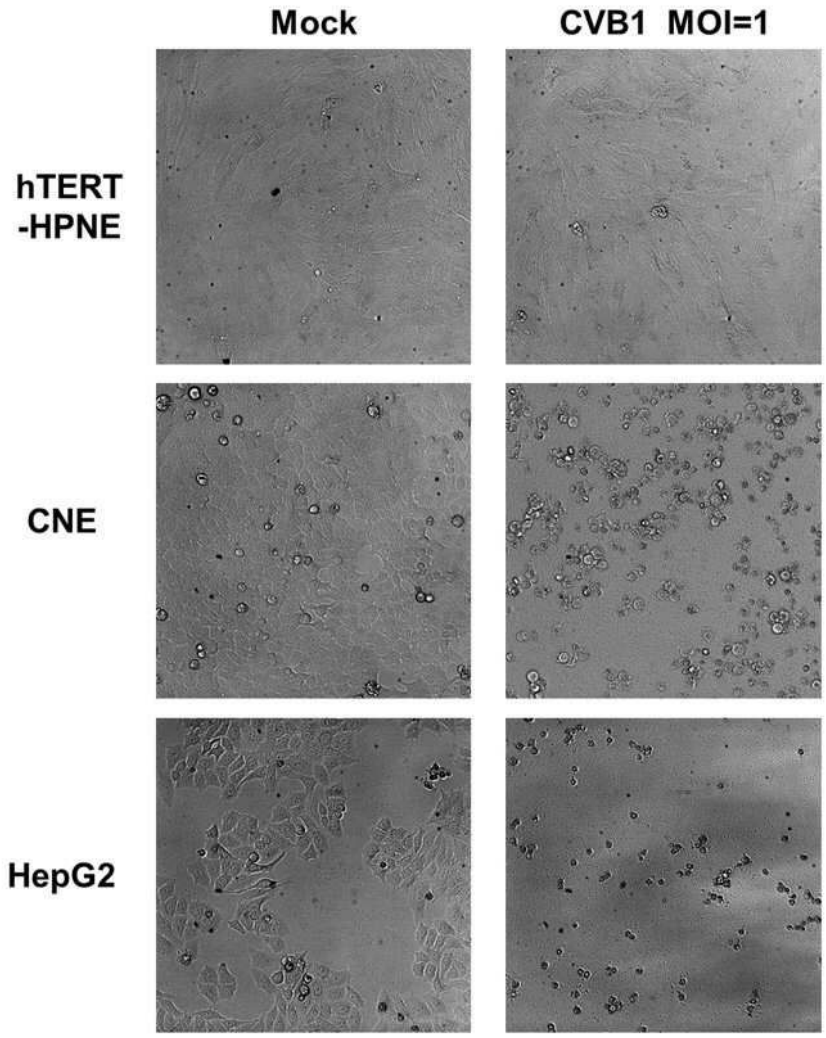
[0256] 도 5는 10일 동안GBM 종양 모델에 CVB1-WT, CVB1-HRV2, CVB1-miR133&206T, CVB1-GM-CSF, 또는 CVB1-Anti-PD-

1를 처리한 후 얻은 결과를 나타냈다. 결과는 항암 바이러스 처리를 하지 않은 음성 대조군과 비교하여 CVB1-WT, CVB1-HRV2, CVB1-miR133&206T, CVB1-GM-CSF 및 CVB1-Anti-PD-1으로 각각 처리된 후 종양이 유의하게 부피가 감소되었고 심지어 대부분 사라졌으며, 5종의 항암 바이러스를 처리한 후 종양 부피에서 감소한 정도가 비슷하였음을 나타냈다. 상기 결과는 CVB1-WT, CVB1-HRV2, CVB1-miR133&206T, CVB1-GM-CSF 및 CVB1-Anti-PD-1 모두 현저하고 유리한 in vivo 항-종양 활성을 보임을 나타냈다.

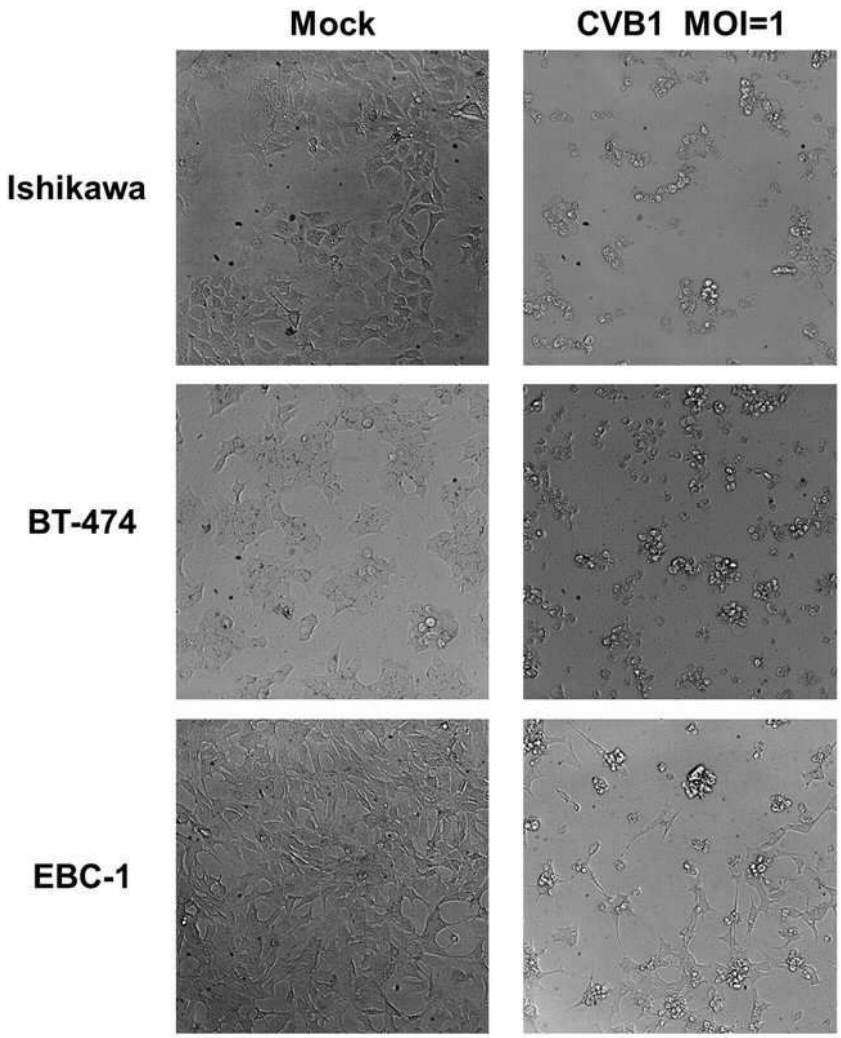
[0257] 본 발명의 특정 구현예가 상세하게 설명되었지만, 당업자는 공지된 모든 교시 내용에 기반하여 세부사항에 다양한 변형 및 변경이 이루어질 수 있으며, 이러한 변경은 본 발명의 범위 내에 있음을 이해할 것이다. 본 발명의 전체는 첨부된 청구항 및 이의 임의의 등가물에 의해 제공된다.

도면

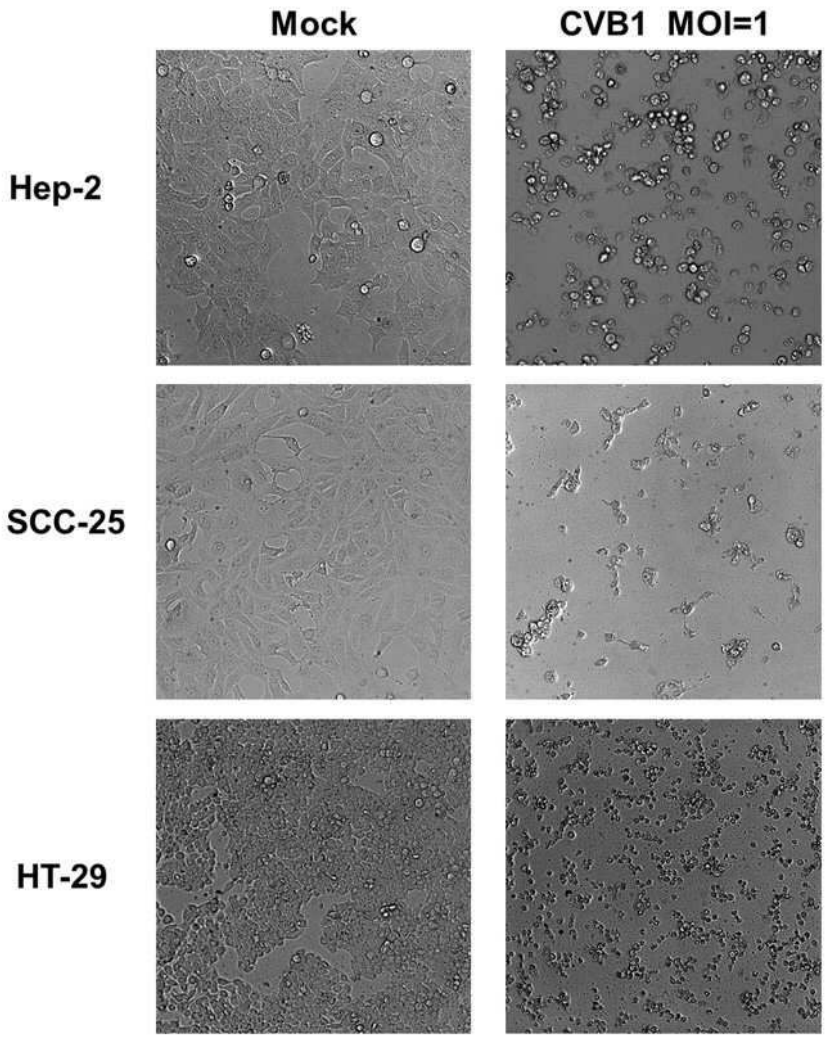
도면1a



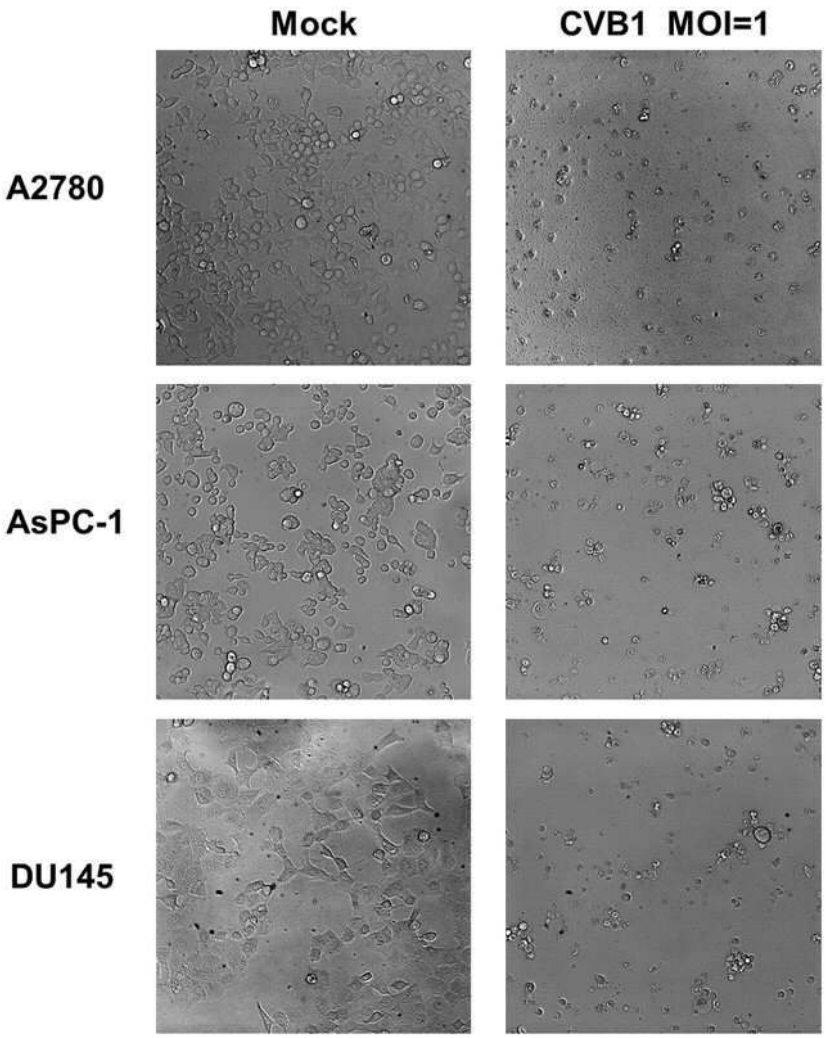
도면1b



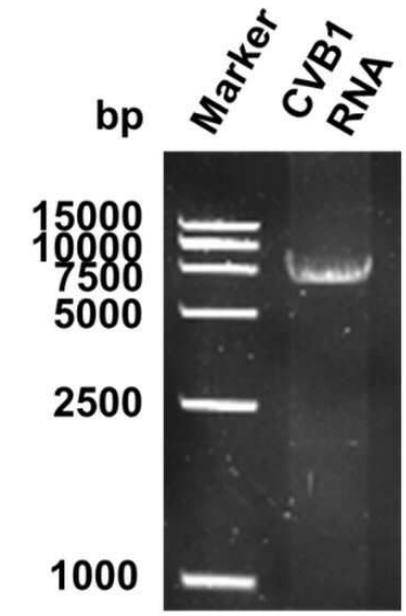
도면1c



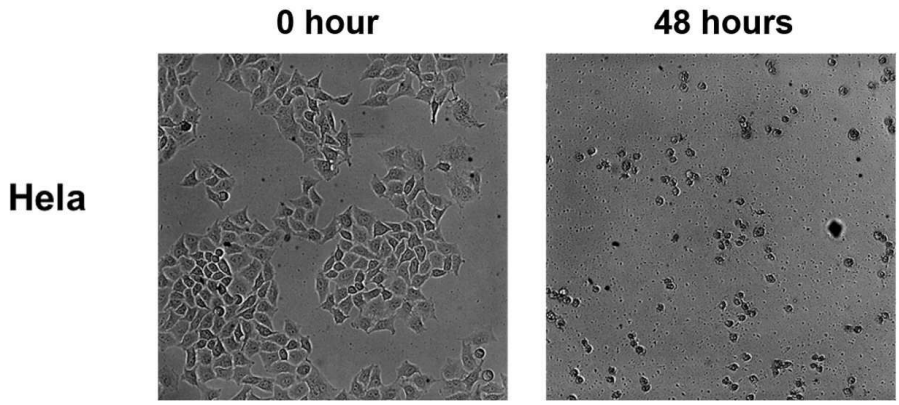
도면1d



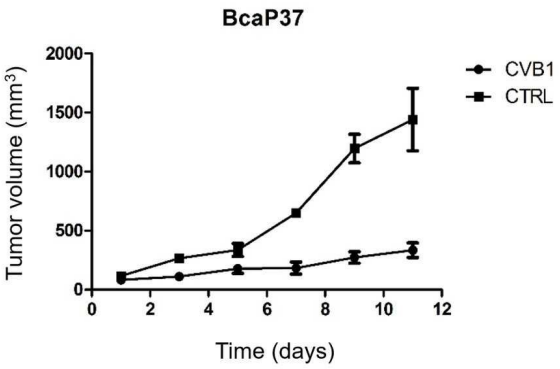
도면2


bp
Marker
CVB1 RNA
15000
10000
7500
5000
2500
1000

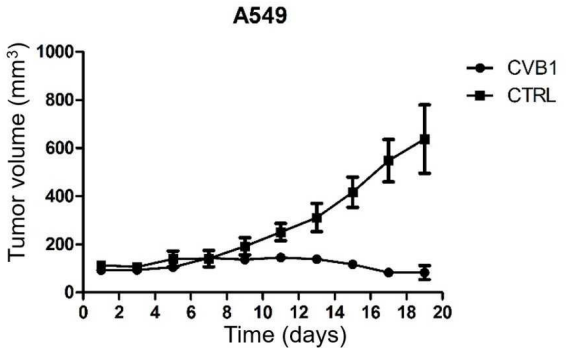
도면3


0 hour
48 hours
Hela

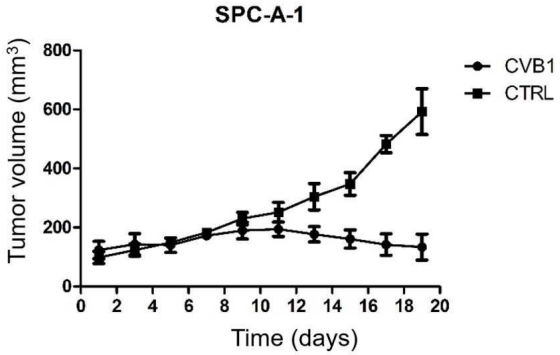
도면4a


BcaP37
Tumor volume (mm3)
Time (days)
CVB1
CTRL
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12

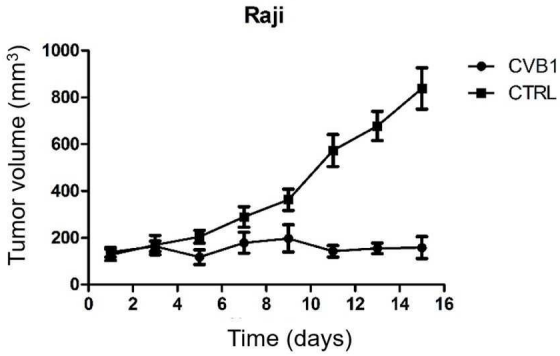
도면4b



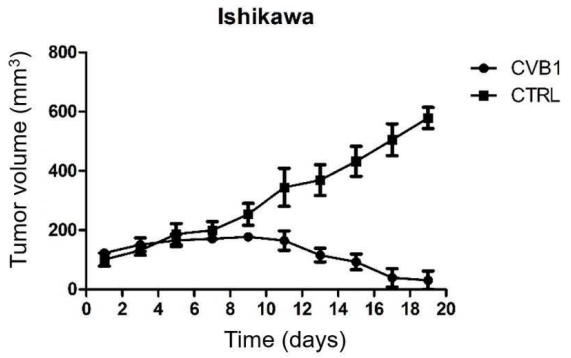
도면4c



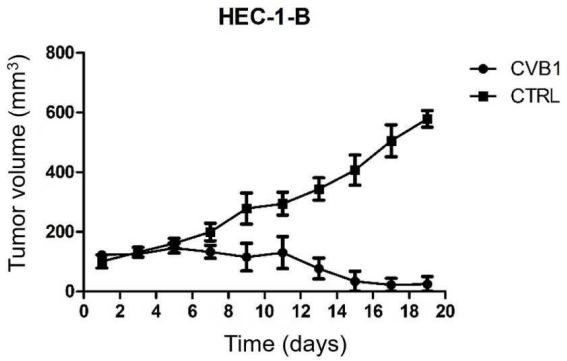
도면4d



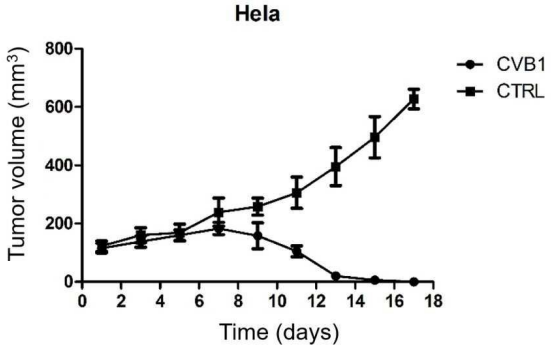
도면4e



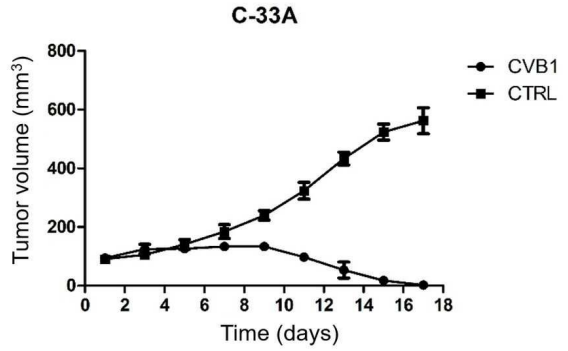
도면4f



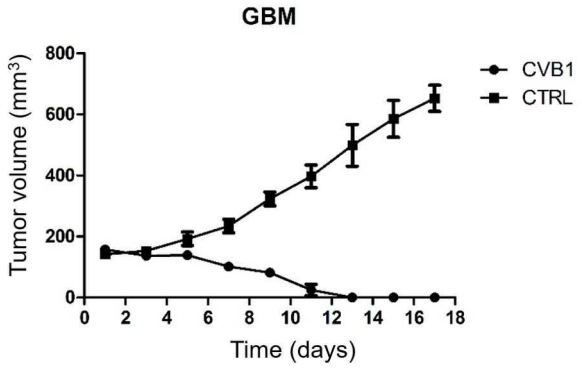
도면4g



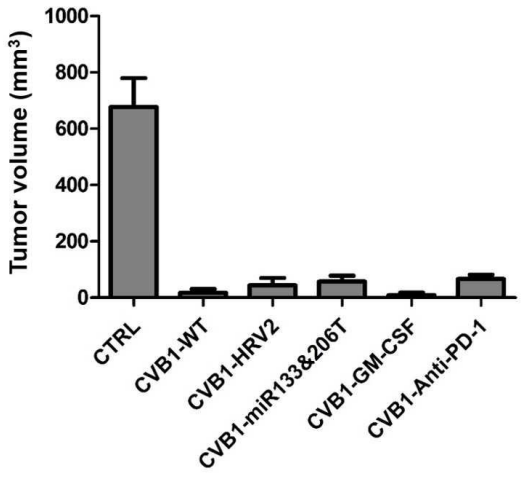
도면4h



도면4i



도면5



서 열 목 록

<110> XIAMEN UNIVERSITY

YANG SHENG TANG COMPANY, LTD.

