



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월09일
(11) 등록번호 10-2704217
(24) 등록일자 2024년09월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/81 (2006.01) A61K 36/06 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/815 (2013.01)
A61K 36/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7021778
(22) 출원일자(국제) 2018년12월19일
심사청구일자 2021년10월20일
- (85) 번역문제출일자 2020년07월24일
(65) 공개번호 10-2020-0104367
(43) 공개일자 2020년09월03일
(86) 국제출원번호 PCT/DE2018/000379
(87) 국제공개번호 WO 2019/129321
국제공개일자 2019년07월04일
- (30) 우선권주장
10 2017 012 109.5 2017년12월27일 독일(DE)
- (56) 선행기술조사문헌
BIOTECHNOLOGY LETTERS, 2004, vol. 26, no. 23,
pages 1803-1808.*
MICROBIAL CELL FACTORIES, 2012, vol. 11, no.
1, pages 1-12.*
PLOS ONE, 2012, vol. 7, issue 9, e42870.*
WO2010054649 A2
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
베로백신즈 게엠베하
독일 할레 (잘레) 브뤼체슈트라쎄 26 (우:06120)
- (72) 발명자
힐리만 한스 카스파
독일, 04177 라이프치히, 에리히-퀸-슈트라쎄 71
베흐렌스 마티나
독일, 06120 할레 (잘레), 스프링크라우트베그 14
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 26 항

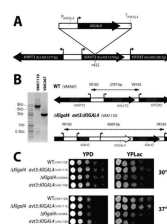
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 클루이베로마이세스 락티스 효모를 기본으로 하는 보호성 1가- 및 다가 서브유닛 백신의 생산을 위한 최적화된 숙주/벡터 시스템

(57) 요약

본 발명은 하나 이상의 외부 단백질의 고도로 효율적인 발현이 가능하고 병원체에 대한 보호 면역 반응의 생성을 위한 백신으로서 사용하기에 적합한 재조합 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)(케이. 락티스)에 관한 것이다. 본 발명은 특히 외부 항원-암호화 핵산을 케이. 락티스 균주의 효모 계통내로 표적 클로닝하기 위한 케이. 락티스 균주를 제공하며, 상기 케이. 락티스 균주는 *KILAC4* 유전자좌에 대한 대안으로서 또는 상기에 더하여, *KIURA3-20* 유전자좌(*KLLA0E22771g*) 및/또는 *KIMET5-1* 유전자좌(*KLLA0B03938g*) 상에 외부 항원을 위한 통합 발현 카세트를 가짐을 특징으로 한다. 본 발명은 또한 통합 발현 벡터 및 본 발명의 케이. 락티스 균주의 생성 방법뿐만 아니라 백신으로서 그의 용도에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/12 (2013.01)

A61P 31/14 (2018.01)

A61P 31/16 (2018.01)

C12N 7/00 (2013.01)

A61K 2039/523 (2013.01)

A61K 2039/54 (2013.01)

C12N 2760/16134 (2013.01)

C12N 2770/24334 (2013.01)

(72) 발명자

게바우어 맨디

독일, 19053 슈베린, 템러슈트라쎄 18

브레우너 카린

독일, 14109 베를린, 린덴슈트라쎄 7

베흐렌스 스벤-에릭

독일, 06120 할레 (잘레), 스프링크라우트베그 14

명세서

청구범위

청구항 1

클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*, *K. lactis*) 균주의 효모 게놈 내로 외부 항원-암호화 핵산을 표적 클로닝하기 위한 케이. 락티스(*K. lactis*) 균주로서,

i) *KIURA3-20* 유전자좌 및 *KILAC4* 유전자좌;

ii) *KIMET5-1* 유전자좌 및 *KILAC4* 유전자좌; 또는

iii) *KIURA3-20* 유전자좌, *KIMET5-1* 유전자좌 및 *KILAC4* 유전자좌에 외부 항원을 위한 통합(integrated) 발현 카세트를 가지고,

발현 카세트가, 케이. 락티스 *LAC4-12* 프로모터($P_{LAC4-12}$) 또는 상기 프로모터의 변종(variant)을 함유하며, 상기 프로모터의 변종은 *LAC12*와 *LAC4* 사이의 유전자간 영역(intergenic region)을 포함하고,

상기 프로모터의 변종은,

a) 변형된 *LAC4-12* 프로모터로서, 비유도 조건 하에서 외부 단백질 발현을 감소시키거나, 또는 외부 단백질 발현을 허용하지 않으며, 변형된 *LAC4-12* 프로모터($P_{LAC4-12-LR2}$; 서열번호 2)가 -1065 내지 -1540 사이의 $P_{LAC4-12}$ 프로모터(서열번호 5)의 기본 조절 영역(basal control region, BCR)의 결실인 LR2 결실을 함유하는 것을 특징으로 하는 변형된 *LAC4-12* 프로모터; 및

b) 변형된 *LAC4-12* 프로모터로서, 외부 단백질 발현의 조절을 허용하고, 프로모터의 활성제 K1Gal4에 대한 결합 부위의 수가 다양하며, K1Gal4-결합 부위는 상류 활성화 서열 1(U1), 상류 활성화 서열 2(U2), 상류 활성화 서열 4(U4) 및 상류 활성화 서열 5(U5)이고, 1, 2, 3 또는 4개의 K1Gal4-결합 부위가 존재하는 것을 특징으로 하는 변형된 *LAC4-12* 프로모터로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 케이. 락티스 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

발현 카세트가, 케이. 락티스 *LAC4-12* 프로모터($P_{LAC4-12}$) 또는 상기 프로모터의 변종(variant), 항원-암호화 영역 및 *AgTEF1* 종결자를 함유하고, 상기 프로모터의 변종은 *LAC12*와 *LAC4* 사이의 유전자간 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 케이. 락티스 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

외부 항원-암호화 핵산의 복수 카피가, 생성된 케이. 락티스 균주의 *KILAC4* 유전자좌 또는 *KIURA3-20* 유전자좌 또는 *KIMET5-1* 유전자좌에 직렬(tandem) 발현 카세트 또는 다중-발현(multi-expression) 카세트를 통해 삽입되는 것을 특징으로 하는 케이. 락티스 균주.

청구항 4

제1항에 있어서,

외부 항원 IBDV VP2의 유전자가 케이. 락티스 균주의 *KILAC4* 유전자좌에 직렬 발현 카세트의 형태로 존재하는 것을 특징으로 하는 케이. 락티스 균주.

청구항 5

제1항에 있어서,

외부 항원-암호화 핵산의 하나 이상의 카피가 *KILAC4* 유전자좌, *KIURA3-20* 유전자좌 및 *KIMET5-1* 유전자좌 중

하나 이상에 단일 발현 카세트, 직렬 발현 카세트 또는 다중-발현 카세트를 통해 삽입되고, 상기 핵산은 서로 다른 다수의 핵산인 것을 특징으로 하는 케이. 락티스 균주.

청구항 6

제1항에 있어서,

외부 항원 A형 인플루엔자 HA 및 A형 인플루엔자 M1의 암호화 유전자가 케이. 락티스 균주의 *KILAC4* 및 *KIURA3-20* 유전자좌에 삽입되고 발현되는 것을 특징으로 하는 케이. 락티스 균주.

청구항 7

제1항에 있어서,

게놈 *KIGAL4* 유전자에 더하여, *KIGAL4* 유전자의 두 번째 이소성(ectopic) 카피를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 케이. 락티스 균주.

청구항 8

제6항에 있어서,

KIGAL4 프로모터 및 *KIGAL4* 종결자가 인접하고 있는 *KIGAL4* 유전자의 이소성 카피가 *KLLA0E13795g(Klavt3::KIGAL4-1*, 서열번호 1) 유전자좌에서 케이. 락티스 균주에 통합되는 것을 특징으로 하는 케이. 락티스 균주.

청구항 9

제1항에 있어서,

외부 항원 IBDV VP2의 유전자가 케이. 락티스 균주의 *KILAC4* 유전자좌에 존재하는 것을 특징으로 하는 케이. 락티스 균주.

청구항 10

제1항에 있어서,

외부 항원 A형 인플루엔자 HA의 유전자가 케이. 락티스 균주의 *KILAC4* 유전자좌에 존재하는 것을 특징으로 하는 케이. 락티스 균주.

청구항 11

제1항에 있어서,

외부 항원 IBDV VP2의 유전자가 케이. 락티스 균주의 *KILAC4* 유전자좌에 삽입되는 것을 특징으로 하는 케이. 락티스 균주.

청구항 12

제1항에 있어서,

대립유전자 *Kllac4*, *Klura3-20* 및 *Klmet5-1*의 유전자 기능이 회복되고, 케이. 락티스 균주가 자가영양성인 것을 특징으로 하는 케이. 락티스 균주.

청구항 13

제1항에 있어서,

외부 항원 BVDV E2 엑토도메인, BVDV E2 엑토도메인 및 BVDV Npro-NS3의 유전자가 케이. 락티스 균주의 *KILAC4*, *KIURA3-20* 및 *KlMet5-1* 유전자좌에 삽입되는 것을 특징으로 하는 케이. 락티스 균주.

청구항 14

균주:

VAK1283 DSM 32697;

VAK1395 DSM 32706; 및

VAK1400 DSM 32698

중에서 선택된 케이. 락티스 균주.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 청구된 케이. 락티스 균주의 생산 방법으로서,

(i) K1pURA3 벡터 및/또는 K1pMET5 벡터 내에 목적하는 항원의 유전자 서열을 삽입하는 단계;

(ii) 변형되고 앞서 효소에 의해 절단된 벡터 구조물(들)로 케이. 락티스 배양물을 형질전환시키는 단계; 및

(iii) 우라실 및/또는 메티오닌을 함유하지 않는 고체 배지에서, 형질전환된 케이. 락티스 세포를 선택하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

(iv) 자가영양성을 회복시키는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 17

제15항에 있어서,

다중 항원의 유전자 서열을 동시에 이소성으로 삽입하고 조절된 방식으로 발현시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

병원체의 다수의 변종의 항원을 암호화하는 다수의 유전자 서열을 이소성으로 삽입하고 조절된 방식으로 발현시키고, 상기 다수의 유전자 서열은 서로 다르며, 상기 다수의 변종은 서로 다른 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제17항에 있어서,

다수의 병원체의 항원을 암호화하는 다수의 유전자 서열을 이소성으로 삽입하고 조절된 방식으로 발현시키며, 상기 다수의 유전자 서열은 서로 다르며, 상기 다수의 병원체는 서로 다른 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 청구된 케이. 락티스 균주를 함유하는 백신접종에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서,

보호성 백신접종에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서,

피험체에서 하나 이상의 외부 항원에 대한 보호 면역 반응을 촉발시키기에 충분한 양을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 23

제20항에 있어서,

피하, 근육내 또는 경구/점막 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 24

제20항에 있어서,

케이. 락티스 균주가 단일 적용/면역화 또는 이중 적용/면역화로 병원체에 대한 보호 면역 반응을 촉발시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 25

제20항에 있어서,

케이. 락티스 균주가 단일 사용/면역화 또는 이중 적용/면역화로 병원체의 서로 다른 다수의 변종에 대한 교차-보호 면역 반응을 촉발시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 26

제20항에 있어서,

케이. 락티스 균주가 단일 사용/면역화 또는 이중 적용/면역화로 서로 다른 다수의 병원체에 대한 보호 면역 반응을 촉발시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 하나 이상의 외부 단백질의 고도로 효율적인 발현에 알맞고 병원체에 대한 보호 면역 반응의 생성을 위한 백신으로서 사용하기에 적합한 재조합 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*, *K. lactis*)에 관한 것이다. 본 발명은 특히 외부 항원-암호화 핵산을 케이. 락티스(*K. lactis*) 균주의 효모 게놈 내로 표적 클로닝하기 위한 케이. 락티스 균주를 제공하며, 상기 케이. 락티스 균주는 *KILAC4* 유전자좌에 대한 대안으로서 또는 이에 더하여, *KIUR43-20* 유전자좌(*KLLA0E22771g*) 및/또는 *KIMET5-1* 유전자좌(*KLLA0B03938g*)상에 외부 항원을 위한 통합 발현 카세트를 가지는 것을 특징으로 한다. 본 발명은 더욱 또한 통합 발현 벡터 및 본 발명의 케이. 락티스 균주의 생산 방법 및 백신으로서 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 백신은 질병의 예방(예방 백신) 또는 확립된 질병의 치료(면역치료 백신)에 사용된다. 과거 100년간 혹은 그 정도에, 예방접종 프로그램은 감염성 질병의 감소에 상당한 기여를 해왔다. 면역치료 백신, 예를 들어 바이러스, 세균 또는 기생충에 의한 지속 감염 또는 발암성 질병에 대한 상기 백신은 단지 약 20년간 개발되고 사용되어 왔다. 백신접종의 목적은 세포(즉 근본적으로 T 세포 및 NK 세포-매개된) 및/또는 체액(즉 근본적으로 B 세포/항체-매개된) 면역 반응 및 병원체 또는 악성(종양형성) 세포의 항원 성분에 대한 면역학적 기억의 유도이다.

[0003] 고전적인 백신은 유전 물질, 즉 DNA 또는 RNA 형태의 핵산을 포함하는 약독화된(불활성화된) 또는 죽은 형태의 전체 병원체를 함유한다. 상기 고전적인 백신은 생산을 위해서 대개는 특별한 안전 예방책 및/또는 감염가능한

유기체 및/또는 세포 배양물의 사용을 요하며; 더욱이, 상기 백신은 종종 복잡한 보관 및 수송을 요하고 콜드 체인의 사용을 수반한다. 또한, 고전적인 백신의 사용은 백신접종된 개인에서 부작용을 일으키는 생산 공정으로부터의(예를 들어 시험 동물로부터의 또는 세포 배양물로부터의) 물질의 위험, 또는 바람직하지 못하게 재활성화되는 병원체의 위험을 수반한다. 문제는 진단법에도 존재한다: 예를 들어, 완전 병원체에 의한 유용 동물의 백신접종의 경우에, 백신접종된 동물을 자연적으로 감염된 동물과 구별할 수 없으며, 이는 새로운 감염의 검출을 기본으로 하는 조기 경보 시스템이 쓸모없음을 의미한다. 따라서, 소위 "서브유닛 백신"(오직 병원체의 한정된 성분만을 백신접종한다)이 개발되었다. 그의 사용에 전제조건은 문제의 병원체의 "주요 항원"을 안다는 것이다. 주요 항원은 대개 면역계에 의해 인식될 수 있는 병원체의 표면 구성성분, 예를 들어 바이러스 외피 또는 바이러스 캡시드의 단백질이다. 완전 바이러스 입자의 부재하에서, 상기 주요 항원은 또한 숙주에서 상기 바이러스에 대한 체액 및/또는 세포 면역 반응 및 면역학적 기억을 유도할 수 있다. 상기 병원체의 추가의 구성성분들은 "서브유닛 백신접종"에서 누락되기 때문에, 백신접종된 개인은 감별 진단(백신접종된 동물과 차별 감염된(DIVA))에 의해 자연적으로 감염된 개인과 구별될 수 있으며; 상응하게, "서브유닛 마커 백신"을 참조한다. 다수의 서브유닛 백신의 단점은 종종 복잡한 생산 공정 및 종종 부적합한 면역원성이다: 병원체 자체는 효율적으로 배양될 수 있는 반면(상기 서술된 제한과 함께), 그의 주요 항원은 비용-집약적이고 대개는 비효율적인 방법을 사용하는 유전자 기술에 의해 생산되고 복잡한 방식으로 정제되어야 한다. 상응하게, 이와같이 수득된 서브유닛 백신은 유통 기한이 짧으며 종종 냉장 상태에서 보관되고 수송되어야 한다. 이러한 이유때문에, 유용 동물에 대한 대부분의 대량 백신은 여전히, 완전 병원체를 사용하는 고전적인 원리에 기반한다.