<120> COXSACKIE VIRUS B FOR TREATING TUMORS

<130> PI200018CN

<150> CN 201810338046.2

<151> 2018-04-16

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7371

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA sequence of CVB1-WT

<400> 1

tcctgtgggt tgatcccacc cacagggccc actgggcgct agcacactgg tattccggta 60

cctttgtgcg cctgttttat acacccttcc caagtgtaac ttagaagctt atcacacacg 120

gtcaacaggt gactcagtat gccaactggg tcttgatcaa gcacttctgt ttccccggac 180

tgagtatcaa taagctgctc acgcggctga aggagaaaac gttcgttaac cggccaatta 240

cttcgagaaa cctagtaaca ccatggaggt tgcgcagtgt ttcgctccac acaaccccag 300

tgtagatcag gccgatgagt caccgcactc ctcacgggcg accgtggcgg tggctgcgct 360

ggcggcctgc ccatgggata acccatggga cgcttcaata ctgacatggt gcgaagagtc 420

tattgagcta attggtagtc ctccggcccc tgaatgcggc taatcctaac tgcggagcag 480

atacccacac gccagtgggc agtctgtcgt aatgggcaac tctgcagcgg aaccgactac 540

tttgggtgtc cgtgtttcct tttatttta tactggctgc ttatggtgac aattgagaga 600

ttgttaccat atagctattg gattggccat ccagtgacaa acagagcgat tatttattta 660

tttgttggtt atatcccatt aagccaaaag gccctagtta ctctcaactt tatactattg 720

cttaatacaa cgaaatggga gctcaggtgt ctacacaaaa gacgggtgca catgagactg 780

gcttgaatgc cagcggcaat tctgtcatcc attacaccaa catcaattac tacaaggatg 840

ctgcatccaa ctccgcaaat aggcaagact tcacacaaga cccaggtaag ttcactgaac 900

ctgtaaagga catcatggtg aaaactatgc ctgcgttgaa ctcaccctct gctgaggaat 960

gcggctacag tgacagagtg cgttccatca cattaggtaa ttccactatc accacccaag 1020

agtgtgccaa cgtggtcgtc gggtacggag tgtggccaga gtatctaaaa gacaacgagg 1080

ccacagccga agatcagccc acacaacctg atgtggccac ctgccgcttc tatactttag 1140

aatcagtgca gtggatgaaa aattcggccg ggtggtggtg gaagctgcct gatgcactgt 1200

cacagatggg cttgtttggt caaaacatgc agtaccacta cttgggaaga acagggtata 1260

ctatacacgt acaatgcaat gcctcaaagt tccatcaagg atgcctgctt gtagtgtgtg 1320

tgcctgaagc tgagatgggg tgctctaact tgaacaacac gcccgaattc agtgagttat 1380

ccggaggaga cagtgccaga atgttcaccg atacacaggt cggggagtca aacgccaaga 1440

aagtacagac agcggtgtgg aacgccggaa tgggcgttgg agtgggtaat ctcactattt 1500

tccctcacca atggatcaac ctgaggacca acaacagtgc aacgctagtg atgccttaca 1560

taaacagcgt ccccatggat aacatgttca ggcacaataa cttaacacta atgattatcc 1620

catttgtacc gcttaattac agcgagggat cctcaccgta cgtgcccata acagtcacca 1680

tcgctcctat gtgtgcagag tacaacgggc tacggctggc cagcaaccag ggtctaccag 1740

ttatgacaac acctgggagc acgcaatttc taacttcaga tgacttccag tcaccgtcag 1800

cgatgccaca gtttgatgtc accccagaga tgcaaatacc aggccgcgta aataatttga 1860

tggagattgc cgaggtggac tcagtggtgc ctgtgaataa cacagaggac aacgtgagta 1920

gccttaaggc ataccagatt ccagtacagt ccaacagtga caatggtaag caggtttttg 1980

gttttccctt acaaccgggt gccaacaacg ttctgaatag aaccctcttg ggtgaaattc 2040

taaactatta cacccattgg agtggcagca taaaacttac attcatgttc tgtgggtctg 2100

ccatggccac tggcaagttc cttctggcat actcaccacc tggagcagga gtcccgaaaa 2160

accgaaaaga tgctatgctg ggcacccacg tcatatggga tgttgggtta caatcaagct 2220

gcgtgttgtg cgtaccgtgg attagccaaa cacactacag atacgtggtt gaggatgaat 2280

acacagcagc cggatatgtt acatgctggt atcaaacaaa tatcgtggtg ccagctgatg 2340

tgcaaagctc atgtgacatc ttgtgctttg tttcagcctg caacgatttc tctgtgcgga 2400

tgctgaaaga tacgcccttt ataagacagg acacatttta tcacggccca gtggaggagt 2460

ctgtggatcg tgcagtggca cgtgtggcgg acacgattag ttcacggccc actaactcgg 2520

agtcaattcc agcgctcacc gccgccgaga ctgggcatac ctcccaagtt gtgcctagcg 2580

acaccatgca aacaagacat gtgaaaaact accactcacg gtccgaatcg tccattgaaa 2640

atttcctatg ccggtctgcc tgtgtatact atgccacata caccaataac tcaaaaaaag 2700

aggggtttgc agagtgggtt atcaacacta gacaggtggc acagctaaga agaaagttgg 2760

agctcttcac atatctaagg tttgacttag aactaacatt tgttataacg agcgcacaac 2820

aacccagtac cgcctccagt gtagacgctc ccgtgcaaac ccatcagatt atgtatgtgc 2880

ctccaggtgg ccctgtacca acaaaggtta aagattatgc atggcaaact tccacaaacc 2940

ccagcgtttt ctggacagaa ggaaacgccc caccaaggat gtccatccca ttcattagca 3000

ttggtaatgc gtatagttgt ttttatgatg ggtggacgca gttttcaaga aacggggtct 3060

atggcatcaa taccctcaac aacatgggca cgttgtatat gaggcatgtc aatgaagcgg 3120
ggcagggtcc aatcaaaagt actgttagaa tatatttcaa acccaagcac gtgaaggcgt 3180
gggtgccacg tccgccaaga ttgtgtcaat atgagaagca gaaaaatgtc aattttagcc 3240
ctataggagt aaccacaagt agaacggaca ttataacaac aggcactttt ggtcagcagt 3300
ccggagcgat atatgtgggc aattacagga tagtcaatag gcacctggca acacactttg 3360
actggcaaaa ttgcatatgg gaggattaca acagggacct cctagtatgc actacaacgg 3420
cgcacggttg tgacaatatt gcaagatgcc agtgcacagc aggtgtgtat tattgtgctt 3480

ctaggaacaa gcattacccg gtgcattttg aaggaccagg cttggtggag gtccaggaaa 3540
gtgaatatta tccaaaaagg tatcaatcac acgtgcttct tgccgcaggg ttttctgagc 3600
cgggggattg tggtggtatt ctcaggtgtg aacatggtgt tataggcatc gtgaccatgg 3660
gtggtgaggg tgttgtcggc tttgccgatg tgcgcgatct cttatggctg gaagacgacg 3720
caatggaaca gggagtcagg gactacgtgg aacagcttgg aaacgccttt ggttctgggt 3780
ttaccaacca gatttgcgag caagtcaatc tgttaaaaga gtcactaata ggccaagact 3840
ccatcttgga aaaatcactc aaggcattag tgaaaatcat atcagcactg gttatcgtgg 3900

tgagaaacca cgatgacctc ataacagtca ctgccacctt agccctgatt ggctgtacca 3960
cttcaccgtg gcggtggcta aagaaaaaag tgactcaata ctatgggatt cccatggccg 4020
agagacagaa caatggctgg ctcaagaaat tcacagaaat gaccaatgca tgcaagggca 4080
tggaatggat cgccatcaaa atccaaaagt tcattgagtg gctcaaaatt aagatcttgc 4140
cagaagtaaa ggaaaaacac gagtttctta ccagacttaa gcaactccca ctcttagaaa 4200
gccaaattgc caccatcgag cagagtgcac catcacagag tgatcaggaa caactgttct 4260
ccaatataca gtacttcgcg cactattgca gaaagtacgc cccactgtac gcagctgagg 4320

caaaaagagt gttctctcta gaaaagaaaa tgagcaacta catacagttc aagtccaaat 4380
gccgtattga accagtctgt ttattgctcc atggtagccc tggagccgga aaatccgtgg 4440
ctaccaattt gattggacgc tcacttgcag agaagctcaa cagttcagtg tattcattgc 4500
caccagaccc agaccatttt gacggctata aacaacaagc tgtcgtaatc atggatgacc 4560
tgtgccagaa cccagatggg aaagacgtgt ccttgttctg ccagatggtt tcaagtgtag 4620
actttgttcc accaatggca gcacttgagg agaaaggcat actcttcaca tcgcctttcg 4680
tgctcgcctc taccaacgca ggttccatca acgctcccac tgtgtcagac agcagagccc 4740

ttgctagaag gttccacttc gacttgaaca ttgaggtcat ctcaatgtac agccagaatg 4800

gcaaaatcaa catgccaatg tcagtgaagg cttgtgatga tgagtgttgt ccagttaatt 4860

tcaagaggtg ttgtccatta gtgtgcggta aggccattca gttcattgac agaagaacac 4920

aaatgaggta ttcactagac atgcttgtaa ctgaaatgtt cagggagtac aaccacagac 4980

atagtgtggg ggcaacactc gaggcactct tccaaggccc acccgtgtac aaagagatca 5040

agatcagtgt tgcgccagaa acccctcccc caccggcaat agcagatctg ctgaaatctg 5100

tggacagtga agcagttaga gagtactgca aggaaaaggg atggttggtg cctgagatca 5160

attccactct acaaattgaa aagcacgtga gcagggcctt catttgcctg caagcgctca 5220

ccacgtttgt ttccgtggcg gggataattt acatcatata caaattgttt gctggcttcc 5280

agggggccta caccggtatg ccaaaccaaa aacctaaagt accaactttg aggcaggcta 5340

aggtgcaggg accggcattc gaattcgctg tggcaatgat gaaaagaaat gctagcacag 5400

tgaagaccga gtacggtgag ttcacaatgc ttggaatcta tgacaggtgg gcagtgctac 5460

ctcgtcacgc tagaccaggg cctaccatcc taatgaatga ccaggaagtg ggtgtggtgg 5520

atgccaagga gttagtggac aaggatggca ccaatttaga attaacactc ttgaagctca 5580

atagaaatga gaaattcaga gacatccgag gcttcttaac acgtgaggag gccgaagtca 5640

acgaggctgt gcttgctatt aacaccagca agttcccaaa tatgtacatt ccagttgggc 5700

aagtaacaga ttatggcttc ctcaacttgg gtggcacacc aactaagcgc atgctgatgt 5760

acaacttccc aacacgtgca ggccaatgtg ggggagttct aatgtctaca ggtaaagtgc 5820

tcggaataca cgtcggtggt aatggacacc aagggttttc ggcagccctg ttacgccact 5880

atttcaatga cgagcaggga gagattgagt tcatcgagag ctctaaggat gcaggctttc 5940

cagtcattaa cacacctagc aaaacaaagc tcgagcccag tgttttccat cacgtgtttg 6000

agggaaacaa agaaccagca gtgttgagga atggagaccc aagactgaaa gccaattttg 6060

aggaagccat tttctccaag tacatcggga atgtgaacac acatgtagac gagtacatga 6120

tggaagccgt cgaccattat gcaggacagt tagctacttt agatatcagt acagaaccta 6180

tgaagcttga ggatgctgtc tacggtactg agggcttgga agctctggac ttgaccacta 6240

gtgctgggta tccctatgtc gcccttggta taaaaaagag agacatctta tccaaaaagt 6300

ctaaggacct gtctaaactg agagagtgta tggacaagta tgggttaaac ctccctatgg 6360

tcacctatgt gaaggatgaa ttgaggtcag cagagaaagt ggctaagggc aaatccagac 6420

taatcgaggc gtccagttta aatgactcag tggcaatgag acagactttc ggtaacctgt 6480

ataagacatt ccatctgaac ccgggcatag tgactggcag tgcagttgga tgcgatcccg 6540

acttgttctg gagcaagatt ccagtcatgc tcgatggtca cctcatcgcc tttgactaca 6600

gtggatatga tgccagcctg agtccggtgt ggtttgcttg cttgaaactg ttgttggaaa 6660

agctggggta ctcacacaag gaaactaatt acatagatta cttgtgcaac tcccaccatt 6720

tgtacagaga caagcactac tttgtgaggg gaggaatgcc atccgggtgt tctggaacca 6780

gcattttcaa ttcaatgatt aataacataa tcatcagaac actgatgttg aaggtgtaca 6840

aagggataga tctagaccaa tttaggatga ttgcatatgg tgacgacgtc attgcttcgt 6900

acccgtatcc aattgatgcg tcattgctgg ctgaggctgg caaggggtat ggtctgatta 6960

tgacaccagc agacaaagga gagtgtttca atgaagtaac gtggaccaac gtcactttcc 7020

tgaaaagata cttcagagcg gatgagcaat atcccttcct cgttcaccca gtgatgccaa 7080

tgaaggacat tcatgagtca attaggtgga ctaaagaccc caaaaacacc caagatcacg 7140

tgcgatcctt gtgcttattg gcctggcaca atggagagca agaatatgag aattttgtat 7200

ccaaaatcag aagcgtccca gttgggcgct gcttgacatt gcctgcgttc tcgactctgc 7260

gcaggaagtg gttggattcc ttctaaaatt gaagtacaat gtgatttaac tcaattggct 7320

taaccctacc acacttaccg aactagataa cggtgtggta ggggtaaatt c 7371

<210> 2

<211> 507

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNA sequence of internal ribosome entry site sequence of HRV2

<400> 2

aacuuagaag uuuuucacaa agaccaauag ccgguaauca gccagauuac ugaaggucaa 60

gcacuucugu uucccggguc aauguugaua ugcuccaaca gggcaaaaac aacugcgauc 120

guuaaccgca aagcgccuac gcaaagcuua guagcaucuu ugaaaucguu uggcuggucg 180

auccgccauu uccccuggua gaccuggcag augaggcuag aaauacccca cuggcgacag 240

uguucuagcc ugcguggcug ccugcacacc cuaugggugu gaagccaaac aauggacaag 300

gugugaagag ccccgugugc ucgcuuugag uccuccggcc ccugaaugug gcuaaccuua 360

acccugcagc uagagcacgu aacccaaugu guaucuaguc guaaugagca auugcgggau 420

gggaccaacu acuuugggug uccguguuuc acuuuuuccu uuauauuugc uuauggugac 480

aauauauaca auauauauau uggcacc 507

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNA sequence of miR-133 target sequence

<400> 3

acagcugguu gaaggggacc aa 22

<210> 4

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNA sequence of miR-206 target sequence

<400> 4

ccacacacuu ccuuacauuc ca 22

<210> 5

<211> 102

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNA sequence of tandem sequence of miR-133 target sequence and

miR-206 target sequence

<400> 5

acagcugguu gaaggggacc aacgauacag cugguugaag gggaccaaac cgguccacac 60

acuuccuuac auuccaucac ccacacacuu ccuuacauuc ca 102

<210> 6

<211> 435

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence of GM-CSF gene

<400> 6

atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcacccgcc 60

cgctcgccca gccccagcac gcagccctgg gagcatgtga atgccatcca ggaggcccgg 120

cgtctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcatc 180

tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgcctacaga cccgcctgga gctgtacaag 240

cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggcccct tgaccatgat ggccagccac 300

tacaagcagc actgccctcc aaccccggaa acttcctgtg caacccagat tatcaccttt 360

gaaagtttca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgtca tccctttga ctgctgggag 420

ccagtccagg agtga 435

<210> 7

<211> 795

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence of Anti-PD-1 scFv

<400> 7

atgaagcacc tgtggttctt cctgctgctg gtggccgctc ctaggtgggt gctgtcccag 60

gtgcagctgg tgcagagcgg cgtggaggtg aagaagcccg gcgcttccgt gaaggtgtcc 120

tgcaaggcct ccggctacac cttcaccaac tactacatgt actgggtgag gcaggccccct 180

ggacagggac tggagtggat gggcggcatc aacccttcca acggcggcac caacttcaac 240

gagaagttca agaaccgggt gaccctgacc accgactcct ccaccaccac cgcctacatg 300

gagctgaagt ccctgcagtt tgacgacacc gccgtgtact actgcgccag gagggactac 360

cggttcgaca tgggcttcga ctactggggc cagggcacaa ccgtgaccgt gtccagcgga 420

ggtggcggat ctggaggggg tggtagcggt ggaggcggga gtgagatcgt gctgacccag 480

tcccctgcta cactgtccct gtcccccggc gagagggcta cactgagctg cagggcctcc 540

aagggcgtgt ccacctccgg ctactcctac ctgcactggt accagcagaa gcctggacag 600

gctcccaggc tgctgatcta cctggcctcc tacctggagt ccggcgtgcc tgctaggttt 660

tccggcagcg gcagcggcac cgatttcacc ctgaccatct cctccctgga gcccgaggac 720

ttcgccgtgt actactgcca gcactccagg gatctgcctc tgaccttcgg cggcggcacc 780

aaggtggaga tcaag 795

<210> 8

<211> 7251

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA sequence of CVB1-HRV2

<400> 8

tcctgtgggt tgatcccacc cacagggccc actgggcgct agcacactgg tattccggta 60

cctttgtgcg cctgttttat acacccttcc caagtgtaac ttagaagaac ttagaagttt 120

ttcacaaaga ccaatagccg gtaatcagcc agattactga aggtcaagca cttctgtttc 180

cccggtcaat gttgatatgc tccaacaggg caaaaacaac tgcgatcgtt aaccgcaaag 240

cgcctacgca aagcttagta gcatctttga aatcgtttgg ctggtcgatc cgccatttcc 300

cctggtagac ctggcagatg aggctagaaa taccccactg gcgacagtgt tctagcctgc 360

gtggctgcct gcacacccta tgggtgtgaa gccaaacaat ggacaaggtg tgaagagccc 420

cgtgtgctcg ctttgagtcc tccggcccct gaatgtggct aaccttaacc ctgcagctag 480

agcacgtaac ccaatgtgta tctagtcgta atgagcaatt gcgggatggg accaactact 540

ttgggtgtcc gtgtttcact ttttccttta tatttgctta tggtgacaat atatacaata 600

tatatattgg caccatggga gctcaggtgt ctacacaaaa gacgggtgca catgagactg 660

gcttgaatgc cagcggcaat tctgtcatcc attacaccaa catcaattac tacaaggatg 720

ctgcatccaa ctccgcaaat aggcaagact tcacacaaga cccaggtaag ttcactgaac 780

ctgtaaagga catcatggtg aaaactatgc ctgcgttgaa ctcaccctct gctgaggaat 840

gcggctacag tgacagagtg cgttccatca cattaggtaa ttccactatc accacccaag 900

agtgtgccaa cgtggtcgtc gggtacggag tgtggccaga gtatctaaaa gacaacgagg 960

ccacagccga agatcagccc acacaacctg atgtggccac ctgccgcttc tatactttag 1020

aatcagtgca gtggatgaaa aattcggccg ggtggtggtg gaagctgcct gatgcactgt 1080

cacagatggg cttgtttggt caaaacatgc agtaccacta cttgggaaga acagggtata 1140

ctatacacgt acaatgcaat gcctcaaagt tccatcaagg atgcctgctt gtagtgtgtg 1200

tgcctgaagc tgagatgggg tgctctaact tgaacaacac gcccgaattc agtgagttat 1260

ccggaggaga cagtgccaga atgttcaccg atacacaggt cggggagtca aacgccaaga 1320

aagtacagac agcggtgtgg aacgccggaa tgggcgttgg agtgggtaat ctcactattt 1380

tccctcacca atggatcaac ctgaggacca acaacagtgc aacgctagtg atgccttaca 1440

taaacagcgt ccccatggat aacatgttca ggcacaataa cttaacacta atgattatcc 1500

catttgtacc gcttaattac agcgagggat cctcaccgta cgtgcccata acagtcacca 1560

tcgctcctat gtgtgcagag tacaacgggc tacggctggc cagcaaccag ggtctaccag 1620

ttatgacaac acctgggagc acgcaatttc taacttcaga tgacttccag tcaccgtcag 1680

cgatgccaca gtttgatgtc accccagaga tgcaaatacc aggccgcgta aataatttga 1740

tggagattgc cgaggtggac tcagtggtgc ctgtgaataa cacagaggac aacgtgagta 1800

gccttaaggc ataccagatt ccagtacagt ccaacagtga caatggtaag caggtttttg 1860

gttttccctt acaaccgggt gccaacaacg ttctgaatag aaccctcttg ggtgaaattc 1920

taaactatta cacccattgg agtggcagca taaaacttac attcatgttc tgtgggtctg 1980

ccatggccac tggcaagttc cttctggcat actcaccacc tggagcagga gtcccgaaaa 2040

accgaaaaga tgctatgctg ggcacccacg tcatatggga tgttgggtta caatcaagct 2100

gcgtgttgtg cgtaccgtgg attagccaaa cacactacag atacgtggtt gaggatgaat 2160

acacagcagc cggatatgtt acatgctggt atcaaacaaa tatcgtggtg ccagctgatg 2220

tgcaaagctc atgtgacatc ttgtgctttg tttcagcctg caacgatttc tctgtgcgga 2280

tgctgaaaga tacgcccttt ataagacagg acacatttta tcacggccca gtggaggagt 2340

ctgtggatcg tgcagtggca cgtgtggcgg acacgattag ttcacggccc actaactcgg 2400

agtcaattcc agcgctcacc gccgccgaga ctgggcatac ctcccaagtt gtgcctagcg 2460

acaccatgca aacaagacat gtgaaaaact accactcacg gtccgaatcg tccattgaaa 2520

atttcctatg ccggtctgcc tgtgtatact atgccacata caccaataac tcaaaaaaag 2580

aggggtttgc agagtgggtt atcaacacta gacaggtggc acagctaaga agaaagttgg 2640

agctcttcac atatctaagg tttgacttag aactaacatt tgttataacg agcgcacaac 2700

aacccagtac cgcctccagt gtagacgctc ccgtgcaaac ccatcagatt atgtatgtgc 2760

ctccaggtgg ccctgtacca acaaaggtta aagattatgc atggcaaact tccacaaacc 2820

ccagcgtttt ctggacagaa ggaaacgccc caccaaggat gtccatccca ttcattagca 2880

ttggtaatgc gtatagttgt ttttatgatg ggtggacgca gttttcaaga aacggggtct 2940

atggcatcaa taccctcaac aacatgggca cgttgtatat gaggcatgtc aatgaagcgg 3000

ggcagggtcc aatcaaaagt actgttagaa tatatttcaa acccaagcac gtgaaggcgt 3060

gggtgccacg tccgccaaga ttgtgtcaat atgagaagca gaaaaatgtc aattttagcc 3120

ctataggagt aaccacaagt agaacggaca ttataacaac aggcactttt ggtcagcagt 3180

ccggagcgat atatgtgggc aattacagga tagtcaatag gcacctggca acacactttg 3240

actggcaaaa ttgcatatgg gaggattaca acagggacct cctagtatgc actacaacgg 3300

cgcacggttg tgacaatatt gcaagatgcc agtgcacagc aggtgtgtat tattgtgctt 3360

ctaggaacaa gcattacccg gtgcattttg aaggaccagg cttggtggag gtccaggaaa 3420

gtgaatatta tccaaaaagg tatcaatcac acgtgcttct tgccgcaggg ttttctgagc 3480

cgggggattg tggtggtatt ctcaggtgtg aacatggtgt tataggcatc gtgaccatgg 3540

gtggtgaggg tgttgtcggc tttgccgatg tgcgcgatct cttatggctg gaagacgacg 3600

caatggaaca gggagtcagg gactacgtgg aacagcttgg aaacgccttt ggttctgggt 3660

ttaccaacca gatttgcgag caagtcaatc tgttaaaaga gtcactaata ggccaagact 3720

ccatcttgga aaaatcactc aaggcattag tgaaaatcat atcagcactg gttatcgtgg 3780

tgagaaacca cgatgacctc ataacagtca ctgccacctt agccctgatt ggctgtacca 3840

cttcaccgtg gcggtggcta aagaaaaaag tgactcaata ctatgggatt cccatggccg 3900

agagacagaa caatggctgg ctcaagaaat tcacagaaat gaccaatgca tgcaagggca 3960

tggaatggat cgccatcaaa atccaaaagt tcattgagtg gctcaaaatt aagatcttgc 4020

cagaagtaaa ggaaaaacac gagtttctta ccagacttaa gcaactccca ctcttagaaa 4080

gccaaattgc caccatcgag cagagtgcac catcacagag tgatcaggaa caactgttct 4140

ccaatataca gtacttcgcg cactattgca gaaagtacgc cccactgtac gcagctgagg 4200

caaaaagagt gttctctcta gaaaagaaaa tgagcaacta catacagttc aagtccaaat 4260

gccgtattga accagtctgt ttattgctcc atggtagccc tggagccgga aaatccgtgg 4320

ctaccaattt gattggacgc tcacttgcag agaagctcaa cagttcagtg tattcattgc 4380

caccagaccc agaccatttt gacggctata aacaacaagc tgtcgtaatc atggatgacc 4440

tgtgccagaa cccagatggg aaagacgtgt ccttgttctg ccagatggtt tcaagtgtag 4500

actttgttcc accaatggca gcacttgagg agaaaggcat actcttcaca tcgcctttcg 4560

tgctcgcctc taccaacgca ggttccatca acgctcccac tgtgtcagac agcagagccc 4620

ttgctagaag gttccacttc gacttgaaca ttgaggtcat ctcaatgtac agccagaatg 4680

gcaaaatcaa catgccaatg tcagtgaagg cttgtgatga tgagtgttgt ccagttaatt 4740

tcaagaggtg ttgtccatta gtgtgcggta aggccattca gttcattgac agaagaacac 4800

aaatgaggta ttcactagac atgcttgtaa ctgaaatgtt cagggagtac aaccacagac 4860

atagtgtggg ggcaacactc gaggcactct tccaaggccc acccgtgtac aaagagatca 4920

agatcagtgt tgcgccagaa acccctcccc caccggcaat agcagatctg ctgaaatctg 4980

tggacagtga agcagttaga gagtactgca aggaaaaggg atggttggtg cctgagatca 5040

attccactct acaaattgaa aagcacgtga gcagggcctt catttgcctg caagcgctca 5100

ccacgtttgt ttccgtggcg gggataattt acatcatata caaattgttt gctggcttcc 5160

agggggccta caccggtatg ccaaaccaaa aacctaaagt accaactttg aggcaggcta 5220

aggtgcaggg accggcattc gaattcgctg tggcaatgat gaaaagaaat gctagcacag 5280

tgaagaccga gtacggtgag ttcacaatgc ttggaatcta tgacaggtgg gcagtgctac 5340

ctcgtcacgc tagaccaggg cctaccatcc taatgaatga ccaggaagtg ggtgtggtgg 5400

atgccaagga gttagtggac aaggatggca ccaatttaga attaacactc ttgaagctca 5460

atagaaatga gaaattcaga gacatccgag gcttcttaac acgtgaggag gccgaagtca 5520

acgaggctgt gcttgctatt aacaccagca agttcccaaa tatgtacatt ccagttgggc 5580

aagtaacaga ttatggcttc ctcaacttgg gtggcacacc aactaagcgc atgctgatgt 5640

acaacttccc aacacgtgca ggccaatgtg ggggagttct aatgtctaca ggtaaagtgc 5700

tcggaataca cgtcggtggt aatggacacc aagggttttc ggcagccctg ttacgccact 5760

atttcaatga cgagcaggga gagattgagt tcatcgagag ctctaaggat gcaggctttc 5820
cagtcattaa cacacctagc aaaacaaagc tcgagcccag tgttttccat cacgtgtttg 5880
agggaaacaa agaaccagca gtgttgagga atggagaccc aagactgaaa gccaattttg 5940
aggaagccat tttctccaag tacatcggga atgtgaacac acatgtagac gagtacatga 6000
tggaagccgt cgaccattat gcaggacagt tagctacttt agatatcagt acagaaccta 6060
tgaagcttga ggatgctgtc tacggtactg agggcttgga agctctggac ttgaccacta 6120
gtgctgggta tccctatgtc gcccttggta taaaaaagag agacatctta tccaaaaagt 6180

ctaaggacct gtctaaactg agagagtgta tggacaagta tgggttaaac ctccctatgg 6240
tcacctatgt gaaggatgaa ttgaggtcag cagagaaagt ggctaagggc aaatccagac 6300
taatcgaggc gtccagttta aatgactcag tggcaatgag acagactttc ggtaacctgt 6360
ataagacatt ccatctgaac ccgggcatag tgactggcag tgcagttgga tgcgatcccg 6420
acttgttctg gagcaagatt ccagtcatgc tcgatggtca cctcatcgcc tttgactaca 6480
gtggatatga tgccagcctg agtccggtgt ggtttgcttg cttgaaactg ttgttggaaa 6540
agctggggta ctcacacaag gaaactaatt acatagatta cttgtgcaac tcccaccatt 6600

tgtacagaga caagcactac tttgtgaggg gaggaatgcc atccgggtgt tctggaacca 6660
gcattttcaa ttcaatgatt aataacataa tcatcagaac actgatgttg aaggtgtaca 6720
aagggataga tctagaccaa tttaggatga ttgcatatgg tgacgacgtc attgcttcgt 6780
acccgtatcc aattgatgcg tcattgctgg ctgaggctgg caaggggtat ggtctgatta 6840
tgacaccagc agacaaagga gagtgtttca atgaagtaac gtggaccaac gtcactttcc 6900
tgaaaagata cttcagagcg gatgagcaat atcccttcct cgttcaccca gtgatgccaa 6960
tgaaggacat tcatgagtca attaggtgga ctaaagaccc caaaaacacc caagatcacg 7020

tgcgatcctt gtgcttattg gcctggcaca atggagagca agaatatgag aattttgtat 7080
ccaaaatcag aagcgtccca gttgggcgct gcttgacatt gcctgcgttc tcgactctgc 7140
gcaggaagtg gttggattcc ttctaaaatt gaagtacaat gtgatttaac tcaattggct 7200
taaccctacc acacttaccg aactagataa cggtgtggta ggggtaaatt c 7251

<210> 9

<211> 7473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA sequence of CVB1-miR133&206T

<400> 9

tcctgtgggt tgatcccacc cacagggccc actgggcgct agcacactgg tattccggta 60

cctttgtgcg cctgttttat acacccttcc caagtgtaac ttagaagctt atcacacacg 120

gtcaacaggt gactcagtat gccaactggg tcttgatcaa gcacttctgt ttccccggac 180

tgagtatcaa taagctgctc acgcggctga aggagaaaac gttcgttaac cggccaatta 240

cttcgagaaa cctagtaaca ccatggaggt tgcgcagtgt ttcgctccac acaaccccag 300

tgtagatcag gccgatgagt caccgcactc ctcacgggcg accgtggcgg tggctgcgct 360

ggcggcctgc ccatgggata acccatggga cgcttcaata ctgacatggt gcgaagagtc 420

tattgagcta attggtagtc ctccggcccc tgaatgcggc taatcctaac tgcggagcag 480

atacccacac gccagtgggc agtctgtcgt aatgggcaac tctgcagcgg aaccgactac 540

tttgggtgtc cgtgtttcct tttatttta tactggctgc ttatggtgac aattgagaga 600

ttgttaccat atagctattg gattggccat ccagtgacaa acagagcgat tatttattta 660

tttgttggtt atatcccatt aagccaaaag gccctagtta ctctcaactt tatactattg 720

cttaatacaa cgaaatggga gctcaggtgt ctacacaaaa gacgggtgca catgagactg 780

gcttgaatgc cagcggcaat tctgtcatcc attacaccaa catcaattac tacaaggatg 840

ctgcatccaa ctccgcaaat aggcaagact tcacacaaga cccaggtaag ttcactgaac 900

ctgtaaagga catcatggtg aaaactatgc ctgcgttgaa ctcaccctct gctgaggaat 960

gcggctacag tgacagagtg cgttccatca cattaggtaa ttccactatc accacccaag 1020

agtgtgccaa cgtggtcgtc gggtacggag tgtggccaga gtatctaaaa gacaacgagg 1080

ccacagccga agatcagccc acacaacctg atgtggccac ctgccgcttc tatactttag 1140

aatcagtgca gtggatgaaa aattcggccg ggtggtggtg gaagctgcct gatgcactgt 1200

cacagatggg cttgtttggt caaaacatgc agtaccacta cttgggaaga acagggtata 1260

ctatacacgt acaatgcaat gcctcaaagt tccatcaagg atgcctgctt gtagtgtgtg 1320

tgcctgaagc tgagatgggg tgctctaact tgaacaacac gcccgaattc agtgagttat 1380

ccggaggaga cagtgccaga atgttcaccg atacacaggt cggggagtca aacgccaaga 1440

aagtacagac agcggtgtgg aacgccggaa tgggcgttgg agtgggtaat ctcactattt 1500

tccctcacca atggatcaac ctgaggacca acaacagtgc aacgctagtg atgccttaca 1560

taaacagcgt ccccatggat aacatgttca ggcacaataa cttaacacta atgattatcc 1620

catttgtacc gcttaattac agcgagggat cctcaccgta cgtgcccata acagtcacca 1680

tcgctcctat gtgtgcagag tacaacgggc tacggctggc cagcaaccag ggtctaccag 1740

ttatgacaac acctgggagc acgcaatttc taacttcaga tgacttccag tcaccgtcag 1800
cgatgccaca gtttgatgtc accccagaga tgcaaatacc aggccgcgta aataatttga 1860
tggagattgc cgaggtggac tcagtggtgc ctgtgaataa cacagaggac aacgtgagta 1920
gccttaaggc ataccagatt ccagtacagt ccaacagtga caatggtaag caggtttttg 1980
gttttccctt acaaccgggt gccaacaacg ttctgaatag aaccctcttg ggtgaaattc 2040
taaactatta cacccattgg agtggcagca taaaacttac attcatgttc tgtgggtctg 2100
ccatggccac tggcaagttc cttctggcat actcaccacc tggagcagga gtcccgaaaa 2160

accgaaaaga tgctatgctg ggcacccacg tcatatggga tgttgggtta caatcaagct 2220
gcgtgttgtg cgtaccgtgg attagccaaa cacactacag atacgtggtt gaggatgaat 2280
acacagcagc cggatatgtt acatgctggt atcaaacaaa tatcgtggtg ccagctgatg 2340
tgcaaagctc atgtgacatc ttgtgctttg tttcagcctg caacgatttc tctgtgcgga 2400
tgctgaaaga tacgcccttt ataagacagg acacatttta tcacggccca gtggaggagt 2460
ctgtggatcg tgcagtggca cgtgtggcgg acacgattag ttcacggccc actaactcgg 2520
agtcaattcc agcgctcacc gccgccgaga ctgggcatac ctcccaagtt gtgcctagcg 2580

acaccatgca aacaagacat gtgaaaaact accactcacg gtccgaatcg tccattgaaa 2640
atttcctatg ccggtctgcc tgtgtatact atgccacata caccaataac tcaaaaaaag 2700
aggggtttgc agagtgggtt atcaacacta gacaggtggc acagctaaga agaaagttgg 2760
agctcttcac atatctaagg tttgacttag aactaacatt tgttataacg agcgcacaac 2820
aacccagtac cgcctccagt gtagacgctc ccgtgcaaac ccatcagatt atgtatgtgc 2880
ctccaggtgg ccctgtacca acaaaggtta aagattatgc atggcaaact tccacaaacc 2940
ccagcgtttt ctggacagaa ggaaacgccc caccaaggat gtccatccca ttcattagca 3000

ttggtaatgc gtatagttgt ttttatgatg ggtggacgca gttttcaaga aacggggtct 3060
atggcatcaa taccctcaac aacatgggca cgttgtatat gaggcatgtc aatgaagcgg 3120
ggcagggtcc aatcaaaagt actgttagaa tatatttcaa acccaagcac gtgaaggcgt 3180
gggtgccacg tccgccaaga ttgtgtcaat atgagaagca gaaaaatgtc aattttagcc 3240
ctataggagt aaccacaagt agaacggaca ttataacaac aggcactttt ggtcagcagt 3300
ccggagcgat atatgtgggc aattacagga tagtcaatag gcacctggca acacactttg 3360
actggcaaaa ttgcatatgg gaggattaca acagggacct cctagtatgc actacaacgg 3420