[0004] 예를 들어, 광범위한 가금류 질병인 전염성 F낭병(IRD)은 비르나비리다에(*Birnaviridae*) 과의 이중-가닥, 분절된 RNA 게놈을 갖는 무-외막 바이러스인 전염성 F낭병 바이러스(IRDV)에 의해 촉발된다. IRD에 대한 대부분의 백신은 약독화된(약화된) 또는 불활성화된 바이러스를 기본으로 한다. 그러나, 여기에서 발생하는 문제점은, 고도로 약독화된 불활성화되지 않은 "생 바이러스" 및 또한 불활성화된 바이러스는 평균적인 병원성을 갖는 IRD 바이러스에 대해 보호를 제공하지만, 매우 독성인 IRD 바이러스 균주(vvIRDV)에 대해서는 그렇지 않다는 것이다. 최근까지, 매우 독성인, 약독화된 바이러스(중간 고온 균주)는 vvIRDV에 대해 방어적이었으나, 상기 백신 균주는 림프 기관인 파브리치낭의 B 세포에 대한 일시적인 손상으로 인해 가능한 면역억제 발생 형태의 부작용을 갖는다(Rautenschlein *et al.* (2005)). 그러나, 심지어 상기 중간 고온 백신은 최근에 발견된 vvIRDV 균주에 대해 완전한 보호를 제공하는 것도 아니다(Negash *et al.* (2012); Kasanga *et al.* (2007)). 더욱이, 고도로 약독화된 생 바이러스에 의한 백신접종 문제점은 모체이행 항체가 바이러스 복제를 방지하고 따라서 면역 반응의 유도를 방지한다는 것이다. 따라서, 이들 백신에 의한 유효 백신접종은 부화후 단지 3주까지만 가능하다(Kumar *et al.* (2000); Rautenschlein *et al.* (2005)).

[0005] 예를 들어, A형 인플루엔자 바이러스는 세계적으로 가장 중요한 바이러스 병원체 중 하나이다(Short *et al.* (2015); Silva *et al.* (2012)). 인플루엔자 바이러스는 오소믹소비리다에(*Orthomyxoviridae*) 과에 속하며; 게놈으로서 단일-가닥의 분절된 RNA를 갖는 외막 바이러스이다. 대부분의 RNA 바이러스처럼, 인플루엔자 바이러스는 또한 돌연변이율이 높은 대상이다. 특히 바이러스 RNA 분절의 재편성은 새로운 유전학적 및 생물학적 성질을 갖는 바이러스 자손을 생성시킨다(Short *et al.* (2015)). 빠른 진화로 인해, 특히 인플루엔자 바이러스에 대한 백신접종의 경우에 발생하는 문제점은 기존의 백신이 신종 바이러스 변종의 경우를 "따라잡지" 못한다는 것이다. 상응하게, 상이한 인플루엔자 변종에 대해 교차-보호를 나타내고 따라서 또한 장기간 보호를 나타내는 백신을 개발하려는 시도가 이미 오랜 시간 수행되어 왔다(Steel *et al.* (2010); Krammer and Palese (2013); Kirchenbaum and Ross (2014); Berthoud *et al.* (2011)).

[0006] 소 바이러스성 설사 바이러스(BVDV)는 우제류의 광범위한 병원체이다. BVDV는 플라비비리다에(*Flaviviridae*) 과의 페스티바이러스 속의 일원이다. 상기 바이러스의 단일-가닥 RNA 게놈은 마찬가지로 돌연변이율이 높은 대상이다. 더욱이, 임신한 동물의 경우에, 태아가 감염될 수 있으며, 이어서 면역관용으로 인해 지속 감염된(PI) 동물이 태어난다. 상기 PI 동물은 상기 바이러스를 더욱 확산시키며, 100% 바이러스 돌연변이의 경우에, 소위 점막 질병으로 죽는다. 여기에서도 또한, 상이한 BVD 바이러스 변종에 대해 교차-보호 및 장기간 보호를 나타내는 백신을 개발하려는 시도가 이미 오랜 시간 수행되어 왔다(Ridpath(2015)).

[0007] 유효한 서브유닛 백신은 이러한 문제점들을 다루거나 해결할 수 있다. 대부분의 경우에, 서브유닛은 병원체의 단백질 성분이며; 다양한 숙주 세포에서 유전자 기술에 의해 생산될 수 있다. 장 세균인 에스케리키아 콜라이 외에, 세포 배양물, 식물 세포 및 다양한 진균에서 번식될 수 있는 포유동물 세포 또는 곤충 세포가 이중 단백질 발현을 위한 숙주 시스템으로서 확립되었다. 세균 및 진균과 같은 미생물계가 특히 비용 효과적으로 대규모로 배양될 수 있다.