cgcacggttg tgacaatatt gcaagatgcc agtgcacagc aggtgtgtat tattgtgctt 3480

ctaggaacaa gcattacccg gtgcattttg aaggaccagg cttggtggag gtccaggaaa 3540

gtgaatatta tccaaaaagg tatcaatcac acgtgcttct tgccgcaggg ttttctgagc 3600

cgggggattg tggtggtatt ctcaggtgtg aacatggtgt tataggcatc gtgaccatgg 3660

gtggtgaggg tgttgtcggc tttgccgatg tgcgcgatct cttatggctg gaagacgacg 3720

caatggaaca gggagtcagg gactacgtgg aacagcttgg aaacgccttt ggttctgggt 3780

ttaccaacca gatttgcgag caagtcaatc tgttaaaaga gtcactaata ggccaagact 3840

ccatcttgga aaaatcactc aaggcattag tgaaaatcat atcagcactg gttatcgtgg 3900

tgagaaacca cgatgacctc ataacagtca ctgccacctt agccctgatt ggctgtacca 3960

cttcaccgtg gcggtggcta aagaaaaaag tgactcaata ctatgggatt cccatggccg 4020

agagacagaa caatggctgg ctcaagaaat tcacagaaat gaccaatgca tgcaagggca 4080

tggaatggat cgccatcaaa atccaaaagt tcattgagtg gctcaaaatt aagatcttgc 4140

cagaagtaaa ggaaaaacac gagtttctta ccagacttaa gcaactccca ctcttagaaa 4200

gccaaattgc caccatcgag cagagtgcac catcacagag tgatcaggaa caactgttct 4260

ccaatataca gtacttcgcg cactattgca gaaagtacgc cccactgtac gcagctgagg 4320

caaaaagagt gttctctcta gaaaagaaaa tgagcaacta catacagttc aagtccaaat 4380

gccgtattga accagtctgt ttattgctcc atggtagccc tggagccgga aaatccgtgg 4440

ctaccaattt gattggacgc tcacttgcag agaagctcaa cagttcagtg tattcattgc 4500

caccagaccc agaccatttt gacggctata aacaacaagc tgtcgtaatc atggatgacc 4560

tgtgccagaa cccagatggg aaagacgtgt ccttgttctg ccagatggtt tcaagtgtag 4620

actttgttcc accaatggca gcacttgagg agaaaggcat actcttcaca tcgcctttcg 4680

tgctcgcctc taccaacgca ggttccatca acgctcccac tgtgtcagac agcagagccc 4740

ttgctagaag gttccacttc gacttgaaca ttgaggtcat ctcaatgtac agccagaatg 4800

gcaaaatcaa catgccaatg tcagtgaagg cttgtgatga tgagtgttgt ccagttaatt 4860

tcaagaggtg ttgtccatta gtgtgcggta aggccattca gttcattgac agaagaacac 4920

aaatgaggta ttcactagac atgcttgtaa ctgaaatgtt cagggagtac aaccacagac 4980

atagtgtggg ggcaacactc gaggcactct tccaaggccc acccgtgtac aaagagatca 5040

agatcagtgt tgcgccagaa acccctcccc caccggcaat agcagatctg ctgaaatctg 5100

tggacagtga agcagttaga gagtactgca aggaaaaggg atggttggtg cctgagatca 5160

attccactct acaaattgaa aagcacgtga gcagggcctt catttgcctg caagcgctca 5220

ccacgtttgt ttccgtggcg gggataattt acatcatata caaattgttt gctggcttcc 5280

aggggggccta caccggtatg ccaaaccaaa aacctaaagt accaactttg aggcaggcta 5340

aggtgcaggg accggcattc gaattcgctg tggcaatgat gaaaagaaat gctagcacag 5400

tgaagaccga gtacggtgag ttcacaatgc ttggaatcta tgacaggtgg gcagtgctac 5460

ctcgtcacgc tagaccaggg cctaccatcc taatgaatga ccaggaagtg ggtgtggtgg 5520

atgccaagga gttagtggac aaggatggca ccaatttaga attaacactc ttgaagctca 5580

atagaaatga gaaattcaga gacatccgag gcttcttaac acgtgaggag gccgaagtca 5640

acgaggctgt gcttgctatt aacaccagca agttcccaaa tatgtacatt ccagttgggc 5700

aagtaacaga ttatggcttc ctcaacttgg gtggcacacc aactaagcgc atgctgatgt 5760

acaacttccc aacacgtgca ggccaatgtg ggggagttct aatgtctaca ggtaaagtgc 5820

tcggaataca cgtcggtggt aatggacacc aagggttttc ggcagccctg ttacgccact 5880

atttcaatga cgagcaggga gagattgagt tcatcgagag ctctaaggat gcaggctttc 5940

cagtcattaa cacacctagc aaaacaaagc tcgagcccag tgttttccat cacgtgtttg 6000

agggaaacaa agaaccagca gtgttgagga atggagaccc aagactgaaa gccaattttg 6060

aggaagccat tttctccaag tacatcggga atgtgaacac acatgtagac gagtacatga 6120

tggaagccgt cgaccattat gcaggacagt tagctacttt agatatcagt acagaaccta 6180

tgaagcttga ggatgctgtc tacggtactg agggcttgga agctctggac ttgaccacta 6240

gtgctgggta tccctatgtc gcccttggta taaaaaagag agacatctta tccaaaaagt 6300

ctaaggacct gtctaaactg agagagtgta tggacaagta tgggttaaac ctccctatgg 6360

tcacctatgt gaaggatgaa ttgaggtcag cagagaaagt ggctaagggc aaatccagac 6420

taatcgaggc gtccagttta aatgactcag tggcaatgag acagactttc ggtaacctgt 6480

ataagacatt ccatctgaac ccgggcatag tgactggcag tgcagttgga tgcgatcccg 6540

acttgttctg gagcaagatt ccagtcatgc tcgatggtca cctcatcgcc tttgactaca 6600

gtggatatga tgccagcctg agtccggtgt ggtttgcttg cttgaaactg ttgttggaaa 6660

agctggggta ctcacacaag gaaactaatt acatagatta cttgtgcaac tcccaccatt 6720

tgtacagaga caagcactac tttgtgaggg gaggaatgcc atccgggtgt tctggaacca 6780

gcattttcaa ttcaatgatt aataacataa tcatcagaac actgatgttg aaggtgtaca 6840

aagggataga tctagaccaa tttaggatga ttgcatatgg tgacgacgtc attgcttcgt 6900

acccgtatcc aattgatgcg tcattgctgg ctgaggctgg caaggggtat ggtctgatta 6960

tgacaccagc agacaaagga gagtgtttca atgaagtaac gtggaccaac gtcactttcc 7020

tgaaaagata cttcagagcg gatgagcaat atcccttcct cgttcaccca gtgatgccaa 7080

tgaaggacat tcatgagtca attaggtgga ctaaagaccc caaaaacacc caagatcacg 7140

tgcgatcctt gtgcttattg gcctggcaca atggagagca agaatatgag aattttgtat 7200

ccaaaatcag aagcgtccca gttgggcgct gcttgacatt gcctgcgttc tcgactctgc 7260
gcaggaagtg gttggattcc ttctaaaata cagctggttg aaggggacca acgatacagc 7320
tggttgaagg ggaccaaacc ggtccacaca cttccttaca ttccatcacc cacacacttc 7380
cttacattcc atgaagtaca atgtgattta actcaattgg cttaacccta ccacacttac 7440
cgaactagat aacggtgtgg taggggtaaa ttc 7473

<210> 10

<211> 7848

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA sequence of CVB1-GM-CSF

<400> 10

tcctgtgggt tgatcccacc cacagggccc actgggcgct agcacactgg tattccggta 60
cctttgtgcg cctgttttat acacccttcc caagtgtaac ttagaagctt atcacacacg 120
gtcaacaggt gactcagtat gccaactggg tcttgatcaa gcacttctgt ttccccggac 180
tgagtatcaa taagctgctc acgcggctga aggagaaaac gttcgttaac cggccaatta 240
cttcgagaaa cctagtaaca ccatggaggt tgcgcagtgt ttcgctccac acaaccccag 300
tgtagatcag gccgatgagt caccgcactc ctcacgggcg accgtggcgg tggctgcgct 360
ggcggcctgc ccatgggata acccatggga cgcttcaata ctgacatggt gcgaagagtc 420

tattgagcta attggtagtc ctccggcccc tgaatgcggc taatcctaac tgcggagcag 480
atacccacac gccagtgggc agtctgtcgt aatgggcaac tctgcagcgg aaccgactac 540
tttgggtgtc cgtgtttcct tttatttta tactggctgc ttatggtgac aattgagaga 600
ttgttaccat atagctattg gattggccat ccagtgacaa acagagcgat tatttattta 660
tttgttggtt atatcccatt aagccaaaag gccctagtta ctctcaactt tatactattg 720
cttaatacaa cgaaatggga gctcaggtgt ctacacaaaa gacgggtgca catgagactg 780
gcttgaatgc cagcggcaat tctgtcatcc attacaccaa catcaattac tacaaggatg 840

ctgcatccaa ctccgcaaat aggcaagact tcacacaaga cccaggtaag ttcactgaac 900
ctgtaaagga catcatggtg aaaactatgc ctgcgttgaa ctcaccctct gctgaggaat 960
gcggctacag tgacagagtg cgttccatca cattaggtaa ttccactatc accacccaag 1020
agtgtgccaa cgtggtcgtc gggtacggag tgtggccaga gtatctaaaa gacaacgagg 1080
ccacagccga agatcagccc acacaacctg atgtggccac ctgccgcttc tatactttag 1140

aatcagtgca gtggatgaaa aattcggccg ggtggtggtg gaagctgcct gatgcactgt 1200

cacagatggg cttgtttggt caaaacatgc agtaccacta cttgggaaga acagggtata 1260

ctatacacgt acaatgcaat gcctcaaagt tccatcaagg atgcctgctt gtagtgtgtg 1320

tgcctgaagc tgagatgggg tgctctaact tgaacaacac gcccgaattc agtgagttat 1380

ccggaggaga cagtgccaga atgttcaccg atacacaggt cggggagtca aacgccaaga 1440

aagtacagac agcggtgtgg aacgccggaa tgggcgttgg agtgggtaat ctcactattt 1500

tccctcacca atggatcaac ctgaggacca acaacagtgc aacgctagtg atgccttaca 1560

taaacagcgt ccccatggat aacatgttca ggcacaataa cttaacacta atgattatcc 1620

catttgtacc gcttaattac agcgagggat cctcaccgta cgtgcccata acagtcacca 1680

tcgctcctat gtgtgcagag tacaacgggc tacggctggc cagcaaccag ggtctaccag 1740

ttatgacaac acctgggagc acgcaatttc taacttcaga tgacttccag tcaccgtcag 1800

cgatgccaca gtttgatgtc accccagaga tgcaaatacc aggccgcgta aataatttga 1860

tggagattgc cgaggtggac tcagtggtgc ctgtgaataa cacagaggac aacgtgagta 1920

gccttaaggc ataccagatt ccagtacagt ccaacagtga caatggtaag caggtttttg 1980

gttttccctt acaaccgggt gccaacaacg ttctgaatag aaccctcttg ggtgaaattc 2040

taaactatta cacccattgg agtggcagca taaaacttac attcatgttc tgtgggtctg 2100

ccatggccac tggcaagttc cttctggcat actcaccacc tggagcagga gtcccgaaaa 2160

accgaaaaga tgctatgctg ggcacccacg tcatatggga tgttgggtta caatcaagct 2220

gcgtgttgtg cgtaccgtgg attagccaaa cacactacag atacgtggtt gaggatgaat 2280

acacagcagc cggatatgtt acatgctggt atcaaacaaa tatcgtggtg ccagctgatg 2340

tgcaaagctc atgtgacatc ttgtgctttg tttcagcctg caacgatttc tctgtgcgga 2400

tgctgaaaga tacgcccttt ataagacagg acacatttta tcacggccca gtggaggagt 2460

ctgtggatcg tgcagtggca cgtgtggcgg acacgattag ttcacggccc actaactcgg 2520

agtcaattcc agcgctcacc gccgccgaga ctgggcatac ctcccaagtt gtgcctagcg 2580

acaccatgca aacaagacat gtgaaaaact accactcacg gtccgaatcg tccattgaaa 2640

atttcctatg ccggtctgcc tgtgtatact atgccacata caccaataac tcaaaaaaag 2700

aggggtttgc agagtgggtt atcaacacta gacaggtggc acagctaaga agaaagttgg 2760

agctcttcac atatctaagg tttgacttag aactaacatt tgttataacg agcgcacaac 2820

aacccagtac cgcctccagt gtagacgctc ccgtgcaaac ccatcagatt atgtatgtgc 2880

ctccaggtgg ccctgtacca acaaaggtta aagattatgc atggcaaact tccacaaacc 2940

ccagcgtttt ctggacagaa ggaaacgccc caccaaggat gtccatccca ttcattagca 3000
ttggtaatgc gtatagttgt ttttatgatg ggtggacgca gttttcaaga aacggggtct 3060
atggcatcaa taccctcaac aacatgggca cgttgtatat gaggcatgtc aatgaagcgg 3120
ggcagggtcc aatcaaaagt actgttagaa tatatttcaa acccaagcac gtgaaggcgt 3180
gggtgccacg tccgccaaga ttgtgtcaat atgagaagca gaaaaatgtc aattttagcc 3240
ctataggagt aaccacaagt agaacggaca ttataacaac aggcactttt ggtcagcagt 3300
ggctgcagag cctgctgctc ttgggcactg tggcctgcag catctctgca cccgcccgct 3360

cgcccagccc cagcacgcag ccctgggagc atgtgaatgc catccaggag gcccggcgtc 3420
tcctgaacct gagtagagac actgctgctg agatgaatga aacagtagaa gtcatctcag 3480
aaatgtttga cctccaggag ccgacctgcc tacagacccg cctggagctg tacaagcagg 3540
gcctgcgggg cagcctcacc aagctcaagg gccccttgac catgatggcc agccactaca 3600
agcagcactg ccctccaacc ccggaaactt cctgtgcaac ccagattatc acctttgaaa 3660
gtttcaaaga gaacctgaag gactttctgc ttgtcatccc ctttgactgc tgggagccag 3720
tccaggagac cacaagtaga acggacatta taacaacagg cacttttggt cagcagtccg 3780

gagcgatata tgtgggcaat tacaggatag tcaataggca cctggcaaca cactttgact 3840
ggcaaaattg catatgggag gattacaaca gggacctcct agtatgcact acaacggcgc 3900
acggttgtga caatattgca agatgccagt gcacagcagg tgtgtattat tgtgcttcta 3960
ggaacaagca ttacccggtg cattttgaag gaccaggctt ggtggaggtc caggaaagtg 4020
aatattatcc aaaaaggtat caatcacacg tgcttcttgc cgcagggttt tctgagccgg 4080
gggattgtgg tggtattctc aggtgtgaac atggtgttat aggcatcgtg accatgggtg 4140
gtgagggtgt tgtcggcttt gccgatgtgc gcgatctctt atggctggaa gacgacgcaa 4200

tggaacaggg agtcagggac tacgtggaac agcttggaaa cgcctttggt tctgggttta 4260
ccaaccagat ttgcgagcaa gtcaatctgt taaaagagtc actaataggc caagactcca 4320
tcttggaaaa atcactcaag gcattagtga aaatcatatc agcactggtt atcgtggtga 4380
gaaaccacga tgacctcata acagtcactg ccaccttagc cctgattggc tgtaccactt 4440
caccgtggcg gtggctaaag aaaaaagtga ctcaatacta tgggattccc atggccgaga 4500
gacagaacaa tggctggctc aagaaattca cagaaatgac caatgcatgc aagggcatgg 4560
aatggatcgc catcaaaatc caaaagttca ttgagtggct caaaattaag atcttgccag 4620

aagtaaagga aaaacacgag tttcttacca gacttaagca actcccactc ttagaaagcc 4680

aaattgccac catcgagcag agtgcaccat cacagagtga tcaggaacaa ctgttctcca 4740

atatacagta cttcgcgcac tattgcagaa agtacgcccc actgtacgca gctgaggcaa 4800

aaagagtgtt ctctctagaa aagaaaatga gcaactacat acagttcaag tccaaatgcc 4860

gtattgaacc agtctgttta ttgctccatg gtagccctgg agccggaaaa tccgtggcta 4920

ccaatttgat tggacgctca cttgcagaga agctcaacag ttcagtgtat tcattgccac 4980

cagacccaga ccattttgac ggctataaac aacaagctgt cgtaatcatg gatgacctgt 5040

gccagaaccc agatgggaaa gacgtgtcct tgttctgcca gatggtttca agtgtagact 5100

ttgttccacc aatggcagca cttgaggaga aaggcatact cttcacatcg cctttcgtgc 5160

tcgcctctac caacgcaggt tccatcaacg ctcccactgt gtcagacagc agagcccttg 5220

ctagaaggtt ccacttcgac ttgaacattg aggtcatctc aatgtacagc cagaatggca 5280

aaatcaacat gccaatgtca gtgaaggctt gtgatgatga gtgttgtcca gttaatttca 5340

agaggtgttg tccattagtg tgcggtaagg ccattcagtt cattgacaga agaacacaaa 5400

tgaggtattc actagacatg cttgtaactg aaatgttcag ggagtacaac cacagacata 5460

gtgtgggggc aacactcgag gcactcttcc aaggcccacc cgtgtacaaa gagatcaaga 5520

tcagtgttgc gccagaaacc cctcccccac cggcaatagc agatctgctg aaatctgtgg 5580

acagtgaagc agttagagag tactgcaagg aaaagggatg gttggtgcct gagatcaatt 5640

ccactctaca aattgaaaag cacgtgagca gggccttcat ttgcctgcaa gcgctcacca 5700

cgtttgtttc cgtggcgggg ataatttaca tcatatacaa attgtttgct ggcttccagg 5760

gggcctacac cggtatgcca aaccaaaaac ctaaagtacc aactttgagg caggctaagg 5820

tgcagggacc ggcattcgaa ttcgctgtgg caatgatgaa aagaaatgct agcacagtga 5880

agaccgagta cggtgagttc acaatgcttg gaatctatga caggtgggca gtgctacctc 5940

gtcacgctag accagggcct accatcctaa tgaatgacca ggaagtgggt gtggtggatg 6000

ccaaggagtt agtggacaag gatggcacca atttagaatt aacactcttg aagctcaata 6060

gaaatgagaa attcagagac atccgaggct tcttaacacg tgaggaggcc gaagtcaacg 6120

aggctgtgct tgctattaac accagcaagt tcccaaatat gtacattcca gttgggcaag 6180

taacagatta tggcttcctc aacttgggtg gcacaccaac taagcgcatg ctgatgtaca 6240

acttcccaac acgtgcaggc caatgtgggg gagttctaat gtctacaggt aaagtgctcg 6300

gaatacacgt cggtggtaat ggacaccaag ggttttcggc agccctgtta cgccactatt 6360

tcaatgacga gcagggagag attgagttca tcgagagctc taaggatgca ggctttccag 6420

tcattaacac acctagcaaa acaaagctcg agcccagtgt tttccatcac gtgtttgagg 6480

gaaacaaaga accagcagtg ttgaggaatg gagacccaag actgaaagcc aattttgagg 6540

aagccatttt ctccaagtac atcgggaatg tgaacacaca tgtagacgag tacatgatgg 6600

aagccgtcga ccattatgca ggacagttag ctactttaga tatcagtaca gaacctatga 6660

agcttgagga tgctgtctac ggtactgagg gcttggaagc tctggacttg accactagtg 6720

ctgggtatcc ctatgtcgcc cttggtataa aaaagagaga catcttatcc aaaaagtcta 6780

aggacctgtc taaactgaga gagtgtatgg acaagtatgg gttaaacctc cctatggtca 6840

cctatgtgaa ggatgaattg aggtcagcag agaaagtggc taagggcaaa tccagactaa 6900

tcgaggcgtc cagtttaaat gactcagtgg caatgagaca gactttcggt aacctgtata 6960

agacattcca tctgaacccg ggcatagtga ctggcagtgc agttggatgc gatcccgact 7020

tgttctggag caagattcca gtcatgctcg atggtcacct catcgccttt gactacagtg 7080

gatatgatgc cagcctgagt ccggtgtggt ttgcttgctt gaaactgttg ttggaaaagc 7140

tggggtactc acacaaggaa actaattaca tagattactt gtgcaactcc caccatttgt 7200

acagagacaa gcactacttt gtgaggggag gaatgccatc cgggtgttct ggaaccagca 7260

ttttcaattc aatgattaat aacataatca tcagaacact gatgttgaag gtgtacaaag 7320

ggatagatct agaccaattt aggatgattg catatggtga cgacgtcatt gcttcgtacc 7380

cgtatccaat tgatgcgtca ttgctggctg aggctggcaa ggggtatggt ctgattatga 7440

caccagcaga caaaggagag tgtttcaatg aagtaacgtg gaccaacgtc actttcctga 7500

aaagatactt cagagcggat gagcaatatc ccttcctcgt tcacccagtg atgccaatga 7560

aggacattca tgagtcaatt aggtggacta aagaccccaa aaacacccaa gatcacgtgc 7620

gatccttgtg cttattggcc tggcacaatg gagagcaaga atatgagaat tttgtatcca 7680

aaatcagaag cgtcccagtt gggcgctgct tgacattgcc tgcgttctcg actctgcgca 7740

ggaagtggtt ggattccttc taaaattgaa gtacaatgtg atttaactca attggcttaa 7800

ccctaccaca cttaccgaac tagataacgg tgtggtaggg gtaaattc 7848

<210> 11

<211> 8214

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA sequence of CVB1-Anti-PD1

<400> 11

tcctgtgggt tgatcccacc cacagggccc actgggcgct agcacactgg tattccggta 60

cctttgtgcg cctgttttat acacccttcc caagtgtaac ttagaagctt atcacacacg 120

gtcaacaggt gactcagtat gccaactggg tcttgatcaa gcacttctgt ttccccggac 180

tgagtatcaa taagctgctc acgcggctga aggagaaaac gttcgttaac cggccaatta 240

cttcgagaaa cctagtaaca ccatggaggt tgcgcagtgt ttcgctccac acaaccccag 300

tgtagatcag gccgatgagt caccgcactc ctcacgggcg accgtggcgg tggctgcgct 360

ggcggcctgc ccatgggata acccatggga cgcttcaata ctgacatggt gcgaagagtc 420

tattgagcta attggtagtc ctccggcccc tgaatgcggc taatcctaac tgcggagcag 480

atacccacac gccagtgggc agtctgtcgt aatgggcaac tctgcagcgg aaccgactac 540

tttgggtgtc cgtgtttcct tttatttta tactggctgc ttatggtgac aattgagaga 600

ttgttaccat atagctattg gattggccat ccagtgacaa acagagcgat tatttattta 660

tttgttggtt atatcccatt aagccaaaag gccctagtta ctctcaactt tatactattg 720

cttaatacaa cgaaatggga gctcaggtgt ctacacaaaa gacgggtgca catgagactg 780

gcttgaatgc cagcggcaat tctgtcatcc attacaccaa catcaattac tacaaggatg 840

ctgcatccaa ctccgcaaat aggcaagact tcacacaaga cccaggtaag ttcactgaac 900

ctgtaaagga catcatggtg aaaactatgc ctgcgttgaa ctcaccctct gctgaggaat 960

gcggctacag tgacagagtg cgttccatca cattaggtaa ttccactatc accacccaag 1020

agtgtgccaa cgtggtcgtc gggtacggag tgtggccaga gtatctaaaa gacaacgagg 1080

ccacagccga agatcagccc acacaacctg atgtggccac ctgccgcttc tatactttag 1140

aatcagtgca gtggatgaaa aattcggccg ggtggtggtg gaagctgcct gatgcactgt 1200

cacagatggg cttgtttggt caaaacatgc agtaccacta cttgggaaga acagggtata 1260

ctatacacgt acaatgcaat gcctcaaagt tccatcaagg atgcctgctt gtagtgtgtg 1320

tgcctgaagc tgagatgggg tgctctaact tgaacaacac gcccgaattc agtgagttat 1380

ccggaggaga cagtgccaga atgttcaccg atacacaggt cggggagtca aacgccaaga 1440

aagtacagac agcggtgtgg aacgccggaa tgggcgttgg agtgggtaat ctcactattt 1500

tccctcacca atggatcaac ctgaggacca acaacagtgc aacgctagtg atgccttaca 1560

taaacagcgt ccccatggat aacatgttca ggcacaataa cttaacacta atgattatcc 1620

catttgtacc gcttaattac agcgagggat cctcaccgta cgtgcccata acagtcacca 1680

tcgctcctat gtgtgcagag tacaacgggc tacggctggc cagcaaccag ggtctaccag 1740

ttatgacaac acctgggagc acgcaatttc taacttcaga tgacttccag tcaccgtcag 1800

cgatgccaca gtttgatgtc accccagaga tgcaaatacc aggccgcgta aataatttga 1860

tggagattgc cgaggtggac tcagtggtgc ctgtgaataa cacagaggac aacgtgagta 1920

gccttaaggc ataccagatt ccagtacagt ccaacagtga caatggtaag caggtttttg 1980

gttttccctt acaaccgggt gccaacaacg ttctgaatag aaccctcttg ggtgaaattc 2040

taaactatta cacccattgg agtggcagca taaaacttac attcatgttc tgtgggtctg 2100

ccatggccac tggcaagttc cttctggcat actcaccacc tggagcagga gtcccgaaaa 2160

accgaaaaga tgctatgctg ggcacccacg tcatatggga tgttgggtta caatcaagct 2220

gcgtgttgtg cgtaccgtgg attagccaaa cacactacag atacgtggtt gaggatgaat 2280

acacagcagc cggatatgtt acatgctggt atcaaacaaa tatcgtggtg ccagctgatg 2340

tgcaaagctc atgtgacatc ttgtgctttg tttcagcctg caacgatttc tctgtgcgga 2400

tgctgaaaga tacgcccttt ataagacagg acacatttta tcacggccca gtggaggagt 2460

ctgtggatcg tgcagtggca cgtgtggcgg acacgattag ttcacggccc actaactcgg 2520

agtcaattcc agcgctcacc gccgccgaga ctgggcatac ctcccaagtt gtgcctagcg 2580

acaccatgca aacaagacat gtgaaaaact accactcacg gtccgaatcg tccattgaaa 2640

atttcctatg ccggtctgcc tgtgtatact atgccacata caccaataac tcaaaaaaag 2700

aggggtttgc agagtgggtt atcaacacta gacaggtggc acagctaaga agaaagttgg 2760

agctcttcac atatctaagg tttgacttag aactaacatt tgttataacg agcgcacaac 2820

aacccagtac cgcctccagt gtagacgctc ccgtgcaaac ccatcagatt atgtatgtgc 2880

ctccaggtgg ccctgtacca acaaaggtta aagattatgc atggcaaact tccacaaacc 2940

ccagcgtttt ctggacagaa ggaaacgccc caccaaggat gtccatccca ttcattagca 3000

ttggtaatgc gtatagttgt ttttatgatg ggtggacgca gttttcaaga aacggggtct 3060

atggcatcaa taccctcaac aacatgggca cgttgtatat gaggcatgtc aatgaagcgg 3120

ggcagggtcc aatcaaaagt actgttagaa tatatttcaa acccaagcac gtgaaggcgt 3180

gggtgccacg tccgccaaga ttgtgtcaat atgagaagca gaaaaatgtc aattttagcc 3240

ctataggagt aaccacaagt agaacggaca ttataacaac aggcactttt ggtcagcaga 3300

tgaagcacct gtggttcttc ctgctgctgg tggccgctcc taggtgggtg ctgtcccagg 3360

tgcagctggt gcagagcggc gtggaggtga agaagcccgg cgcttccgtg aaggtgtcct 3420

gcaaggcctc cggctacacc ttcaccaact actacatgta ctgggtgagg caggcccctg 3480

gacagggact ggagtggatg ggcggcatca acccttccaa cggcggcacc aacttcaacg 3540

agaagttcaa gaaccgggtg accctgacca ccgactcctc caccaccacc gcctacatgg 3600

agctgaagtc cctgcagttt gacgacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg agggactacc 3660

ggttcgacat gggcttcgac tactggggcc agggcacaac cgtgaccgtg tccagcggag 3720

gtggcggatc tggaggggtg ggtagcggtg gaggcgggag tgagatcgtg ctgacccagt 3780

cccctgctac actgtccctg tcccccggcg agagggctac actgagctgc agggcctcca 3840
agggcgtgtc cacctccggc tactcctacc tgcactggta ccagcagaag cctggacagg 3900
ctcccaggct gctgatctac ctggcctcct acctggagtc cggcgtgcct gctaggtttt 3960
ccggcagcgg cagcggcacc gatttcaccc tgaccatctc ctccctggag cccgaggact 4020
tcgccgtgta ctactgccag cactccaggg atctgcctct gaccttcggc ggcggcacca 4080
aggtggagat caagaccaca agtagaacgg acattataac aacaggcact tttggtcagc 4140
agtccggagc gatatatgtg ggcaattaca ggatagtcaa taggcacctg gcaacacact 4200

ttgactggca aaattgcata tgggaggatt acaacaggga cctcctagta tgcactacaa 4260
cggcgcacgg ttgtgacaat attgcaagat gccagtgcac agcaggtgtg tattattgtg 4320
cttctaggaa caagcattac ccggtgcatt ttgaaggacc aggcttggtg gaggtccagg 4380
aaagtgaata ttatccaaaa aggtatcaat cacacgtgct tcttgccgca gggttttctg 4440
agccgggggа ttgtggtggt attctcaggt gtgaacatgg tgttataggc atcgtgacca 4500
tgggtggtga gggtgttgtc ggctttgccg atgtgcgcga tctcttatgg ctggaagacg 4560
acgcaatgga acagggagtc agggactacg tggaacagct tggaaacgcc tttggttctg 4620

ggtttaccaa ccagatttgc gagcaagtca atctgttaaa agagtcacta ataggccaag 4680
actccatctt ggaaaaatca ctcaaggcat tagtgaaaat catatcagca ctggttatcg 4740
tggtgagaaa ccacgatgac ctcataacag tcactgccac cttagccctg attggctgta 4800
ccacttcacc gtggcggtgg ctaaagaaaa aagtgactca atactatggg attcccatgg 4860
ccgagagaca gaacaatggc tggctcaaga aattcacaga aatgaccaat gcatgcaagg 4920
gcatggaatg gatcgccatc aaaatccaaa agttcattga gtggctcaaa attaagatct 4980
tgccagaagt aaaggaaaaa cacgagtttc ttaccagact taagcaactc ccactcttag 5040

aaagccaaat tgccaccatc gagcagagtg caccatcaca gagtgatcag gaacaactgt 5100
tctccaatat acagtacttc gcgcactatt gcagaaagta cgccccactg tacgcagctg 5160
aggcaaaaag agtgttctct ctagaaaaga aaatgagcaa ctacatacag ttcaagtcca 5220
aatgccgtat tgaaccagtc tgtttattgc tccatggtag ccctggagcc ggaaaatccg 5280
tggctaccaa tttgattgga cgctcacttg cagagaagct caacagttca gtgtattcat 5340
tgccaccaga cccagaccat tttgacggct ataaacaaca agctgtcgta atcatggatg 5400
acctgtgcca gaacccagat gggaaagacg tgtccttgtt ctgccagatg gtttcaagtg 5460