- [0008] 사카로마이세스, 피키아 및 클루이베로마이세스 효모 속의 효모 세포는 이미 외부 단백질의 발현에 수십년간 통상적으로 사용되어 왔다. 세균과 대조적으로, 효모 세포는 진핵생물이라는 장점을 갖는다, 즉 상기 세포는 다수의 태양에서, 동물 세포를 닮았으며, 진핵생물 단백질, 즉 동물 세포에서 형성되고/되거나 기능성임에 틀림없는 단백질이 효모에서 고유의 또는 실질적으로 고유의 형태로 비용-효과적으로 생산될 수 있다(Bathurst (1994); Gellissen & Hollenberg (1997)). 효모는 초기에는 단지 외부 단백질의 생산에만 사용되었으나; 발효 후에 상기 단백질이 상기 효모 세포로부터 정제되어 서브유닛 백신으로서 사용되었다. 단지 최근에는 효모 자체 또는 상기 효모의 세포 분획을 백신으로서 투여하고자 하는 시도가 이루어졌다. "효모-기반 백신"은 상응하게, 병원체(항원)의 면역학적으로 유효한 성분을 함유하고 투여(예를 들어 피하, 근육내 또는 경구/점막) 후에 숙주 유기체에서 상기 항원에 대한 및 따라서 또한 상기 항원이 기원하는 병원체에 대한 특이적인 면역 반응을 촉발시킬 수 있는 효모 입자이다. 요구되는 것은, 백신접종된 유기체에서, 후속 감염("공격")의 경우에, 상응하는 병원체의 증식 및/또는 확산을 방지하고/하거나 상기 감염의 병적인 효과를 감소시키는 면역학적 "기억"의 유도이다. 이미 상기에서 다루어진 바와 같이, 항원은 대개 병원체의 구조 단백질이며, 그의 암호화 핵산 서열(항원-암호화 유전자)이 유전자-기술 방법을 사용하여 효모 세포내로 도입되고 상기와 같은 구조 단백질 중 하나 이상의 발현을 허용한다. 살아있는 형태(효모 세포), 사멸 및 건조 후(효모 입자) 또는 세포 붕괴 및 균질화 후(효모 용해물) 분말 형태의 상기와 같이 생산된 재조합 효모가 효모-기반 백신이다. 상기 백신의 투여 후에, 항원은 면역계에 의해 인식되어 체액 및/또는 세포 면역 보호를 일으킨다.
- [0009] 효모-기반 백신접종은 종래 기술로부터 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있다. 일련의 미국 특허 출원 및 특허, 예를 들어 US 20090304741 A1, US 5830463 A, US 7465454 B2 및 US 20070166323 A1은 면역요법에서 적어도 하나의 재조합 항원을 함유하는 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*)(에스 세레비지아에) 균주의 용도를 기재한다. 이들 효모는 면역 반응, 특히 세포-매개된 면역 반응을 자극하는데 유효함이 입증되었다.
- [0010] WO 2006044923은 C형 간염 바이러스(HCV)의 다양한 단백질을 재조합적으로 발현하고 상기 HCV 단백질에 대한 면역 반응, 특히 T 세포 반응을 촉발시킬 수 있으며 만성 C형 간염에 대한 백신으로서 사용하도록 되어 있는 효모(에스 세레비지아에)를 개시한다.
- [0011] WO 2007092792는 다양한 효모 균주들의 조합의 사용을 수반하는, 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 재조합 에스 세레비지아에 효모의 가능한 용도를 기재하며, 그의 투여는 T 세포의 유도, 즉 세포 면역 반응을 도출한다.
- [0012] WO 20101054649 및 WO 2013107436은 죽은 전체 효모 세포의 경구/점막 또는 피하 투여에 따른 보호 체액 면역 반응을 생성시키기 위한 한정된 항원을 함유하는 클루이베로마이세스 락티스 중 균주의 용도를 기재한다. 마지막에 언급한 특허는 출발 균주 VAK367-D4로부터 유래된 재조합 케이. 락티스 균주가 백신접종에 성공적으로 사용된 응용 실시예를 함유한다.
- [0013] 백신접종을 위한 재조합 클루이베로마이세스 락티스 효모의 사용 가능성은 종래 기술로부터 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있다: (Arnold *et al.* (2012)); WO 20101054649 및 WO 2013107436). 응용 실시예는 *LAC4* 프로모터에 의해 조절되는 발현 카세트를 통해 세포내에서 전염성 F낭병 바이러스(IBDV)의 P2 캡시드 단백질을 발현하는 케이. 락티스 효모의 피하 투여가 바이러스 감염에 대한 유효 보호를 제공하는 체액 면역 반응을 촉발시킴을 입증할 수 있었다. 이는 평균적인 병원성의 IBD 바이러스에 대해서는 입증이 가능하였지만, 매우 독성의 IBDV(vvIBDV)에 대해서는 지금까지 입증할 수 없었다. 선행 데이터는 효모 백신의 유효성을 바이러스 항원의 세포내 농도 증가에 의해 증가시킬 수 있음을 입증하였다(Arnold *et al.* (2012)). 항원 농도의 증가를 성취하기 위한 기술적 변화는 pLI-1 플라스미드의 통합에 의한 전사 활성제 유전자 *KIGAL4-1*(일명 *LAC9-1*)의 추가적인 카피의, IBDV-VP2-발현 균주(기탁 균주 DSM 25406 및 DSM 25407)내로의 도입에 있다(Krijger *et al.* (2012) 및 WO 2013107436). 이와 같이 상기와 같은 케이. 락티스 백신 균주의 생성은 지금까지 2개의 유전학적 중재에 기반하였다: 첫 번째, 항원-암호화 외부 유전자의 통합 및 두 번째, *KIGAL4-1* 유전자의 통합. 그러나, 지금까지 실행된 형태에서, 후자는 또한 규칙적으로 플라스미드의 직렬 반복염기의 통합을 유도하여, 상기 활성제의 강한 과발현으로 인한 세포독성 효과(Breunig 1989)뿐만 아니라, 상기 방식으로 생성된 백신 균주에서 *KIGAL4-1* 및 *ScURA3* 유전자에 대한 카피 수의 차이를 생성시켰다.
- [0014] 상기 언급된 응용 실시예에 기재된 바와 같이(Arnold *et al.* (2012); WO 20101054649 및 WO 2013107436), 변형되지 않은 *LAC4* 프로모터를 통해 외부 유전자의 발현을 수행하는 전략은 상기 외부 유전자의 최소 발현이 심지어 비유도 조건하에서조차 발생하는, 즉 상기 프로모터가 어느 정도 개방되는 2차적인 효과를 갖는다. 상기 *KIGAL4-1* 유전자 용량을 증가시키는 경우, 상기 효과는 한 번 더 훨씬 더 현저하다. 상응하게, 이중 발현의 경

우 효모 세포에 대한 세포병변 효과(CPE)를 갖는 단백질의 경우에, 배양 중, 예를 들어 유가 발효 공정 중 바이오매스 형성이 심하게 제한될 수 있다. 특히 이러한 경우에, 비유도 조건하에서 유전자 발현을 최소화하는 대안의 방법이 발견되어야 한다.

[0015] 다양한 서브유닛 백신은 단지 하나가 아니라 다수의 병원체 서브유닛이 백신접종에 사용될 때에만 효과적으로 유효하다. 더욱이, 백신접종에서 다수의 항원 서브유닛의 사용은 병원체의 상이한 변종들에 대해서 교차-보호성을 강하게 증가시킬 수 있다. 동일한 또는 상이한 항원의 동시발현을 또한, 효모 세포에서 항원 농도를 다시증가시키거나 또는 상이한 병원체를 방어하는 백신을 생성시키는데 사용할 수 있다.

[0016] 상기-논의된 균주들은 일반적으로 완전 배지에서 자가영양성 균주보다 흔히 더 불량하게 성장하는 영양요구성 균주이다. 상응하게, 영양요구성 효모 균주의 자가영양성 형태로의 신속하게 이행가능한 전환은 개선된 증식 성질을 도출할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 본 발명의 목적은 종래 기술의 단점을 극복할 수 있는 신규의 케이. 락티스 백신 균주를 제공하는 것이었다. 특히, 제공되어야 하는 것은 게놈내 한정된 부위에 통합된, 제한된 카피 수의 *KIGAL4-1* 유전자를 함유하는 재조합 케이. 락티스 균주이다. 더욱이, 제공되어야 하는 것은, 비유도 조건하에서 외부 단백질의 발현을 단지 약간 허용하거나 또는 허용하지 않고 효모에서 항원의 복수 카피의 발현 또는 다중 항원의 발현을 허용하는 균주이며, 상기 균주는 배양에 보다 적합하고 병원체에 대한 보호성 백신접종에 보다 유효하게 사용될 수 있다. 동시에, 면역조절가능하게 활성인 단백질(항원)을 암호화하는 이중 유전자가 상기 케이. 락티스 게놈의 한정된 부위에 통합되어야 한다. 외부 유전자의 통합을 갖는 검색된 클론을 선택하는 경우에, 선택 마커로서 내성 유전자가 사용되어서는 안 된다. 더욱이, 자가영양성 균주가 가장 간단한 가능한 방법을 통해 영양요구성 균주로부터 생성되어야 한다. 이는 또한 보충되지 않은 합성 배지에서 상기 생성된 효모 백신 균주의 단순화된 발효를 허용해야 한다.