tagactttgt tccaccaatg gcagcacttg aggagaaagg catactcttc acatcgcctt 5520

tcgtgctcgc ctctaccaac gcaggttcca tcaacgctcc cactgtgtca gacagcagag 5580

cccttgctag aaggttccac ttcgacttga acattgaggt catctcaatg tacagccaga 5640

atggcaaaat caacatgcca atgtcagtga aggcttgtga tgatgagtgt tgtccagtta 5700

atttcaagag gtgttgtcca ttagtgtgcg gtaaggccat tcagttcatt gacagaagaa 5760

cacaaatgag gtattcacta gacatgcttg taactgaaat gttcagggag tacaaccaca 5820

gacatagtgt gggggcaaca ctcgaggcac tcttccaagg cccacccgtg tacaaagaga 5880

tcaagatcag tgttgcgcca gaaacccctc ccccaccggc aatagcagat ctgctgaaat 5940

ctgtggacag tgaagcagtt agagagtact gcaaggaaaa gggatggttg gtgcctgaga 6000

tcaattccac tctacaaatt gaaaagcacg tgagcagggc cttcatttgc ctgcaagcgc 6060

tcaccacgtt tgtttccgtg gcggggataa tttacatcat atacaaattg tttgctggct 6120

tccaggggggc ctacaccggt atgccaaacc aaaaacctaa agtaccaact ttgaggcagg 6180

ctaaggtgca gggaccggca ttcgaattcg ctgtggcaat gatgaaaaga aatgctagca 6240

cagtgaagac cgagtacggt gagttcacaa tgcttggaat ctatgacagg tgggcagtgc 6300

tacctcgtca cgctagacca gggcctacca tcctaatgaa tgaccaggaa gtgggtgtgg 6360

tggatgccaa ggagttagtg gacaaggatg gcaccaattt agaattaaca ctcttgaagc 6420

tcaatagaaa tgagaaattc agagacatcc gaggcttctt aacacgtgag gaggccgaag 6480

tcaacgaggc tgtgcttgct attaacacca gcaagttccc aaatatgtac attccagttg 6540

ggcaagtaac agattatggc ttcctcaact tgggtggcac accaactaag cgcatgctga 6600

tgtacaactt cccaacacgt gcaggccaat gtgggggagt tctaatgtct acaggtaaag 6660

tgctcggaat acacgtcggt ggtaatggac accaagggtt ttcggcagcc ctgttacgcc 6720

actatttcaa tgacgagcag ggagagattg agttcatcga gagctctaag gatgcaggct 6780

ttccagtcat taacacacct agcaaaacaa agctcgagcc cagtgttttc catcacgtgt 6840

ttgagggaaa caaagaacca gcagtgttga ggaatggaga cccaagactg aaagccaatt 6900

ttgaggaagc cattttctcc aagtacatcg ggaatgtgaa cacacatgta gacgagtaca 6960

tgatggaagc cgtcgaccat tatgcaggac agttagctac tttagatatc agtacagaac 7020

ctatgaagct tgaggatgct gtctacggta ctgagggctt ggaagctctg gacttgacca 7080

ctagtgctgg gtatccctat gtcgcccttg gtataaaaaa gagagacatc ttatccaaaa 7140

agtctaagga cctgtctaaa ctgagagagt gtatggacaa gtatgggtta aacctcccta 7200

tggtcaccta tgtgaaggat gaattgaggt cagcagagaa agtggctaag ggcaaatcca 7260

gactaatcga ggcgtccagt ttaaatgact cagtggcaat gagacagact ttcggtaacc 7320

tgtataagac attccatctg aacccgggca tagtgactgg cagtgcagtt ggatgcgatc 7380

ccgacttgtt ctggagcaag attccagtca tgctcgatgg tcacctcatc gcctttgact 7440

acagtggata tgatgccagc ctgagtccgg tgtggtttgc ttgcttgaaa ctgttgttgg 7500

aaaagctggg gtactcacac aaggaaacta attacataga ttacttgtgc aactcccacc 7560

atttgtacag agacaagcac tactttgtga ggggaggaat gccatccggg tgttctggaa 7620

ccagcatttt caattcaatg attaataaca taatcatcag aacactgatg ttgaaggtgt 7680

acaaagggat agatctagac caatttagga tgattgcata tggtgacgac gtcattgctt 7740

cgtacccgta tccaattgat gcgtcattgc tggctgaggc tggcaagggg tatggtctga 7800

ttatgacacc agcagacaaa ggagagtgtt tcaatgaagt aacgtggacc aacgtcactt 7860

tcctgaaaag atacttcaga gcggatgagc aatatccctt cctcgttcac ccagtgatgc 7920

caatgaagga cattcatgag tcaattaggt ggactaaaga ccccaaaaac acccaagatc 7980

acgtgcgatc cttgtgctta ttggcctggc acaatggaga gcaagaatat gagaattttg 8040

tatccaaaat cagaagcgtc ccagttgggc gctgcttgac attgcctgcg ttctcgactc 8100

tgcgcaggaa gtggttggat tccttctaaa attgaagtac aatgtgattt aactcaattg 8160

gcttaaccct accacactta ccgaactaga taacggtgtg gtaggggtaa attc 8214

<210> 12

<211> 7371

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Genomic sequence of CVB1-WT

<400> 12

uccugugggu ugaucccacc cacagggccc acugggcgcu agcacacugg uauuccggua 60

ccuuugugcg ccuguuuuau acacccuucc caaguguaac uuagaagcuu aucacacacg 120

gucaacaggu gacucaguau gccaacuggg ucuugaucaa gcacuucugu uucccggac 180

ugaguaucaa uaagcugcuc acgcggcuga aggagaaaac guucguuaac cggccaauua 240

cuucgagaaa ccuaguaaca ccauggaggu ugcgcagugu uucgcuccac acaacccag 300

uguagaucag gccgaugagu caccgcacuc cucacgggcg accguggcgg uggcugcgcu 360

ggcggccugc ccaugggaua acccauggga cgcuucaaua cugacauggu gcgaagaguc 420

uauugagcua auugguaguc cuccggcccc ugaaugcggc uaauccuaac ugcggagcag 480

auacccacac gccagugggc agucugucgu aaugggcaac ucugcagcgg aaccgacuac 540

uuuggguguc cguguuuccu uuuauuuuua uacuggcugc uuauggugac aauugagaga 600

uuguuaccau auagcuauug gauuggccau ccagugacaa acagagcgau uauuuauuua 660

uuuguugguu auaucccauu aagccaaaag gcccuaguua cucucaacuu uauacuauug 720

cuuaauacaa cgaaauggga gcucaggugu cuacacaaaa gacgggugca caugagacug 780

gcuugaaugc cagcggcaau ucugucaucc auuacaccaa caucaauuac uacaaggaug 840

cugcauccaa cuccgcaaau aggcaagacu ucacacaaga cccagguaag uucacugaac 900

cuguaaagga caucauggug aaaacuaugc cugcguugaa cucacccucu gcugaggaau 960

gcggcuacag ugacagagug cguuccauca cauuagguaa uuccacuauc accacccaag 1020

agugugccaa cguggucguc ggguacggag uguggccaga guaucuaaaa gacaacgagg 1080

ccacagccga agaucagccc acacaaccug auguggccac cugccgcuuc uauacuuuag 1140

aaucagugca guggaugaaa aauucggccg ggugguggug gaagcugccu gaugcacugu 1200

cacagauggg cuuguuuggu caaaacaugc aguaccacua cuugggaaga acaggguaua 1260

cuauacacgu acaaugcaau gccucaaagu uccaucaagg augccugcuu guagugugug 1320

ugccugaagc ugagaugggg ugcucuaacu ugaacaacac gcccgaauuc agugaguuau 1380

ccggaggaga cagugccaga auguucaccg auacacaggu cggggaguca aacgccaaga 1440

aaguacagac agcggugugg aacgccggaa ugggcguugg aguggguaau cucacuauuu 1500

ucccucacca auggaucaac cugaggacca acaacagugc aacgcuagug augccuuaca 1560

uaaacagcgu ccccauggau aacauguuca ggcacaauaa cuuaacacua augauuaucc 1620

cauuuguacc gcuuaauuac agcgagggau ccucaccgua cgugcccaua acagucacca 1680

ucgcuccuau gugugcagag uacaacgggc uacggcuggc cagcaaccag ggucuaccag 1740

uuaugacaac accugggagc acgcaauuuc uaacuucaga ugacuuccag ucaccgucag 1800

cgaugccaca guuugauguc accccagaga ugcaaauacc aggccgcgua aauaauuuga 1860

uggagauugc cgagguggac ucaguggugc cugugaauaa cacagaggac aacgugagua 1920

gccuuaaggc auaccagauu ccaguacagu ccaacaguga caaugguaag cagguuuuug 1980

guuuucccuu acaaccgggu gccaacaacg uucugaauag aacccucuug ggugaaauuc 2040

uaaacuauua cacccauugg aguggcagca uaaaacuuac auucauguuc ugugggucug 2100

ccauggccac uggcaaguuc cuucuggcau acucaccacc uggagcagga gucccgaaaa 2160

accgaaaaga ugcuaugcug ggcacccacg ucauauggga uguuggguua caaucaagcu 2220

gcguguugug cguaccgugg auuagccaaa cacacuacag auacgugguu gaggaugaau 2280

acacagcagc cggauauguu acaugcuggu aucaaacaaa uaucguggug ccagcugaug 2340

ugcaaagcuc augugacauc uugugcuuug uuucagccug caacgauuuc ucugugcgga 2400

ugcugaaaga uacgcccuuu auaagacagg acacauuuua ucacggccca guggaggagu 2460

cuguggaucg ugcaguggca cguguggcgg acacgauuag uucacggccc acuaacucgg 2520

agucaauucc agcgcucacc gccgccgaga cugggcauac cucccaaguu gugccuagcg 2580

acaccaugca aacaagacau gugaaaaacu accacucacg guccgaaucg uccauugaaa 2640

auuuccuaug ccggucugcc uguguauacu augccacaua caccaauaac ucaaaaaaag 2700

agggguuugc agaguggguu aucaacacua gacagguggc acagcuaaga agaaaguugg 2760

agcucuucac auaucuaagg uuugacuuag aacuaacauu uguuauaacg agcgcacaac 2820

aacccaguac cgccuccagu guagacgcuc ccgugcaaac ccaucagauu auguaugugc 2880

cuccaggugg cccuguacca acaaagguua aagauuaugc auggcaaacu uccacaaacc 2940

ccagcguuuu cuggacagaa ggaaacgccc caccaaggau guccauccca uucauuagca 3000

uugguaaugc guauaguugu uuuuaugaug gguggacgca guuuucaaga aacggggucu 3060

auggcaucaa uacccucaac aacaugggca cguuguauau gaggcauguc aaugaagcgg 3120

ggcagggucc aaucaaaagu acuguuagaa uauauuucaa acccaagcac gugaaggcgu 3180

gggugccacg uccgccaaga uuugugucaau augagaagca gaaaaauguc aauuuuagcc 3240

cuauaggagu aaccacaagu agaacggaca uuauaacaac aggcacuuuu ggucagcagu 3300

ccggagcgau auaugugggc aauuacagga uagucaauag gcaccuggca acacacuuug 3360

acuggcaaaa uugcauaugg gaggauuaca acagggaccu ccuaguaugc acuacaacgg 3420

cgcacgguug ugacaauauu gcaagaugcc agugcacagc aggugugguau uauugugcuu 3480

cuaggaacaa gcauuacccg gugcauuuug aaggaccagg cuugguggag guccaggaaa 3540

gugaauauua uccaaaaagg uaucaaucac acgugcuucu ugccgcaggg uuuucugagc 3600

cgggggauug ugguggguauu cucaggugug aacauggugu uauaggcauc gugaccaugg 3660

guggugaggg uguugucggc uuugccgaug ugcgcgaucu cuuauggcug gaagacgacg 3720

caauggaaca gggagucagg gacuacgugg aacagcuugg aaacgccuuu gguucugggu 3780

uuaccaacca gauuugcgag caagucaauc uguuaaaaga gucacuaaua ggccaagacu 3840

ccaucuugga aaaaucacuc aaggcauuag ugaaaaucau aucagcacug guuaucgugg 3900

ugagaaacca cgaugaccuc auaacaguca cugccaccuu agcccugauu ggcuguacca 3960

cuucaccgug gcgguggcua aagaaaaaag ugacucaaua cuaugggauu cccauggccg 4020

agagacagaa caauggcugg cucaagaaau ucacagaaau gaccaaugca ugcaagggca 4080

uggaauggau cgccaucaaa auccaaaagu ucauugagug gcucaaaauu aagaucuugc 4140

cagaaguaaa ggaaaaacac gaguuucuua ccagacuuaa gcaacuccca cucuuagaaa 4200

gccaaauugc caccaucgag cagagugcac caucacagag ugaucaggaa caacuguucu 4260

ccaauauaca guacuucgcg cacuauugca gaaaguacgc cccacuguac gcagcugagg 4320

caaaaagagu guucucucua gaaaagaaaa ugagcaacua cauacaguuc aaguccaaau 4380

gccguauuga accagucugu uuauugcucc augguagccc uggagccgga aaauccgugg 4440

cuaccaauuu gauuggacgc ucacuugcag agaagcucaa caguucagug uauucauugc 4500

caccagaccc agaccauuuu gacggcuaua aacaacaagc ugucguaauc auggaugacc 4560

ugugccagaa cccagauggg aaagacgugu ccuuguucug ccagaugguu ucaaguguag 4620

acuuuguucc accaauggca gcacuugagg agaaaggcau acucuucaca ucgccuuucg 4680

ugcucgccuc uaccaacgca gguuccauca acgcucccac ugugucagac agcagagccc 4740

uugcuagaag guuccacuuc gacuugaaca uugaggucau cucaauguac agccagaaug 4800

gcaaaaucaa caugccaaug ucagugaagg cuugugauga ugaguguugu ccaguuaauu 4860

ucaagaggug uuguccauua gugugcggua aggccauuca guucauugac agaagaacac 4920

aaaugaggua uucacuagac augcuuguaa cugaaauguu cagggaguac aaccacagac 4980

auaguguggg ggcaacacuc gaggcacucu uccaaggccc acccguguac aaagagauca 5040

agaucagugu ugcgccagaa accccucccc caccggcaau agcagaucug cugaaaucug 5100

uggacaguga agcaguuaga gaguacugca aggaaaaggg augguuggug ccugagauca 5160

auuccacucu acaaauugaa aagcacguga gcagggccuu cauuugccug caagcgcuca 5220

ccacguuugu uuccguggcg gggauaauuu acaucauaua caaauuguuu gcuggcuucc 5280

agggggccua caccgguaug ccaaaccaaa aaccuaaagu accaacuuug aggcaggcua 5340

aggugcaggg accggcauuc gaauucgcug uggcaaugau gaaaagaaau gcuagcacag 5400

ugaagaccga guacggugag uucacaaugc uuggaaucua ugacaggugg gcagugcuac 5460

cucgucacgc uagaccaggg ccuaccaucc uaaugaauga ccaggaagug gguguggugg 5520

augccaagga guuaguggac aaggauggca ccaauuuaga auuaacacuc uugaagcuca 5580

auagaaauga gaaauucaga gacauccgag gcuucuuaac acgugaggag gccgaaguca 5640

acgaggcugu gcuugcuauu aacaccagca aguucccaaa uauguacauu ccaguuuggc 5700

aaguaacaga uuauggcuuc cucaacuugg guggcacacc aacuaagcgc augcugaugu 5760

acaacuuccc aacacgugca ggccaaugug ggggaguucu aaugucuaca gguaaagugc 5820

ucggaauaca cgucgguggu aauggacacc aaggguuuuc ggcagcccug uuacgccacu 5880

auuucaauga cgagcaggga gagauugagu ucaucgagag cucuaaggau gcaggcuuuc 5940

cagucauuaa cacaccuagc aaaacaaagc ucgagcccag uguuuuccau cacguguuug 6000

agggaaacaa agaaccagca guguugagga auggagaccc aagacugaaa gccaauuuug 6060

aggaagccau uuucuccaag uacaucggga augugaacac acauguagac gaguacauga 6120

uggaagccgu cgaccauuau gcaggacagu uagcuacuuu agauaucagu acagaaccua 6180

ugaagcuuga ggaugcuguc uacgguacug agggcuugga agcucuggac uugaccacua 6240

gugcugggua ucccuauguc gcccuuggua uaaaaaagag agacaucuua uccaaaaagu 6300

cuaaggaccu gucuaaacug agagagugua uggacaagua uggguuaaac cucccuaugg 6360

ucaccuaugu gaaggaugaa uugaggucag cagagaaagu ggcuaagggc aaauccagac 6420

uaaucgaggc guccaguuua aaugacucag uggcaaugag acagacuuuc gguaaccugu 6480

auaagacauu ccaucugaac ccgggcauag ugacuggcag ugcaguugga ugcgaucccg 6540

acuuguucug gagcaagauu ccagucaugc ucgaugguca ccucaucgcc uuugacuaca 6600

guggauauga ugccagccug aguccggugu gguuugcuug cuugaaacug uuguuggaaa 6660

agcuggggua cucacacaag gaaacuaauu acauagauua cuugugcaac ucccaccauu 6720

uguacagaga caagcacuac uuugugaggg gaggaaugcc auccgggugu ucuggaacca 6780

gcauuuucaa uucaaugauu aauaacauaa ucaucagaac acugauguug aagguguaca 6840

aagggauaga ucuagaccaa uuuaggauga uugcauaugg ugacgacguc auugcuucgu 6900

acccguaucc aauugaugcg ucauugcugg cugaggcugg caagggguau ggucugauua 6960

ugacaccagc agacaaagga gaguguuuca augaaguaac guggaccaac gucacuuucc 7020

ugaaaagaua cuucagagcg gaugagcaau aucccuuccu cguucaccca gugaugccaa 7080

ugaaggacau ucaugaguca auuaggugga cuaaagaccc caaaaacacc caagaucacg 7140

ugcgauccuu gugcuuauug gccuggcaca auggagagca agaauaugag aauuuuguau 7200

ccaaaaucag aagcguccca guuggggcgcu gcuugacauu gccugcguuc ucgacucugc 7260

gcaggaagug guuggauucc uucuaaaauu gaaguacaau gugauuuaac ucaauuggcu 7320

uaacccuacc acacuuaccg aacuagauaa cgguguggua gggguaaauu c 7371

<210> 13

<211> 7251

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Genomic sequence of CVB1-HRV2

<400> 13

uccugugggu ugaucccacc cacagggccc acugggcgcu agcacacugg uauuccggua 60

ccuuugugcg ccuguuuuau acacccuucc caaguguaac uuagaagaac uuagaaguuu 120

uucacaaaga ccaauagccg guaaucagcc agauuacuga aggucaagca cuucuguuuc 180

cccggucaau guugauaugc uccaacaggg caaaaacaac ugcgaucguu aaccgcaaag 240

cgccuacgca aagcuuagua gcaucuuuga aaucguuugg cuggucgauc cgccauuucc 300

ccugguagac cuggcagaug aggcuagaaa uaccccacug gcgacagugu ucuagccugc 360

guggcugccu gcacacccua uggguguguga gccaaacaau ggacaaggug ugaagagccc 420

cgugugcucg cuuugagucc uccggccccu gaauguggcu aaccuuaacc cugcagcuag 480

agcacguaac ccaaugugua ucuagucgua augagcaauu gcgggauggg accaacuacu 540

uuggguguccc guguuucacu uuuuccuuua uauuugcuua uggugacaau auauacaaua 600

uauauauugg caccauggga gcucaggugu cuacacaaaa gacgggugca caugagacug 660

gcuugaaugc cagcggcaau ucugucaucc auuacaccaa caucaauuac uacaaggaug 720

cugcauccaa cuccgcaaau aggcaagacu ucacacaaga cccagguaag uucacugaac 780

cuguaaagga caucauggug aaaacuaugc cugcguugaa cucacccucu gcugaggaau 840

gcggcuacag ugacagagug cguuccauca cauuagguaa uuccacuauc accacccaag 900

agugugccaa cguggucguc ggguacggag uguggccaga guaucuaaaa gacaacgagg 960

ccacagccga agaucagccc acacaaccug auguggccac cugccgcuuc uauacuuuag 1020

aaucagugca guggaugaaa aauucggccg ggugguggug gaagcugccu gaugcacugu 1080

cacagauggg cuuguuuggu caaaacaugc aguaccacua cuugggaaga acaggguaua 1140

cuauacacgu acaaugcaau gccucaaagu uccaucaagg augccugcuu guagugugug 1200

ugccugaagc ugagaugggg ugcucuaacu ugaacaacac gcccgaauuc agugaguuau 1260

ccggaggaga cagugccaga auguucaccg auacacaggu cggggaguca aacgccaaga 1320

aaguacagac agcggugugg aacgccggaa ugggcguugg aguggguaau cucacuauuu 1380

ucccucacca auggaucaac cugaggacca acaacagugc aacgcuagug augccuuaca 1440

uaaacagcgu ccccauggau aacauguuca ggcacaauaa cuuaacacua augauuaucc 1500

cauuuguacc gcuuaauuac agcgagggau ccucaccgua cgugcccaua acagucacca 1560

ucgcuccuau gugugcagag uacaacgggc uacggcuggc cagcaaccag ggucuaccag 1620

uuaugacaac accugggagc acgcaauuuc uaacuucaga ugacuuccag ucaccgucag 1680

cgaugccaca guuugauguc accccagaga ugcaaauacc aggccgcgua aauaauuuga 1740

uggagauugc cgagguggac ucaguggugc cugugaauaa cacagaggac aacgugagua 1800

gccuuaaggc auaccagauu ccaguacagu ccaacaguga caaugguaag cagguuuuug 1860

guuuucccuu acaaccgggu gccaacaacg uucugaauag aacccucuug ggugaaauuc 1920

uaaacuauua cacccauugg aguggcagca uaaaacuuac auucauguuc uguggucug 1980

ccauggccac uggcaaguuc cuucuggcau acucaccacc uggagcagga gucccgaaaa 2040

accgaaaaga ugcuaugcug ggcacccacg ucauauggga uguuggguua caaucaagcu 2100

gcguguugug cguaccgugg auuagccaaa cacacuacag auacgugguu gaggaugaau 2160

acacagcagc cggauauguu acaugcuggu aucaaacaaa uaucguggug ccagcugaug 2220

ugcaaagcuc augugacauc uugugcuuug uuucagccug caacgauuuc ucugugcgga 2280

ugcugaaaga uacgcccuuu auaagacagg acacauuuua ucacggccca guggaggagu 2340

cuguggaucg ugcaguggca cguguggcgg acacgauuag uucacggccc acuaacucgg 2400

agucaauucc agcgcucacc gccgccgaga cugggcauac cucccaaguu gugccuagcg 2460

acaccaugca aacaagacau gugaaaaacu accacucacg guccgaaucg uccauugaaa 2520

auuuccuaug ccggucugcc uguguauacu augccacaua caccaauaac ucaaaaaaag 2580

agggguuugc agaguggguu aucaacacua gacagguggc acagcuaaga agaaaguugg 2640

agcucuucac auaucuaagg uuugacuuag aacuaacauu uguuauaacg agcgcacaac 2700

aacccaguac cgccuccagu guagacgcuc ccgugcaaac ccaucagauu auguaugugc 2760

cuccaggugg cccuguacca acaaagguua aagauuaugc auggcaaacu uccacaaacc 2820

ccagcguuuu cuggacagaa ggaaacgccc caccaaggau guccauccca uucauuagca 2880

uugguaaugc guauaguugu uuuuaugaug gguggacgca guuuucaaga aacggggucu 2940

auggcaucaa uacccucaac aacaugggca cguuguauau gaggcauguc aaugaagcgg 3000

ggcagggucc aaucaaaagu acuguuagaa uauauuucaa acccaagcac gugaaggcgu 3060

gggugccacg uccgccaaga uugugucaau augagaagca gaaaaauguc aauuuuagcc 3120

cuauaggagu aaccacaagu agaacggaca uuauaacaac aggcacuuuu ggucagcagu 3180

ccggagcgau auaugugggc aauuacagga uagucaauag gcaccuggca acacacuuug 3240

acuggcaaaa uugcauaugg gaggauuaca acagggaccu ccuaguaugc acuacaacgg 3300

cgcacgguug ugacaauauu gcaagaugcc agugcacagc aggugugguau uauugugcuu 3360

cuaggaacaa gcauuacccg gugcauuuug aaggaccagg cuugguggag guccaggaaa 3420

gugaauauua uccaaaaagg uaucaaucac acgugcuucu ugccgcaggg uuuucugagc 3480

cgggggauug ugguggguauu cucaggugug aacauggugu uauaggcauc gugaccaugg 3540

guggugaggg uguugucggc uuugccgaug ugcgcgaucu cuuauggcug gaagacgacg 3600

caauggaaca gggagucagg gacuacgugg aacagcuugg aaacgccuuu gguucugggu 3660

uuaccaacca gauuugcgag caagucaauc uguuaaaaga gucacuaaua ggccaagacu 3720

ccaucuugga aaaaucacuc aaggcauuag ugaaaaucau aucagcacug guuaucgugg 3780

ugagaaacca cgaugaccuc auaacaguca cugccaccuu agcccugauu ggcuguacca 3840

cuucaccgug gcgguggcua aagaaaaaag ugacucaaua cuaugggauu cccauggccg 3900

agagacagaa caauggcugg cucaagaaau ucacagaaau gaccaaugca ugcaagggca 3960

uggaauggau cgccaucaaa auccaaaagu ucauugagug gcucaaaauu aagaucuugc 4020

cagaaguaaa ggaaaaacac gaguuucuua ccagacuuaa gcaacuccca cucuuagaaa 4080

gccaaauugc caccaucgag cagagugcac caucacagag ugaucaggaa caacuguucu 4140

ccaauauaca guacuucgcg cacuauugca gaaaguacgc cccacuguac gcagcugagg 4200

caaaaagagu guucucucua gaaaagaaaa ugagcaacua cauacaguuc aaguccaaau 4260

gccguauuga accagucugu uuauugcucc augguagccc uggagccgga aaauccgugg 4320

cuaccaauuu gauuggacgc ucacuugcag agaagcucaa caguucagug uauucauugc 4380

caccagaccc agaccauuuu gacggcuaua aacaacaagc ugucguaauc auggaugacc 4440

ugugccagaa cccagauggg aaagacgugu ccuuguucug ccagaugguu ucaaguguag 4500

acuuuguucc accaauggca gcacuugagg agaaaggcau acucuucaca ucgccuuucg 4560

ugcucgccuc uaccaacgca gguuccauca acgcucccac ugugucagac agcagagccc 4620

uugcuagaag guuccacuuc gacuugaaca uugaggucau cucaauguac agccagaaug 4680

gcaaaaucaa caugccaaug ucagugaagg cuugugauga ugaguguugu ccaguuaauu 4740

ucaagaggug uuguccauua gugugcggua aggccauuca guucauugac agaagaacac 4800

aaaugaggua uucacuagac augcuuguaa cugaaauguu cagggaguac aaccacagac 4860

auaguguggg ggcaacacuc gaggcacucu uccaaggccc acccguguac aaagagauca 4920

agaucagugu ugcgccagaa accccucccc caccggcaau agcagaucug cugaaaucug 4980

uggacaguga agcaguuaga gaguacugca aggaaaaggg augguuggug ccugagauca 5040

auuccacucu acaaauugaa aagcacguga gcagggccuu cauuugccug caagcgcuca 5100

ccacguuugu uuccguggcg gggauaauuu acaucauaua caaauuguuu gcuggcuucc 5160

agggggccua caccgguaug ccaaaccaaa aaccuaaagu accaacuuug aggcaggcua 5220

aggugcaggg accggcauuc gaauucgcug uggcaaugau gaaaagaaau gcuagcacag 5280

ugaagaccga guacggugag uucacaaugc uuggaaucua ugacaggugg gcagugcuac 5340

cucgucacgc uagaccaggg ccuaccaucc uaaugaauga ccaggaagug gguguggugg 5400

augccaagga guuaguggac aaggauggca ccaauuuaga auuaacacuc uugaagcuca 5460

auagaaauga gaaauucaga gacauccgag gcuucuuaac acgugaggag gccgaaguca 5520

acgaggcugu gcuugcuauu aacaccagca aguucccaaa uauguacauu ccaguugggc 5580

aaguaacaga uuauggcuuc cucaacuugg guggcacacc aacuaagcgc augcugaugu 5640
acaacuuccc aacacgugca ggccaaugug ggggaguucu aaugucuaca gguaaagugc 5700
ucggaauaca cgucgguggu aauggacacc aaggguuuuc ggcagcccug uuacgccacu 5760
auuucaauga cgagcaggga gagauugagu ucaucgagag cucuaaggau gcaggcuuuc 5820
cagucauuaa cacaccuagc aaaacaaagc ucgagcccag uguuuuccau cacguguuug 5880
agggaaacaa agaaccagca guguugagga auggagaccc aagacugaaa gccaauuuug 5940
aggaagccau uuucuccaag uacaucggga augugaacac acauguagac gaguacauga 6000

uggaagccgu cgaccauuau gcaggacagu uagcuacuuu agauaucagu acagaaccua 6060
ugaagcuuga ggaugcuguc uacgguacug agggcuugga agcucuggac uugaccacua 6120
gugcugggua ucccuauguc gcccuuggua uaaaaaagag agacaucuua uccaaaaagu 6180
cuaaggaccu gucuaaacug agagagugua uggacaagua uggguuaaac cucccuaugg 6240
ucaccuaugu gaaggaugaa uugaggucag cagagaaagu ggcuaagggc aaauccagac 6300
uaaucgaggc guccaguuua aaugacucag uggcaaugag acagacuuuc gguaaccugu 6360
auaagacauu ccaucugaac ccgggcauag ugacuggcag ugcaguugga ugcgaucccg 6420

acuuguucug gagcaagauu ccagucaugc ucgaugguca ccucaucgcc uuugacuaca 6480
guggauauga ugccagccug aguccggugu gguuugcuug cuugaaacug uuguuggaaa 6540
agcuggggua cucacacaag gaaacuaauu acauagauua cuugugcaac ucccaccauu 6600
uguacagaga caagcacuac uuugugaggg gaggaaugcc auccgggugu ucuggaacca 6660
gcauuuucaa uucaaugauu aauaacauaa ucaucagaac acugauguug aagguguaca 6720
aagggauaga ucuagaccaa uuuaggauga uugcauaugg ugacgacguc auugcuucgu 6780
acccguaucc aauugaugcg ucauugcugg cugaggcugg caagggguau ggucugauua 6840

ugacaccagc agacaaagga gaguguuuca augaaguaac guggaccaac gucacuuucc 6900
ugaaaagaua cuucagagcg gaugagcaau aucccuuccu cguucaccca gugaugccaa 6960
ugaaggacau ucaugaguca auuaggugga cuaaagaccc caaaaacacc caagaucacg 7020
ugcgauccuu gugcuuauug gccuggcaca auggagagca agaauaugag aauuuuguau 7080
ccaaaaucag aagcguccca guuggggcgcu gcuugacauu gccugcguuc ucgacucugc 7140
gcaggaagug guuggauucc uucuaaaauu gaaguacaau gugauuuaac ucaauuggcu 7200
uaacccuacc acacuuaccg aacuagauaa cgguguggua gggguaaauu c 7251

<210> 14

<211> 7473

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Genomic sequence of CVB1-miR133&206T

<400> 14

uccuguggguugaucccacc cacagggccc acugggcgcu agcacacugg uauuccggua 60

ccuuugugcg ccuguuuuau acacccuucc caaguguaac uuagaagcuu aucacacacg 120

gucaacaggu gacucaguau gccaacuggg ucuugaucaa gcacuucugu uuccccggac 180

ugaguaucaa uaagcugcuc acgcggcuga aggagaaaac guucguuaac cggccaauua 240

cuucgagaaa ccuaguaaca ccauggaggu ugcgcagugu uucgcuccac acaaccccag 300

uguagaucag gccgaugagu caccgcacuc cucacgggcg accguggcgg uggcugcgcu 360

ggcggccugc ccaugggaua acccauggga cgcuucaaua cugacauggu gcgaagaguc 420

uauugagcua auugguaguc cuccggcccc ugaaugcggc uaauccuaac ugcggagcag 480

auacccacac gccagugggc agucugucgu aaugggcaac ucugcagcgg aaccgacuac 540

uuuggguguc cguguuuccu uuuauuuuua uacuggcugc uuauggugac aauugagaga 600

uuguuaccau auagcuauug gauuggccau ccagugacaa acagagcgau uauuuauuua 660

uuuguugguu auaucccauu aagccaaaag gcccuaguua cucucaacuu uauacuauug 720

cuuaauacaa cgaaauggga gcucaggugu cuacacaaaa gacgggugca caugagacug 780

gcuugaaugc cagcggcaau ucugucaucc auuacaccaa caucaauuac uacaaggaug 840

cugcauccaa cuccgcaaau aggcaagacu ucacacaaga cccagguaag uucacugaac 900

cuguaaagga caucauggug aaaacuaugc cugcguugaa cucacccucu gcugaggaau 960

gcggcuacag ugacagagug cguuccauca cauuagguaa uuccacuauc accacccaag 1020

agugugccaa cguggucguc ggguacggag uguggccaga guaucuaaaa gacaacgagg 1080

ccacagccga agaucagccc acacaaccug auguggccac cugccgcuuc uauacuuuag 1140

aaucagugca guggaugaaa aauucggccg ggugguggug gaagcugccu gaugcacugu 1200

cacagauggg cuuguuuggu caaaacaugc aguaccacua cuugggaaga acaggguaua 1260

cuauacacgu acaaugcaau gccucaaagu uccaucaagg augccugcuu guagugugug 1320

ugccugaagc ugagaugggg ugcucuaacu ugaacaacac gcccgaauuc agugaguuau 1380

ccggaggaga cagugccaga auguucaccg auacacaggu cggggaguca aacgccaaga 1440

aaguacagac agcggugugg aacgccggaa ugggcguugg aguggguaau cucacuauuu 1500

ucccucacca auggaucaac cugaggacca acaacagugc aacgcuagug augccuuaca 1560

uaaacagcgu ccccauggau aacauguuca ggcacaauaa cuuaacacua augauuaucc 1620
cauuuguacc gcuuaauuac agcgagggau ccucaccgua cgugcccaua acagucacca 1680
ucgcuccuau gugugcagag uacaacgggc uacggcuggc cagcaaccag ggucuaccag 1740
uuaugacaac accugggagc acgcaauuuc uaacuucaga ugacuuccag ucaccgucag 1800
cgaugccaca guuugauguc accccagaga ugcaaauacc aggccgcgua aauaauuuga 1860
uggagauugc cgagguggac ucaguggugc cugugaauaa cacagaggac aacgugagua 1920
gccuuaaggc auaccagauu ccaguacagu ccaacaguga caaugguaag cagguuuuug 1980

guuuucccuu acaaccgggu gccaacaacg uucugaauag aacccucuug ggugaaauuc 2040
uaaacuauua cacccauugg aguggcagca uaaaacuuac auucauguuc uguggucug 2100
ccauggccac uggcaaguuc cuucuggcau acucaccacc uggagcagga gucccgaaaa 2160
accgaaaaga ugcuaugcug ggcacccacg ucauauggga uguuggguua caaucaagcu 2220
gcguguugug cguaccgugg auuagccaaa cacacuacag auacgugguu gaggaugaau 2280
acacagcagc cggauauguu acaugcuggu aucaaacaaa uaucguggug ccagcugaug 2340
ugcaaagcuc augugacauc uugugcuuug uuucagccug caacgauuuc ucugugcgga 2400

ugcugaaaga uacgcccuuu auaagacagg acacauuuua ucacggccca guggaggagu 2460
cuguggaucg ugcaguggca cguguggcgg acacgauuag uucacggccc acuaacucgg 2520
agucaauucc agcgcucacc gccgccgaga cugggcauac cucccaaguu gugccuagcg 2580
acaccaugca aacaagacau gugaaaaacu accacucacg guccgaaucg uccauugaaa 2640
auuuccuaug ccggucugcc uguguauacu augccacaua caccaauaac ucaaaaaaag 2700
agggguuugc agaguggguu aucaacacua gacagguggc acagcuaaga agaaaguugg 2760
agcucuucac auaucuaagg uuugacuuag aacuaacauu uguuauaacg agcgcacaac 2820

aacccaguac cgccuccagu guagacgcuc ccgugcaaac ccaucagauu auguaugugc 2880
cuccaggugg cccuguacca acaaagguua aagauuaugc auggcaaacu uccacaaacc 2940
ccagcguuuu cuggacagaa ggaaacgccc caccaaggau guccauccca uucauuagca 3000
uugguaaugc guauaguugu uuuuaugaug gguggacgca guuuucaaga aacggggucu 3060
auggcaucaa uacccucaac aacaugggca cguuguauau gaggcauguc aaugaagcgg 3120
ggcagggucc aaucaaaagu acuguuagaa uauauuucaa acccaagcac gugaaggcgu 3180
gggugccacg uccgccaaga uuugucaau augagaagca gaaaaauguc aauuuuagcc 3240

cuauaggagu aaccacaagu agaacggaca uuauaacaac aggcacuuuu ggucagcagu 3300

ccggagcgau auaugugggc aauuacagga uagucaauag gcaccuggca acacacuuug 3360

acuggcaaaa uugcauaugg gaggauuaca acagggaccu ccuaguaugc acuacaacgg 3420

cgcacgguug ugacaauauu gcaagaugcc agugcacagc aggugugguau uauugugcuu 3480

cuaggaacaa gcauuacccg gugcauuuug aaggaccagg cuugguggag guccaggaaa 3540

gugaauauua uccaaaaagg uaucaaucac acgugcuucu ugccgcaggg uuuucugagc 3600

cgggggauug ugguggguauu cucaggugug aacauggugu uauaggcauc gugaccaugg 3660

guggugaggg uguugucggc uuugccgaug ugcgcgaucu cuuauggcug gaagacgacg 3720

caauggaaca gggagucagg gacuacgugg aacagcuugg aaacgccuuu gguucugggu 3780

uuaccaacca gauuugcgag caagucaauc uguuaaaaga gucacuaaua ggccaagacu 3840

ccaucuugga aaaaucacuc aaggcauuag ugaaaaucau aucagcacug guuaucgugg 3900

ugagaaacca cgaugaccuc auaacaguca cugccaccuu agcccugauu ggcuguacca 3960

cuucaccgug gcgguggcua aagaaaaaag ugacucaaua cuaugggauu cccauggccg 4020

agagacagaa caauggcugg cucaagaaau ucacagaaau gaccaaugca ugcaagggca 4080

uggaauggau cgccaucaaa auccaaaagu ucauugagug gcucaaaauu aagaucuugc 4140

cagaaguaaa ggaaaaacac gaguuucuua ccagacuuaa gcaacuccca cucuuagaaa 4200

gccaaauugc caccaucgag cagagugcac caucacagag ugaucaggaa caacuguucu 4260

ccaauauaca guacuucgcg cacuauugca gaaaguacgc cccacuguac gcagcugagg 4320

caaaaagagu guucucucua gaaaagaaaa ugagcaacua cauacaguuc aaguccaaau 4380

gccguauuga accagucugu uuauugcucc augguagccc uggagccgga aaauccgugg 4440

cuaccaauuu gauuggacgc ucacuugcag agaagcucaa caguucagug uauucauugc 4500

caccagaccc agaccauuuu gacggcuaua aacaacaagc ugucguaauc auggaugacc 4560

ugugccagaa cccagauggg aaagacgugu ccuuguucug ccagaugguu ucaaguguag 4620

acuuuguucc accaauggca gcacuugagg agaaaggcau acucuucaca ucgccuuucg 4680

ugcucgccuc uaccaacgca gguuccauca acgcucccac ugugucagac agcagagccc 4740

uugcuagaag guuccacuuc gacuugaaca uugaggucau cucaauguac agccagaaug 4800

gcaaaaucaa caugccaaug ucagugaagg cuugugauga ugaguguugu ccaguuaauu 4860

ucaagaggug uuguccauua gugugcggua aggccauuca guucauugac agaagaacac 4920

aaaugaggua uucacuagac augcuuguaa cugaaauguu cagggaguac aaccacagac 4980

auaguguggg ggcaacacuc gaggcacucu uccaaggccc acccguguac aaagagauca 5040

agaucagugu ugcgccagaa accccucccc caccggcaau agcagaucug cugaaaucug 5100

uggacaguga agcaguuaga gaguacugca aggaaaaggg augguuggug ccugagauca 5160

auuccacucu acaaauugaa aagcacguga gcagggccuu cauuugccug caagcgcuca 5220

ccacguuugu uuccguggcg gggauaauuu acaucauaua caaauuguuu gcuggcuucc 5280

agggggccua caccgguaug ccaaaccaaa aaccuaaagu accaacuuug aggcaggcua 5340

aggugcaggg accggcauuc gaauucgcug uggcaaugau gaaaagaaau gcuagcacag 5400

ugaagaccga guacggugag uucacaaugc uuggaaucua ugacaggugg gcagugcuac 5460

cucgucacgc uagaccaggg ccuaccaucc uaaugaauga ccaggaagug gguguggugg 5520

augccaagga guuaguggac aaggauggca ccaauuuaga auuaacacuc uugaagcuca 5580

auagaaauga gaaauucaga gacauccgag gcuucuuaac acgugaggag gccgaaguca 5640

acgaggcugu gcuugcuauu aacaccagca aguucccaaa uauguacauu ccaguugggc 5700

aaguaacaga uuauggcuuc cucaacuugg guggcacacc aacuaagcgc augcugaugu 5760

acaacuuccc aacacgugca ggccaaugug ggggaguucu aaugucuaca gguaaagugc 5820

ucggaauaca cgucgguggu aauggacacc aaggguuuuc ggcagcccug uuacgccacu 5880

auuucaauga cgagcaggga gagauugagu ucaucgagag cucuaaggau gcaggcuuuc 5940

cagucauuaa cacaccuagc aaaacaaagc ucgagcccag uguuuuccau cacguguuug 6000

agggaaacaa agaaccagca guguugagga auggagaccc aagacugaaa gccaauuuug 6060

aggaagccau uuucuccaag uacaucggga augugaacac acauguagac gaguacauga 6120

uggaagccgu cgaccauuau gcaggacagu uagcuacuuu agauaucagu acagaaccua 6180

ugaagcuuga ggaugcuguc uacgguacug agggcuugga agcucuggac uugaccacua 6240

gugcugggua ucccuauguc gcccuuggua uaaaaaagag agacaucuua uccaaaaagu 6300

cuaaggaccu gucuaaacug agagagugua uggacaagua uggguuaaac cucccuaugg 6360

ucaccuaugu gaaggaugaa uugaggucag cagagaaagu ggcuaagggc aaauccagac 6420

uaaucgaggc guccaguuua aaugacucag uggcaaugag acagacuuuc gguaaccugu 6480

auaagacauu ccaucugaac ccgggcauag ugacuggcag ugcaguugga ugcgaucccg 6540

acuuguucug gagcaagauu ccagucaugc ucgaugguca ccucaucgcc uuugacuaca 6600

guggauauga ugccagccug aguccggugu gguuugcuug cuugaaacug uuguuggaaa 6660

agcuggggua cucacacaag gaaacuaauu acauagauua cuugugcaac ucccaccauu 6720

uguacagaga caagcacuac uuugugaggg gaggaaugcc auccgggugu ucuggaacca 6780

gcauuuucaa uucaaugauu aauaacauaa ucaucagaac acugauguug aagguguaca 6840

aagggauaga ucuagaccaa uuuaggauga uugcauaugg ugacgacguc auugcuucgu 6900

acccguaucc aauugaugcg ucauugcugg cugaggcugg caaggguau ggucugauua 6960

ugacaccagc agacaaagga gaguguuuca augaaguaac guggaccaac gucacuuucc 7020

ugaaaagaua cuucagagcg gaugagcaau aucccuuccu cguucaccca gugaugccaa 7080

ugaaggacau ucaugaguca auuaggugga cuaaagaccc caaaaacacc caagaucacg 7140

ugcgauccuu gugcuuauug gccuggcaca auggagagca agaauaugag aauuuuguau 7200

ccaaaaucag aagcguccca guugggcgcu gcuugacauu gccugcguuc ucgacucugc 7260

gcaggaagug guuggauucc uucuaaaaua cagcugguug aaggggacca acgauacagc 7320

ugguugaagg ggaccaaacc gguccacaca cuuccuuaca uuccaucacc cacacacuuc 7380

cuuacauucc augaaguaca augugauuua acucaauugg cuuaacccua ccacacuuac 7440

cgaacuagau aacggugugg uaggguaaa uuc 7473

<210> 15

<211> 7848

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Genomic sequence of CVB1-GM-CSF