과제의 해결 수단

[0018] 이들 목적은 신규의 벡터 및 케이. 락티스 효모의 신규의 유전자 변형된 변종을 함유하고 단백질 항원의 특정한 성질에 최적화된 백신 균주의 생산을 허용하는 모듈 시스템을 제공함으로써 성취되었다. 벡터들간의 DNA 요소의 빌딩 블록-유형 교환을 통해, 외부 항원-암호화 영역의 효모 게놈내로의 효율적이고 통상적인 클로닝이, 발현시키고자 하는 외부 유전자와 무관하게 성취되었다. 적합한 외부 유전자의 표적화된 게놈 통합의 결과로서, 상기 효모 균주는 매우 많은 세대에 걸쳐 안정하고 유전학적으로 정확하게 한정된다. 이러한 성질들로 인해, 발효 공정은 비선택적 조건하에서 재현 가능하게 진행되며 표준화될 수 있다. 본 발명에 따른 케이. 락티스 효모의 최적화는, 가능한한 높지만 항원의 세포병변 효과가 효율적인 발효 공정을 심하게 방해하는 한계 미만에 있도록 단백질 생산 속도를 조절하는데 있다. 이는 유전학적 중재에 의해서 또는 다수의 유전학적 중재의 조합에 의해서 성취되었다:

- [0019] i. 락토스-유도성 전사 활성제의 농도의 증가,
- [0020] ii. *LAC4* 프로모터의 표적화된 변형, 및/또는
- [0021] iii. 항원-암호화 외부 유전자에 대한 유전자 용량의 점진적 증가.
- [0022] 더욱 또한, 본 발명에 따른 케이. 락티스 효모의 최적화는
- [0023] iv. 다중 항원을 동시에 발현시킬 수 있기 위해서 효모 게놈 중에 외부 유전자-암호화 카세트에 대한 다수의 새로운 통합 부위를 확립시키는데 있다.
- [0024] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 목적은 케이. 락티스 균주의 효모 게놈내로의 외부 유전자-암호화 핵산의 표적화된 클로닝을 위해 상기 케이. 락티스 균주를 제공함으로써 성취되며, 상기 케이. 락티스 균주가 *KILAC4* 유전자좌에 대한 대안으로서 또는 이에 더하여, *KIURA3-20* 유전자좌(*KLLA0E22771g*) 및/또는 *KIMET5-1* 유전자좌(*KLLA0B03938g*)에 외부 항원을 위한 통합 발현 카세트를 가지는 것을 특징으로 한다. 상기 케이. 락티스 균주가 *KILAC4* 유전자좌에 더하여, *KIURA3-20* 유전자좌(*KLLA0E22771g*) 및/또는 *KIMET5-1* 유전자좌(*KLLA0B03938g*)에 외부 항원을 위한 통합 발현 카세트를 가질 때 특히 바람직하다. 상기 케이. 락티스 균주가 *KILAC4* 유전자좌에 더

하여, *KIURA3-20* 유전자좌(*KLLA0E22771g*) 및 *K1MET5-1* 유전자좌(*KLLA0B03938g*)에 외부 항원을 위한 통합 발현 카세트를 가질 때 특히 매우 바람직하다. 상기와 같은 변형된 케이. 락티스 균주는, 외부 유전자의 발현을 위한 유전자가 상기 케이. 락티스 게놈 중의 특정한, 한정된 유전자좌에 통합되고 상기 외부 유전자의 카피 수를 조절할 수 있다는 장점을 갖는다. 더욱 또한, 상기 케이. 락티스 균주는 상기 케이. 락티스 게놈 중 한정된 유전자좌에 상이한 외부 항원의 발현을 위한 상이한 유전자의 통합을 허용한다.

- [0025] 본 발명의 상황에서 "외부 항원" 또는 "외부 단백질"은 인간 또는 동물에서 병원체 또는 발암성으로 생성된 세포에 대해 면역 반응, 바람직하게는 보호 면역 반응을 생성시키기에 적합한 모든 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질을 의미한다. 외부 단백질은 임의의 종류의 병원체 또는 종양으로부터 기원할 수 있으며, 상기에 대해 단독으로 보호 면역 반응을 유도할 수 있는, 바람직하게는 보호 면역 반응을 유도할 수 있는 항원이 특성화되었다.
- [0026] 바람직한 실시태양에서, 외부 단백질은 병원체(바이러스, 세균, 기생충)로부터 기원하며, 상기에 대해 단독으로 보호 면역 반응을 유도할 수 있는, 바람직하게는 보호 면역 반응을 유도할 수 있는 항원이 특성화되었다.
- [0027] 예를 들어, 이들은 하기와 같다:
- [0028] 기생충으로부터 기원하는 외부 단백질
- [0029] 아메리카 구충(*Necator americanus*); 두비니 구충(*Ancylostoma duodenale*): ASP 단백질, 헤모글로빈-분해 프로테아제
- [0030] 리슈마니아 편모충(*Leishmania*): gp63, 46 kD 전편모충 항원, LACK
- [0031] 말라리아 원충(*Plasmodium*): CSP 단백질, CSA-1, CSA-3, EXP1, SSP2, STARP, SALSA, MSP1, MSP2, MSP3, AMA-1, GLURP, Pfs25, Pfs 28, Pvs25, Pvs 28, Pfs 48/45, Pfs 230
- [0032] 주혈흡충(*Schistosoma*): TP1, Sm23, ShGSTs 26 및 28, 파라미오신, 기생충 미오신, Sm14
- [0033] 세균으로부터 기원하는 외부 단백질
- [0034] 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*): Ag85A, Hsp65, R8307, 19 kD, 45 kD, 10.4
- [0035] 헬리오박터 파이로리(*Helicobacter pylori*): VacA, LagA, NAP, hsp, 우레아제, 카탈라제
- [0036] A 그룹 스트렙토코커스(Group A *Streptococcus*): M, SCPA 펩티다제, 외독소 SPEA 및 SPEC, 피브로넥틴 결합 단백질
- [0037] 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumonia*): PspA, PsaA, BHV 3, BHV 4
- [0038] 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*): Vi 항원
- [0039] 시겔라(*Shigella*): LPS
- [0040] 비브리오 콜레라(*Vibrio cholera*): CTB
- [0041] 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) ETEC: LT, LT-ST, CTB
- [0042] 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*): F1, V
- [0043] 종양 세포/종양으로부터 기원하는 외부 단백질(종양-관련 항원, TAA)
- [0044] CEA
- [0045] 5T4
- [0046] MUC1
- [0047] MART1
- [0048] HER-2
- [0049] 바이러스로부터 기원하는 외부 단백질이 특히 바람직하다.
- [0050] 칼리시비리다에(*Caliciviridae*)(노위크, HEV): NV 60 kD; HEV ORF2
- [0051] 레오비리다에(*Reoviridae*)(로타): VP7, VP4