<400> 15

uccugugggu ugaucccacc cacagggccc acugggcgcu agcacacugg uauuccggua 60

ccuuugugcg ccuguuuuau acacccuucc caaguguaac uuagaagcuu aucacacacg 120

gucaacaggu gacucaguau gccaacuggg ucuugaucaa gcacuucugu uuccccggac 180

ugaguaucaa uaagcugcuc acgcggcuga aggagaaaac guucguuaac cggccaauua 240

cuucgagaaa ccuaguaaca ccauggaggu ugcgcagugu uucgcuccac acaaccccag 300

uguagaucag gccgaugagu caccgcacuc cucacgggcg accguggcgg uggcugcgcu 360

ggcggccugc ccaugggaua acccauggga cgcuucaaua cugacauggu gcgaagaguc 420

uauugagcua auugguaguc cuccggcccc ugaaugcggc uaauccuaac ugcggagcag 480

auacccacac gccagugggc agucugucgu aaugggcaac ucugcagcgg aaccgacuac 540

uuuggguguc cguguuuccu uuuauuuuua uacuggcugc uuauggugac aauugagaga 600

uuguuaccau auagcuauug gauuggccau ccagugacaa acagagcgau uauuuauuua 660

uuuguugguu auaucccauu aagccaaaag gcccuaguua cucucaacuu uauacuauug 720

cuuaauacaa cgaaauggga gcucaggugu cuacacaaaa gacgggugca caugagacug 780

gcuugaaugc cagcggcaau ucugucaucc auuacaccaa caucaauuac uacaaggaug 840

cugcauccaa cuccgcaaau aggcaagacu ucacacaaga cccagguaag uucacugaac 900

cuguaaagga caucauggug aaaacuaugc cugcguugaa cucacccucu gcugaggaau 960

gcggcuacag ugacagagug cguuccauca cauuagguaa uuccacuauc accacccaag 1020

agugugccaa cguggucguc ggguacggag uguggccaga guaucuaaaa gacaacgagg 1080

ccacagccga agaucagccc acacaaccug auguggccac cugccgcuuc uauacuuuag 1140

aaucagugca guggaugaaa aauucggccg ggugguggug gaagcugccu gaugcacugu 1200

cacagauggg cuuguuuggu caaaacaugc aguaccacua cuugggaaga acaggguaua 1260

cuauacacgu acaaugcaau gccucaaagu uccaucaagg augccugcuu guagugugug 1320

ugccugaagc ugagaugggg ugcucuaacu ugaacaacac gcccgaauuc agugaguuau 1380

ccggaggaga cagugccaga auguucaccg auacacaggu cggggaguca aacgccaaga 1440

aaguacagac agcggugugg aacgccggaa ugggcguugg aguggguaau cucacuauuu 1500

ucccucacca auggaucaac cugaggacca acaacagugc aacgcuagug augccuuaca 1560

uaaacagcgu ccccauggau aacauguuca ggcacaauaa cuuaacacua augauuaucc 1620

cauuuguacc gcuuaauuac agcgagggau ccucaccgua cgugcccaua acagucacca 1680

ucgcuccuau gugugcagag uacaacgggc uacggcuggc cagcaaccag ggucuaccag 1740

uuaugacaac accugggagc acgcaauuuc uaacuucaga ugacuuccag ucaccgucag 1800

cgaugccaca guuugauguc accccagaga ugcaaauacc aggccgcgua aauaauuuga 1860

uggagauugc cgagguggac ucaguggugc cugugaauaa cacagaggac aacgugagua 1920

gccuuaaggc auaccagauu ccaguacagu ccaacaguga caaugguaag cagguuuuug 1980

guuuucccuu acaaccgggu gccaacaacg uucugaauag aacccucuug ggugaaauuc 2040

uaaacuauua cacccauugg aguggcagca uaaaacuuac auucauguuc ugugggucug 2100

ccauggccac uggcaaguuc cuucuggcau acucaccacc uggagcagga gucccgaaaa 2160

accgaaaaga ugcuaugcug ggcacccacg ucauauggga uguuggguua caaucaagcu 2220

gcguguugug cguaccgugg auuagccaaa cacacuacag auacgugguu gaggaugaau 2280

acacagcagc cggauauguu acaugcuggu aucaaacaaa uaucguggug ccagcugaug 2340

ugcaaagcuc augugacauc uugugcuuug uuucagccug caacgauuuc ucugugcgga 2400

ugcugaaaga uacgcccuuu auaagacagg acacauuuua ucacggccca guggaggagu 2460

cuguggaucg ugcaguggca cguguggcgg acacgauuag uucacggccc acuaacucgg 2520

agucaauucc agcgcucacc gccgccgaga cugggcauac cucccaaguu gugccuagcg 2580

acaccaugca aacaagacau gugaaaaacu accacucacg guccgaaucg uccauugaaa 2640

auuuccuaug ccggucugcc uguguauacu augccacaua caccaauaac ucaaaaaaag 2700

aggggguuugc agaguggguu aucaacacua gacagguggc acagcuaaga agaaaguugg 2760

agcucuucac auaucuaagg uuugacuuag aacuaacauu uguuauaacg agcgcacaac 2820

aacccaguac cgccuccagu guagacgcuc ccgugcaaac ccaucagauu auguaugugc 2880

cuccaggugg cccuguacca acaaagguua aagauuaugc auggcaaacu uccacaaacc 2940

ccagcguuuu cuggacagaa ggaaacgccc caccaaggau guccauccca uucauuagca 3000

uugguaaugc guauaguugu uuuuaugaug gguggacgca guuuucaaga aacggggucu 3060

auggcaucaa uacccucaac aacaugggca cguuguauau gaggcauguc aaugaagcgg 3120

ggcagggucc aaucaaaagu acuguuagaa uauauuucaa acccaagcac gugaaggcgu 3180

gggugccacg uccgccaaga uugugucaau augagaagca gaaaaauguc aauuuuagcc 3240

cuauaggagu aaccacaagu agaacggaca uuauaacaac aggcacuuuu ggucagcagu 3300

ggcugcagag ccugcugcuc uugggcacug uggccugcag caucucugca cccgcccgcu 3360

cgcccagccc cagcacgcag cccugggagc augugaaugc cauccaggag gcccggcguc 3420

uccugaaccu gaguagagac acugcugcug agaugaauga aacaguagaa gucaucucag 3480

aaauguuuga ccuccaggag ccgaccugcc uacagacccg ccuggagcug uacaagcagg 3540

gccugcgggg cagccucacc aagcucaagg gccccuugac caugauggcc agccacuaca 3600

agcagcacug cccuccaacc ccggaaacuu ccugugcaac ccagauuauc accuuugaaa 3660

guuucaaaga gaaccugaag gacuuucugc uugucauccc cuuugacugc ugggagccag 3720

uccaggagac cacaaguaga acggacauua uaacaacagg cacuuuuggu cagcaguccg 3780

gagcgauaua ugugggcaau uacaggauag ucaauaggca ccuggcaaca cacuuugacu 3840

ggcaaaauug cauaugggag gauuacaaca gggaccuccu aguaugcacu acaacggcgc 3900

acgguuguga caauauugca agaugccagu gcacagcagg uguguauuau ugugcuucua 3960

ggaacaagca uuacccggug cauuuugaag gaccaggcuu gguggagguc caggaaagug 4020

aauauuaucc aaaaagguau caaucacacg ugcuucuugc cgcaggguuu ucugagccgg 4080

gggauugugg ugguauucuc aggugugaac augguguuau aggcaucgug accaugggug 4140

gugagggugu ugucggcuuu gccgaugugc gcgaucucuu auggcuggaa gacgacgcaa 4200

uggaacaggg agucagggac uacguggaac agcuuggaaa cgccuuuggu ucuggguuua 4260

ccaaccagau uugcgagcaa gucaaucugu uaaaagaguc acuaauaggc caagacucca 4320

ucuuggaaaa aucacucaag gcauuaguga aaaucauauc agcacugguu aucgugguga 4380

gaaaccacga ugaccucaua acagucacug ccaccuuagc ccugauuggc uguaccacuu 4440

caccguggcg guggcuaaag aaaaaaguga cucaauacua ugggauuccc auggccgaga 4500

gacagaacaa uggcuggcuc aagaaauuca cagaaaugac caaugcaugc aagggcaugg 4560

aauggaucgc caucaaaauc caaaaguuca uugaguggcu caaaauuaag aucuugccag 4620

aaguaaagga aaaacacgag uuucuuacca gacuuaagca acucccacuc uuagaaagcc 4680

aaauugccac caucgagcag agugcaccau cacagaguga ucaggaacaa cuguucucca 4740

auauacagua cuucgcgcac uauugcagaa aguacgcccc acuguacgca gcugaggcaa 4800

aaagaguguu cucucuagaa aagaaaauga gcaacuacau acaguucaag uccaaaugcc 4860

guauugaacc agucuguuua uugcuccaug guagcccugg agccggaaaa uccguggcua 4920

ccaauuugau uggacgcuca cuugcagaga agcucaacag uucaguguau ucauugccac 4980

cagacccaga ccauuuugac ggcuauaaac aacaagcugu cguaaucaug gaugaccugu 5040

gccagaaccc agaugggaaa gacguguccu uguucugcca gaugguuuca aguguagacu 5100

uuguuccacc aauggcagca cuugaggaga aaggcauacu cuucacaucg ccuuucgugc 5160

ucgccucuac caacgcaggu uccaucaacg cucccacugu gucagacagc agagcccuug 5220

cuagaagguu ccacuucgac uugaacauug aggucaucuc aauguacagc cagaauggca 5280

aaaucaacau gccaauguca gugaaggcuu gugaugauga guguugucca guuaauuuca 5340

agagguguug uccauuagug ugcgguaagg ccauucaguu cauugacaga agaacacaaa 5400

ugagguauuc acuagacaug cuuguaacug aaauguucag ggaguacaac cacagacaua 5460

gugugggggc aacacucgag gcacucuucc aaggcccacc cguguacaaa gagaucaaga 5520

ucaguguugc gccagaaacc ccucccccac cggcaauagc agaucugcug aaaucugugg 5580

acagugaagc aguuagagag uacugcaagg aaaagggaug guuggugccu gagaucaauu 5640

ccacucuaca aauugaaaag cacgugagca gggccuucau uugccugcaa gcgcucacca 5700

cguuuguuuc cguggcgggg auaauuuaca ucauauacaa auuguuugcu ggcuuccagg 5760

gggccuacac cgguaugcca aaccaaaaac cuaaaguacc aacuuugagg caggcuaagg 5820

ugcagggacc ggcauucgaa uucgcugugg caaugaugaa aagaaaugcu agcacaguga 5880

agaccgagua cggugaguuc acaaugcuug gaaucuauga cagggugggca gugcuaccuc 5940

gucacgcuag accagggccu accauccuaa ugaaugacca ggaaagugggu gugguggaug 6000

ccaaggaguu aguggacaag gauggcacca auuuagaauu aacacucuug aagcucaaua 6060

gaaaugagaa auucagagac auccgaggcu ucuuaacacg ugaggaggcc gaagucaacg 6120

aggcugugcu ugcuauuaac accagcaagu ucccaaauau guacauucca guuggggcaag 6180

uaacagauua uggcuuccuc aacuugggug gcacaccaac uaagcgcaug cugauguaca 6240

acuucccaac acgugcaggc caaugugggg gaguucuaau gucuacaggu aaagugcucg 6300

gaauacacgu cggugguaau ggacaccaag gguuuucggc agcccuguua cgccacuauu 6360

ucaaugacga gcagggagag auugaguuca ucgagagcuc uaaggaugca ggcuuuccag 6420

ucauuaacac accuagcaaa acaaagcucg agcccagugu uuuccaucac guguuugagg 6480

gaaacaaaga accagcagug uugaggaaug gagacccaag acugaaagcc aauuuugagg 6540

aagccauuuu cuccaaguac aucgggaaug ugaacacaca uguagacgag uacaugaugg 6600

aagccgucga ccauuaugca ggacaguuag cuacuuuaga uaucaguaca gaaccuauga 6660

agcuugagga ugcugucuac gguacugagg gcuuggaagc ucuggacuug accacuagug 6720

cuggguaucc cuaugucgcc cuugguauaa aaaagagaga caucuuaucc aaaaagucua 6780

aggaccuguc uaaacugaga gaguguaugg acaaguaugg guuaaaccuc ccuaugguca 6840

ccuaugugaa ggaugaauug aggucagcag agaaaguggc uaagggcaaa uccagacuaa 6900

ucgaggcguc caguuuaaau gacucagugg caaugagaca gacuuucggu aaccuguaua 6960

agacauucca ucugaacccg ggcauaguga cuggcagugc aguuggaugc gaucccgacu 7020

uguucuggag caagauucca gucaugcucg auggucaccu caucgccuuu gacuacagug 7080

gauaugaugc cagccugagu ccgguguggu uugcuugcuu gaaacuguug uuggaaaagc 7140

ugggguacuc acacaaggaa acuaauuaca uagauuacuu gugcaacucc caccauuugu 7200

acagagacaa gcacuacuuu gugaggggag gaaugccauc cggguguucu ggaaccagca 7260

uuuucaauuc aaugauuaau aacauaauca ucagaacacu gauguugaag guguacaaag 7320

ggauagaucu agaccaauuu aggaugauug cauaugguga cgacgucauu gcuucguacc 7380

cguauccaau ugaugcguca uugcuggcug aggcuggcaa gggguauggu cugauuauga 7440

caccagcaga caaaggagag uguuucaaug aaguaacgug gaccaacguc acuuuccuga 7500

aaagauacuu cagagcggau gagcaauauc ccuuccucgu ucacccagug augccaauga 7560

aggacauuca ugagucaauu agguggacua aagaccccaa aaacacccaa gaucacgugc 7620

gauccuugug cuuauuggcc uggcacaaug gagagcaaga auaugagaau uuuguaucca 7680

aaaucagaag cgucccaguu gggcgcugcu ugacauugcc ugcguucucg acucugcgca 7740

ggaaguggguu ggauuccuuc uaaaauugaa guacaaugug auuuaacuca auuggcuuaa 7800

cccuaccaca cuuaccgaac uagauaacgg ugugguaggg guaaauuc 7848

<210> 16

<211> 8214

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Genomic sequence of CVB1-Anti-PD1

<400> 16

uccugugggu ugaucccacc cacagggccc acugggcgcu agcacacugg uauuccggua 60

ccuuugugcg ccuguuuuau acacccuucc caaguguaac uuagaagcuu aucacacacg 120

gucaacaggu gacucaguau gccaacuggg ucuugaucaa gcacuucugu uuccccggac 180

ugaguaucaa uaagcugcuc acgcggcuga aggagaaaac guucguuaac cggccaauua 240

cuucgagaaa ccuaguaaca ccauggaggu ugcgcagugu uucgcuccac acaaccccag 300

uguagaucag gccgaugagu caccgcacuc cucacgggcg accguggcgg uggcugcgcu 360

ggcggccugc ccaugggaua acccauggga cgcuucaaua cugacauggu gcgaagaguc 420

uauugagcua auugguaguc cuccggcccc ugaaugcggc uaauccuaac ugcggagcag 480

auacccacac gccagugggc agucugucgu aaugggcaac ucugcagcgg aaccgacuac 540

uuuggguguc cguguuuccu uuuauuuuua uacuggcugc uuauggugac aauugagaga 600

uuguuaccau auagcuauug gauuggccau ccagugacaa acagagcgau uauuuauuua 660

uuuguugguu auaucccauu aagccaaaag gcccuaguua cucucaacuu uauacuauug 720

cuuaauacaa cgaaauggga gcucaggugu cuacacaaaa gacgggugca caugagacug 780

gcuugaaugc cagcggcaau ucugucaucc auuacaccaa caucaauuac uacaaggaug 840

cugcauccaa cuccgcaaau aggcaagacu ucacacaaga cccagguaag uucacugaac 900

cuguaaagga caucauggug aaaacuaugc cugcguugaa cucacccucu gcugaggaau 960

gcggcuacag ugacagagug cguuccauca cauuagguaa uuccacuauc accacccaag 1020

agugugccaa cguggucguc ggguacggag uguggccaga guaucuaaaa gacaacgagg 1080

ccacagccga agaucagccc acacaaccug auguggccac cugccgcuuc uauacuuuag 1140

aaucagugca guggaugaaa aauucggccg ggugguggug gaagcugccu gaugcacugu 1200

cacagauggg cuuguuuggu caaaacaugc aguaccacua cuugggaaga acaggguaua 1260

cuauacacgu acaaugcaau gccucaaagu uccaucaagg augccugcuu guagugugug 1320

ugccugaagc ugagaugggg ugcucuaacu ugaacaacac gcccgaauuc agugaguuau 1380

ccggaggaga cagugccaga auguucaccg auacacaggu cggggaguca aacgccaaga 1440

aaguacagac agcggugugg aacgccggaa ugggcguugg aguggguaau cucacuauuu 1500

ucccucacca auggaucaac cugaggacca acaacagugc aacgcuagug augccuuaca 1560

uaaacagcgu ccccauggau aacauguuca ggcacaauaa cuuaacacua augauuaucc 1620

cauuuguacc gcuuaauuac agcgagggau ccucaccgua cgugcccaua acagucacca 1680

ucgcuccuau gugugcagag uacaacgggc uacggcuggc cagcaaccag ggucuaccag 1740

uuaugacaac accugggagc acgcaauuuc uaacuucaga ugacuuccag ucaccgucag 1800

cgaugccaca guuugauguc accccagaga ugcaaauacc aggccgcgua aauaauuuga 1860

uggagauugc cgagguggac ucaguggugc cugugaauaa cacagaggac aacgugagua 1920

gccuuaaggc auaccagauu ccaguacagu ccaacaguga caaugguaag cagguuuuug 1980

guuuucccuu acaaccgggu gccaacaacg uucugaauag aacccucuug ggugaaauuc 2040

uaaacuauua cacccauugg aguggcagca uaaaacuuac auucauguuc ugugggucug 2100

ccauggccac uggcaaguuc cuucuggcau acucaccacc uggagcagga gucccgaaaa 2160

accgaaaaga ugcuaugcug ggcacccacg ucauauggga uguuggguua caaucaagcu 2220

gcguguugug cguaccgugg auuagccaaa cacacuacag auacgugguu gaggaugaau 2280

acacagcagc cggauauguu acaugcuggu aucaaacaaa uaucguggug ccagcugaug 2340

ugcaaagcuc augugacauc uugugcuuug uuucagccug caacgauuuc ucugugcgga 2400

ugcugaaaga uacgcccuuu auaagacagg acacauuuua ucacggccca guggaggagu 2460

cuguggaucg ugcaguggca cguguggcgg acacgauuag uucacggccc acuaacucgg 2520

agucaauucc agcgcucacc gccgccgaga cugggcauac cucccaaguu gugccuagcg 2580

acaccaugca aacaagacau gugaaaaacu accacucacg guccgaaucg uccauugaaa 2640

auuuccuaug ccggucugcc uguguauacu augccacaua caccaauaac ucaaaaaaag 2700

agggguuugc agaguggguu aucaacacua gacagguggc acagcuaaga agaaaguugg 2760

agcucuucac auaucuaagg uuugacuuag aacuaacauu uguuauaacg agcgcacaac 2820

aacccaguac cgccuccagu guagacgcuc ccgugcaaac ccaucagauu auguaugugc 2880

cuccaggugg cccuguacca acaaagguua aagauuaugc auggcaaacu uccacaaacc 2940

ccagcguuuu cuggacagaa ggaaacgccc caccaaggau guccauccca uucauuagca 3000

uugguaaugc guauaguugu uuuuaugaug gguggacgca guuuucaaga aacggggucu 3060

auggcaucaa uacccucaac aacaugggca cguuguauau gaggcauguc aaugaagcgg 3120

ggcagggucc aaucaaaagu acuguuagaa uauauuucaa acccaagcac gugaaggcgu 3180

gggugccacg uccgccaaga uugugucaau augagaagca gaaaaauguc aauuuuagcc 3240

cuauaggagu aaccacaagu agaacggaca uuauaacaac aggcacuuuu ggucagcaga 3300

ugaagcaccu gugguucuuc cugcugcugg uggccgcucc uaggugggug cugucccagg 3360

ugcagcuggu gcagagcggc guggagguga agaagcccgg cgcuuccgug aagguguccu 3420

gcaaggccuc cggcuacacc uucaccaacu acuacaugua cugggugagg caggccccug 3480

gacagggacu ggaguggaug ggcggcauca acccuuccaa cggcggcacc aacuucaacg 3540

agaaguucaa gaaccgggug acccugacca ccgacuccuc caccaccacc gccuacaugg 3600

agcugaaguc ccugcaguuu gacgacaccg ccguguacua cugcgccagg agggacuacc 3660
gguucgacau gggcuucgac uacuggggcc agggcacaac cgugaccgug uccagcggag 3720
guggcggauc uggagggggu gguagcggug gaggcgggag ugagaucgug cugacccagu 3780
ccccugcuac acugucccug ucccccggcg agagggcuac acugagcugc agggccucca 3840
agggcguguc caccuccggc uacuccuacc ugcacuggua ccagcagaag ccuggacagg 3900
cucccaggcu gcugaucuac cuggccuccu accuggaguc cggcgugccu gcuagguuuu 3960
ccggcagcgg cagcggcacc gauuucaccc ugaccaucuc cucccuggag cccgaggacu 4020

ucgccgugua cuacugccag cacuccaggg aucugccucu gaccuucggc ggcggcacca 4080
agguggagau caagaccaca aguagaacgg acauuauaac aacaggcacu uuuggucagc 4140
aguccggagc gauauaugug ggcaauuaca ggauagucaa uaggcaccug gcaacacacu 4200
uugacuggca aaauugcaua ugggaggauu acaacaggga ccuccuagua ugcacuacaa 4260
cggcgcacgg uugugacaau auugcaagau gccagugcac agcaggugug uauuauugug 4320
cuucuaggaa caagcauuac ccggugcauu uugaaggacc aggcuuggug gagguccagg 4380
aaagugaaua uuauccaaaa agguaucaau cacacgugcu ucuugccgca ggguuuucug 4440

agccgggggа uuguggуggu auucucaggu gugaacaugg uguuauaggc aucgugacca 4500
ugggugguga gggуguuguc ggcuuugccg augugcgcga ucucuuaugg cuggaagacg 4560
acgcaaugga acagggaguc agggacuacg uggaacagcu uggaaacgcc uuugguucug 4620
gguuuaccaa ccagauuugc gagcaaguca aucuguuaaa agagucacua auaggccaag 4680
acuccaucuu ggaaaaauca cucaaggcau uagugaaaau cauaucagca cugguuaucg 4740
uggugagaaa ccacgaugac cucauaacag ucacugccac cuuagcccug auuggcugua 4800
ccacuucacc guggcggugg cuaaagaaaa aagugacuca auacuauggg auucccaugg 4860

ccgagagaca gaacaauggc uggcucaaga aauucacaga aaugaccaau gcaugcaagg 4920
gcauggaaug gaucgccauc aaaauccaaa aguucauuga guggcucaaa auuaagaucu 4980
ugccagaagu aaaggaaaaa cacgaguuuc uuaccagacu uaagcaacuc ccacucuuag 5040
aaagccaaau ugccaccauc gagcagagug caccaucaca gagugaucag gaacaacugu 5100
ucuccaauau acaguacuuc gcgcacuauu gcagaaagua cgccccacug uacgcagcug 5160
aggcaaaaag aguguucucu cuagaaaaga aaaugagcaa cuacauacag uucaagucca 5220
aaugccguau ugaaccaguc uguuuauugc uccaugguag cccuggagcc ggaaaauccg 5280

uggcuaccaa uuugauugga cgcucacuug cagagaagcu caacaguuca guguauucau 5340

ugccaccaga cccagaccau uuugacggcu auaaacaaca agcugucgua aucauggaug 5400

accugugcca gaacccagau gggaaagacg uguccuuguu cugccagaug guuucaagug 5460

uagacuuugu uccaccaaug gcagcacuug aggagaaagg cauacucuuc acaucgccuu 5520

ucgugcucgc cucuaccaac gcagguucca ucaacgcucc cacuguguca gacagcagag 5580

cccuugcuag aagguuccac uucgacuuga acauugaggu caucucaaug uacagccaga 5640

auggcaaaau caacaugcca augucaguga aggcuuguga ugaugagugu uguccaguua 5700

auuucaagag guguugucca uuagugugcg guaaggccau ucaguucauu gacagaagaa 5760

cacaaaugag guauucacua gacaugcuug uaacugaaau guucagggag uacaaccaca 5820

gacauagugu gggggcaaca cucgaggcac ucuuccaagg cccacccgug uacaaagaga 5880

ucaagaucag uguugcgcca gaaaccccuc ccccaccggc aauagcagau cugcugaaau 5940

cuguggacag ugaagcaguu agagaguacu gcaaggaaaa gggaugguug gugccugaga 6000

ucaauuccac ucuacaaauu gaaaagcacg ugagcagggc cuucauuugc cugcaagcgc 6060

ucaccacguu uguuuccgug gcggggauaa uuuacaucau auacaaauug uuugcuggcu 6120

uccagggggc cuacaccggu augccaaacc aaaaaccuaa aguaccaacu uugaggcagg 6180

cuaaggugca gggaccggca uucgaauucg cuguggcaau gaugaaaaga aaugcuagca 6240

cagugaagac cgaguacggu gaguucacaa ugcuuggaau cuaugacagg ugggcagugc 6300

uaccucguca cgcuagacca gggccuacca uccuaaugaa ugaccaggaa gugggugugg 6360

uggaugccaa ggaguuagug gacaaggaug gcaccaauuu agaauuaaca cucuugaagc 6420

ucaauagaaa ugagaaauuc agagacaucc gaggcuucuu aacacgugag gaggccgaag 6480

ucaacgaggc ugugcuugcu auuaacacca gcaaguuccc aaauauguac auuccaguug 6540

ggcaaguaac agauuauggc uuccucaacu uggguggcac accaacuaag cgcaugcuga 6600

uguacaacuu cccaacacgu gcaggccaau gugggggagu ucuaaugucu acagguaaag 6660

ugcucggaau acacgucggu gguaauggac accaaggguu uucggcagcc cuguuacgcc 6720

acuauuucaa ugacgagcag ggagagauug aguucaucga gagcucuaag gaugcaggcu 6780

uuccagucau uaacacaccu agcaaaacaa agcucgagcc caguguuuuc caucacgugu 6840

uugagggaaa caaagaacca gcaguguuga ggaauggaga cccaagacug aaagccaauu 6900

uugaggaagc cauuuucucc aaguacaucg ggaaugugaa cacacaugua gacgaguaca 6960

ugauggaagc cgucgaccau uaugcaggac aguuagcuac uuuagauauc aguacagaac 7020

cuaugaagcu ugaggaugcu gucuacggua cugagggcuu ggaagcucug gacuugacca 7080

cuagugcugg guaucccuau gucgcccuug guauaaaaaa gagagacauc uuauccaaaa 7140

agucuaagga ccugucuaaa cugagagagu guauggacaa guauggguua aaccucccua 7200

uggucaccua ugugaaggau gaauugaggu cagcagagaa aguggcuaag ggcaaaucca 7260

gacuaaucga ggcguccagu uuaaaugacu caguggcaau gagacagacu uucgguaacc 7320

uguauaagac auuccaucug aacccgggca uagugacugg cagugcaguu ggaugcgauc 7380

ccgacuuguu cuggagcaag auuccaguca ugcucgaugg ucaccucauc gccuuugacu 7440

acaguggaua ugaugccagc cugaguccgg uguggguugc uugcuugaaa cuguuguugg 7500

aaaagcuggg guacucacac aaggaaacua auuacauaga uuacuugugc aacucccacc 7560

auuuguacag agacaagcac uacuuuguga ggggaggaau gccauccggg uguucuggaa 7620

ccagcauuuu caauucaaug auuaauaaca uaaucaucag aacacugaug uugaaggugu 7680

acaaagggau agaucuagac caauuuagga ugauugcaua uggugacgac gucauugcuu 7740

cguacccgua uccaauugau gcgucauugc uggcugaggc uggcaagggg uauggucuga 7800

uuaugacacc agcagacaaa ggagaguguu ucaaugaagu aacguggacc aacgucacuu 7860

uccugaaaag auacuucaga gcggaugagc aauaucccuu ccucguucac ccagugaugc 7920

caaugaagga cauucaugag ucaauuaggu ggacuaaaga ccccaaaaac acccaagauc 7980

acgugcgauc cuugugcuua uuggccuggc acaauggaga gcaagaauau gagaauuuug 8040

uauccaaaau cagaagcguc ccaguugggc gcugcuugac auugccugcg uucucgacuc 8100

ugcgcaggaa gugguuggau uccuucuaaa auugaaguac aaugugauuu aacucaauug 8160

gcuuaacccu accacacuua ccgaacuaga uaacggugug guaggggguaa auuc 8214

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence of miR-133 target sequence

<400> 17

acagctggtt gaaggggacc aa 22

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence of miR-206 target sequence

<400> 18

ccacacactt ccttacattc ca 22

<210> 19

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence of tandem sequence of miR-133 target sequence and miR-206 target sequence

<400> 19

acagctggtt gaaggggacc aacgatacag ctggttgaag gggaccaaac cggtccacac 60

acttccttac attccatcac ccacacactt ccttacattc ca 102

<210> 20

<211> 507

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence of internal ribosome entry site sequence of HRV2

<400> 20

aacttagaag tttttcacaa agaccaatag ccggtaatca gccagattac tgaaggtcaa 60

gcacttctgt ttccccggtc aatgttgata tgctccaaca gggcaaaaac aactgcgatc 120

gttaaccgca aagcgcctac gcaaagctta gtagcatctt tgaaatcgtt tggctggtcg 180

atccgccatt tcccctggta gacctggcag atgaggctag aaatacccca ctggcgacag 240

tgttctagcc tgcgtggctg cctgcacacc ctatgggtgt gaagccaaac aatggacaag 300

gtgtgaagag ccccgtgtgc tcgctttgag tcctccggcc cctgaatgtg gctaacctta 360

accctgcagc tagagcacgt aacccaatgt gtatctagtc gtaatgagca attgcgggat 420

gggaccaact actttgggtg tccgtgtttc acttttttcct ttatatttgc ttatggtgac 480

aatatataca atatatatat tggcacc 507