- [0052] 레트로비리다에(*Retroviridae*)(HIV): Gag, Pol, Nef, Env, gp160, gp120, gp140, gp41
- [0053] 플라비비리다에(*Flaviviridae*)(플라비바이러스 속: WNV, Dengue, YF, TBE, JEV): preM-Env, NS3, NS4, NS5
- [0054] 플라비비리다에(*Flaviviridae*)(페스티바이러스 속 BVDV, CSFV, BDV; 헤파시바이러스 속 HCV): E1, E2, E^{RNS}(페스티), C, NS3, NS4, NS5
- [0055] 헤파드나비리다에(*Hepadnaviridae*)(HBV): HBS 항원
- [0056] 파라믹소비리다에(*Paramyxoviridae*)(파라믹소비리나에(*Paramyxovirinae*): PIV-1, PIV-2, 유행성이하선염, 센다이, PIV-2, PIV-4, 모르빌리): M, HN, N, F
- [0057] 파라믹소비리다에(뉴모비리나에(*Pneumovirinae*): RSV): F, G, SH, M
- [0058] 라브도비리다에(*Rhabdoviridae*)(광견병): G
- [0059] 헤르페스비리다에(*Herpesviridae*)(EBV, HSV2): gp350/220 (EBV), gB2, gD2 (HSV)
- [0060] 코로나비리다에(*Coronaviridae*)(SARS): CoV, N, M, S
- [0061] 오소믹소비리다에(*Orthomyxoviridae*)(A형, B형 인플루엔자): HA, NA, M1, M2, NP
- [0062] 파필로마비리다에(*Papillomaviridae*): L2, E6, E7
- [0063] 본 발명의 추가의 실시태양에서, 변형된 케이. 락티스 균주는 발현 카세트가 케이. 락티스 *LAC4-12* 프로모터($P_{LAC4-12}$) 또는 상기 프로모터의 변종, 발현시키고자 하는 항원의 ORF, 및 *AgTEF1* 종결자를 함유하는 것을 특징으로 한다. 상기 실시태양은 $P_{LAC4-12}$ 프로모터 조절하의 외부 유전자의 발현이 *LAC4* 및/또는 *KIUR43* 및/또는 *KIMET5* 유전자좌에 통합 후에 락토스에 의해 대략적으로 균등하게 강하게 유도된다는 장점을 갖는다.
- [0064] 상술한 바와 같이, 백신 균주 중 항원 농도와 표적 유기체 중 효모 백신의 면역원성 효과간에 양의 상관성이 존재한다. 예를 들어 추가적인 *KIGAL4* 유전자의 통합으로 인한 과도하게 강한 과발현의 경우에 CPE를 예방하기 위해서, 다중 유전자 카피를 연속해서 빠르고 효율적으로 연결시키고 상기 3개의 유전자좌 중 하나에 상기 발현 카세트를 한 단계로 도입시키기 위해 상술한 벡터 시스템을 달리 변형시킬 수 있다(실시예 5 및 도 7A 참조).
- [0065] 따라서, 본 발명의 유리한 추가의 특징에서, 상기 변형된 케이. 락티스 균주는 *KILAC4* 유전자좌 또는 *KIUR43-20* 유전자좌 또는 *KIMET5-1* 유전자좌에 직렬 발현 카세트 또는 다중-발현 카세트를 통해 삽입되는 외부 항원-암호화 핵산 서열의 복수 카피를 함유한다. 상기 발현 카세트는 각각의 경우에 *LAC4-12* 프로모터($P_{LAC4-12}$) 또는 상기 프로모터의 변종 및 *AgTEF1* 종결자가 인접한 항원-암호화 영역(유전자)의 복수 카피를 포함한다. 이러한 방식으로 수행되는 상기 항원의 유전자 카피의 배가는 각 유전자좌 중 하나를 통해 그의 발현을 현저하게 증가시킬 수 있다.
- [0066] 본 발명의 바람직한 실시태양에서, 외부 항원 IBDV-VP2의 유전자는 케이. 락티스 균주의 *KILAC4* 유전자좌에 직렬 발현 카세트의 형태로 존재한다. 상기 케이. 락티스 균주는, 외부 항원 IBDV-VP2를 암호화하는 유전자의 단일 카피를 갖는 균주에 비해, 상기 외부 항원 IBDV-VP2가 증가된 양으로 발현된다는 장점을 갖는다. 본 발명의 상기 실시태양에 따라 특히 바람직하게, *KILAC4* 유전자좌에 직렬 발현 카세트 형태로 외부 항원 IBDV-VP2의 유전자를 갖는 균주 VAK1118(DSM 32701)이 제공된다.
- [0067] 더욱 또한, 상이한 외부 항원-암호화 핵산의 하나 이상의 카피가 본 발명에 따른 케이. 락티스 균주의 *KILAC4* 유전자좌 및/또는 *KIUR43-20* 유전자좌 및/또는 *KIMET5-1* 유전자좌에 단일 발현 카세트, 직렬 발현 카세트 또는 다중-발현 카세트를 통해 삽입되는 경우가 바람직하다. 그 결과, 첫 번째, 상이한 외부 항원을 발현시킬 수 있고, 두 번째, 상기 상이한 외부 항원을 효모 세포에서 상이한 농도로 발현시킬 수 있다. 상기 실시태양에 따라 특히 바람직하게, 외부 항원 A형 인플루엔자 HA(A/푸에르토리코/8/1934(H1N1)) 및 A형 인플루엔자 M1(A/푸에르토리코/8/1934(H1N1))의 암호화 핵산 서열이 케이. 락티스 균주의 *KILAC4* 및 *KIUR43-20* 유전자좌에 삽입되고 발현된 상기 케이. 락티스 균주가 제공된다. 본 발명의 상기 실시태양에 따라 특히 바람직하게, 외부 항원 A형 인플루엔자 HA(A/푸에르토리코/8/1934(H1N1)) 및 A형 인플루엔자 M1(A/푸에르토리코/8/1934(H1N1))의 암호화 핵산 서열이 케이. 락티스 균주의 *KILAC4* 유전자좌 및 *KIUR43-20* 유전자좌에 삽입된 VAK1283(DSM 32697) 균주가 제공된다.
- [0068] 언급한 바와 같이, *KIGAL4* 유전자 용량의 증가가 항원 생산의 상승을 유도할 수 있음이 공지되어 있다(Krijger

et al., 2012 및 WO 2013107436). 이를 상기 KIGAL4-발현 pLI-1 플라스미드의 통합을 통해 2-단계 공정으로 성취하는 단점은 상기에 서술되어 있다. 상기 단점은 상기 KIGAL4 유전자의 두 번째 카피를 함유하는 외부 유전자의 통합에 안정한 출발 균주를 제공함으로써 본 발명에 따라 극복되었다. 이는 확실히 모든 유래된 균주가 동일한 유전자 배경을 가지며 정확하게 하나의 추가적인 KIGAL4 유전자 카피가 상기 균주 중에 존재하게 한다. 이는 복수 카피의 발현의 경우에 관찰된 세포독성을 감소시키며 백신 균주 생산 단계를 단지 하나의 단계로 줄인다. 또한, 플라스미드의 가역적인 통합/삭제가 생략되므로, 유전학적 안정성이 증가된다. 상기와 같은 균주는, 예를 들어 실시예 1에 기재된 바와 같이 생산될 수 있다.

[0069] 본 발명의 추가의 유리한 실시태양에서, 이렇게 하여 제공되는 것은, 계놈 KIGAL4 유전자 외에, 상기 KIGAL4 유전자의 두 번째 이소성(ectopic) 카피를 추가로 함유하는 케이. 락티스 균주이다. 상기 균주에서, KIGAL4 전사 활성제의 발현이 최대 2배 증가될 수 있으며 상기 KILAC4 유전자좌 및/또는 KIURA3-20 유전자좌 및/또는 KIMET5-1 유전자좌에 삽입된 외부 유전자들의 발현이 LAC4-12 프로모터를 통해 또는 상기 프로모터의 하기에 기재된 변종을 통해 한정된 방식으로 증가될 수 있다. 통상적인 실시에서, KIGAL4를 암호화하는 플라스미드를 세포에 일시적으로 및 다수의, 조절되지 않은 카피 수로 도입시켰다. 그 결과, 외부 항원이 종종 세포독성 효과에 이르게 되는 높은 농도로 발현되었다. 본 발명의 상기 실시태양의 케이. 락티스 균주의 경우에, 세포독성 효과가 고도의 유효성으로 감소되거나 회피될 수 있다. 동일한 목적(LAC4-조절된 발현 카세트의 삽입)을 위해 장차 발생할 추가의 유전자좌를 또한 이러한 방식으로 조절할 수 있다. KIGAL4 프로모터 및 KIGAL4 종결자가 인접해 있는 KIGAL4 유전자의 이소성 카피가, KLLAOE13795g(KIavt3::KIGAL4-1, 서열번호 1) 유전자좌에서 상기 케이. 락티스 균주에 통합될 때 유리한 것으로 밝혀졌다. 본 발명의 상기 실시태양에 따라 특히 바람직하게, 이러한 성질들을 갖는 균주 VAK1111(DSM 32696)이 제공된다.

[0070] 추가의 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 외부 항원 IBDV-VP2의 암호화 핵산 서열이 KILAC4 유전자좌에 존재하는 케이. 락티스 균주를 제공한다. 본 발명의 상기 실시태양에 따라 특히 바람직하게, 균주 VAK1171(DSM 32699)을 제공한다. 상기 균주는 KIGAL4 유전자의 두 번째 이소성 카피를 추가로 함유하며, 상기에 상기 외부 항원 IBDV-VP2의 암호화 핵산 서열이 마찬가지로 존재한다. 상기 균주는 KIGAL4 유전자의 추가적인 이소성 카피가 없는 균주에 비해 상기 외부 항원 IBDV-VP2의 증가된 발현을 나타낸다.

[0071] 미생물에서 이중 단백질 생산은 상기가 세포병변 효과(CPE)를 유도하는 경우 문제가 된다. 따라서 본 발명은 상기 항원 생산 단계를 바이오매스 축적 단계와 분리시키는 방법을 제공한다. 이는 유도성 LAC4 프로모터로 인해, 예를 들어 유가 발효 공정에 의해 부분적으로 가능하지만, 프로모터 P_{LAC4-12}가 비유도 조건하에서 완전히 폐쇄되지 않기 때문에(즉 어느 정도 개방되기 때문에) 방해받는다. 매우 강한 CPE를 갖는 항원의 경우에, 결과적으로 발생하는 것은 증식률의 감소 및 세포 스트레스 반응의 유도이며, 이는 항원 생산에 불리한 효과를 갖는다. 상기 문제는 상기 KIGAL4 유전자 용량의 배가 및/또는 항원-암호화 서열 수의 증가(하기 참조)에 의해 악화된다.

[0072] 따라서 본 발명에 따른 케이. 락티스 균주의 유리한 추가적인 특징은 외부 단백질 발현을 비유도 조건하에서 단지 약간만 허용하거나 또는 허용하지 않는 LAC4-12 프로모터의 변형된 프로모터 구조를 갖는 케이. 락티스 균주에 있다. 상기 LAC4-12 프로모터의 변형된 구조는 특히, 1065번과 1540번 위치 사이의 프로모터 P_{LAC4-12}의 기본 조절 영역(BCR)(LR2 결실; P_{LAC4-12-LR2}; 서열번호 2)이 결실된 것을 특징으로 한다(또한 실시예 2 참조). 상기에 이미 기재된 바와 같이, 본 발명의 상기 실시태양은 통상적인 실시예에 비해, 외부 유전자의 과도하게 강한 발현에 의해 통상적으로 야기되는 세포독성 효과가 고도의 유효성으로 감소되거나 회피된다는 장점을 갖는다. 상기 실시태양에 따라 바람직하게, 외부 항원 A형 인플루엔자 HA(A/푸에르토리코/8/1934(H1N1))의 암호화 핵산 서열이 KILAC4 유전자좌에 존재하는 케이. 락티스 균주가 제공된다. 본 발명의 상기 실시태양에 따라 특히 바람직하게 VAK1243(DSM 32702) 균주가 제공된다. 상기 균주는 LAC4-12 프로모터 중에 LR2 결실을 함유한다.

[0073] 상기 케이. 락티스 균주는 또한 외부 단백질 발현의 조절을 허용하는 LAC4-12 프로모터의 변형된 구조를 가질 수 있으며, 여기에서 상기 프로모터의 활성제 KIGal4에 대한 결합 부위의 수("상류 활성화 서열" 1, 2 및 4, 5)가 다양하고 1, 2, 3 또는 4개의 KIGal4-결합 부위가 존재한다. 이렇게 하여, 효모 세포에서 상이한 외부 단백질을 상이한 농도로 발현시킬 수 있다(설계 기반 품질). 상기 단축된 프로모터 변종은 특히, 예를 들어 고도로 면역원성인 바이러스-유사 입자(VLP)의 형성을 위해, 예를 들어 동일 균주에서 단백질을 최적의 화학량론적 비로 발현시키기 위해, 상기 시스템의 모듈성에 중요하다. 본 발명의 상기 실시태양에 따라, 외부 항원 IBDV-VP2의 암호화 핵산 서열을 케이. 락티스 균주의 KILAC4 유전자좌에 삽입시키는 경우가 바람직하다. 본 발명의 상기 실시태양에 따라 특히 바람직하게, 균주 VAK1131(DSM 32700)이 제공된다. 상기 균주는 LAC4-12 프로모터에

LR2 결실 및 상류 활성화 서열 4 및 5의 결실을 함유한다.

- [0074] 본 발명의 목적 중 일부는 배양에 보다 양호하게 적합한 케이. 락티스 균주를 제공하는 것이었다. 상기 문제는 본 발명에 따른 케이. 락티스 균주에서 대립유전자 *Kllac4*, *Klura3-20* 및 *Klmet5-1*의 유전자 기능을 회복시킴으로써 해결된다. 생성되는 케이. 락티스 균주는 자가영양성이다(실시예 6, 도 8). 이렇게 하여 백신 균주의 발효가 단순화되며, 생산 공정의 확립이 용이해지고 보다 비용-효율적으로 된다. 본 발명의 상기 실시태양에 따라 바람직하게, 외부 항원 BVDV E2 엑토도메인(1형, CP7), BVDV E2 엑토도메인(2형, 뉴욕 93) 및 BVDV Npro-NS3(1형, CP7)의 암호화 핵산 서열이 상기 케이. 락티스 균주의 *KILAC4*, *KIURA3-20* 및 *KIMet5-1* 유전자좌에 삽입된 케이. 락티스 균주가 제공된다. 본 발명의 상기 실시태양에 따라 특히 바람직하게, 균주 VAK1400(DSM 32698)이 제공된다. 상기 균주는 자가영양성이다.
- [0075] 특히 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 균주
- [0076] VAK952 DSM 32705;
- [0077] VAK1111 DSM 32696;
- [0078] VAK1118 DSM 32701;
- [0079] VAK1131 DSM 32700;
- [0080] VAK1171 DSM 32699;
- [0081] VAK1243 DSM 32702;
- [0082] VAK1283 DSM 32697;
- [0083] VAK1395 DSM 32706;
- [0084] VAK1400 DSM 32698
- [0085] 중에서 선택된 케이. 락티스 균주를 제공한다.
- [0086] 상기 균주는 부다페스트 조약에 따라 상기 명시된 번호하에 2017년 11월 24일 또는 2017년 12월 1일(DSM 32705, DSM 32706)자로 독일 브라운슈바이그 38124 인호펜스트라세 7B 소재의 *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*[독일 미생물 및 세포 배양물 콜렉션 GmbH], DSMZ에 기탁되었다.
- [0087] 추가의 태양에서, 본 발명은 통합 발현 벡터를 제공하며, 이는 본 발명의 케이. 락티스 균주의 도움으로 생산될 수 있다.
- [0088] 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 통합 발현 벡터 *K/pURA3*(서열번호 3) 및 *K/pMET5*(서열번호 4)를 제공한다. 상기 벡터들은 발현시키고자 하는 항원의 ORF, 추가로 *AgTEF1* 종결자 서열 및 또한 통합 후 *Klura3-20* 및 *Klmet5-1* 대립유전자의 기능성의 표적화된 회복을 허용하는 표적 서열을 포함하여 *LAC4-12* 프로모터($P_{LAC4-12}$) 또는 상기 프로모터의 변종(케이. 락티스 균주에 대해 상술한 바와 같은)을 함유한다. 항원-암호화 서열을 상기 발현 카세트의 프로모터 서열과 종결자 서열 사이에, 한정된 제한 부위를 통해 클로닝한다. 상기 벡터에 의해, 외부 유전자-발현 카세트를 마커 및 항생제 내성의 사용 없이 안정한 방식으로 상기 케이. 락티스 균주내에 통합시킨다. 상응하게, 상기 벡터 시스템의 강점은 외부 유전자를 상이한 벡터들간에 쉽게 교환할 수 있으며 발현 카세트의 프로모터 및 종결자를 다른 것들과 교체할 수 있다는 것이다. 상기 발현 카세트는 $P_{LAC4-12}$ 프로모터 및 *AgTEF1* 종결자, 및 또한 그 사이의 외부 유전자로 이루어진다. 상기 외부 유전자는 제한 부위 *AscI* 및 *NotI*를 통해 교환될 수 있다. 상기 $P_{LAC4-12}$ 프로모터는 2개의 벡터 모두에서 제한 부위 *SmaI* 및 *AscI*를 통해 교체될 수 있으며, 상기 종결자는 *K/pURA3*에서 *NotI* 및 *BoxI*(또는 *MluI*)를 통해, *K/pMET5*에서 *NotI* 및 *EcI136II*(또는 *SacI*)를 통해 교체될 수 있다. 대안의 발현 카세트를 *K/pURA3* 중의 제한 부위 *SmaI* 및 *BoxI*(또는 *MluI*) 사이, 및 *K/pMET5* 중의 *SmaI* 및 *EcI136II*(또는 *SacI*) 사이에 클로닝시킨다. 상기 서술된 제한 효소를 사용하여, 상기 발현 카세트를 또한 *K/pMET5* 및 *K/pURA3* 벡터 사이에서 교환하거나 또는 추가적인 발현 카세트를 도입시킨다. *K/p3* 및 *K/p3-MCS* 벡터(WO 20101054649)보다 개선된 것은, 선택을 비유도 조건(락토스 없이)하에서 수행하고 이에 의해 CPE를 갖는 단백질의 경우에 보다 높은 형질전환율에 이르게 되며 감소된 외부 유전자 발현과 함께 형질전환체의 가능한 농축이 방지된다는 것이다. 실시예 3.1 및 3.2를 또한 참조하시오.
- [0089] 본 발명의 특히 바람직한 실시태양에서, *K/pMET5-P_{LAC4-12}-Et*, *K/pMET5-P_{LAC4-12}-LR2-Et*, *K/pMET5-P_{LAC4}-Et*, *K/pMET5-*

$P_{LAC4-LR2}$ 및 $K/pURA3-P_{LAC4-12}-Et$, $K/pURA3-P_{LAC4-12-LR2}-Et$, $K/pURA3-P_{LAC4}-Et$ 및 $K/pURA3-P_{LAC4-LR2}$ (서열번호 5, 6, 7 또는 8과 함께 서열번호 3 또는 서열번호 4) 중에서 선택된 통합 발현 벡터를 제공한다.

[0090] 벡터 $K/pURA3-P_{LAC4-12}-Et$, $K/pURA3-P_{LAC4-12-LR2}-Et$, $K/pURA3-P_{LAC4}-Et$ 및 $K/pURA3-P_{LAC4-LR2}$ 는 벡터 $K/pURA3-Et$ 의 변종이며, 각각의 경우에 상기 벡터내로 $Et_x.B-HA$ 단백질의 암호화 핵산 서열이 삽입된다. 벡터 $K/pURA3-P_{LAC4-12}-Et$, $K/pURA3-P_{LAC4-12-LR2}-Et$, $K/pURA3-P_{LAC4}-Et$ 및 $K/pURA3-P_{LAC4-LR2}$ 는 벡터 $K/pURA3-Et$ 에 비해 프로모터에 차이가 있다.

[0091] 벡터 $K/pMET5-P_{LAC4-12}-Et$, $K/pMET5-P_{LAC4-12-LR2}-Et$, $K/pMET5-P_{LAC4}-Et$, $K/pMET5-P_{LAC4-LR2}$ 는 벡터 $K/pMET5$ 의 변종이며, 각각의 경우에 상기 벡터내로 $Et_x.B-HA$ 단백질의 암호화 핵산 서열이 삽입된다. 벡터 $K/pMET5-P_{LAC4-12}-Et$, $K/pMET5-P_{LAC4-12-LR2}-Et$, $K/pMET5-P_{LAC4}-Et$, $K/pMET5-P_{LAC4-LR2}$ 는 벡터 $K/pMET5$ 에 비해 프로모터에 차이가 있다.

[0092] 추가의 태양에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 본 발명에 따른 케이. 락티스 균주의 생산 방법을 제공한다:

[0093] (i) $K/pURA3$ 또는 $K/pMET5$ 벡터내에 목적하는 항원의 암호화 핵산 서열을 삽입하는 단계,

[0094] (ii) 변형되고 앞서 효소에 의해 절단된 벡터 구조물(들)로 케이. 락티스 배양물을 형질전환시키는 단계,

[0095] (iii) 우라실 및/또는 메티오닌을 함유하지 않는 고체 배지의 도움으로, 형질전환된 케이. 락티스 세포를 선택하는 단계, 및

[0096] (iv) 임의로 자가영양성을 회복시키는 단계.

[0097] 본 발명에 따른 방법의 하나의 실시태양에서, 다중 항원의 유전자 서열들을 동시에 이소성으로 삽입시키고 조절된 방식으로 발현시킬 수 있다. 병원체의 상이한 변종의 항원을 암호화하는 상이한 유전자 서열을 이소성으로 삽입시키고 조절된 방식으로 발현시키는 경우가 바람직하다. 더욱 또한, 상이한 병원체의 항원을 암호화하는 상이한 유전자 서열을 이소성으로 삽입시키고 조절된 방식으로 발현시키는 경우가 바람직하다.

[0098] 추가의 태양에서, 본 발명은 본 발명에 따른 케이. 락티스 균주를 임의로 통상적인 비히클 및/또는 부형제와 함께 함유하는, 비경구, 장, 근육내, 점막 또는 경구 투여용 약학 또는 수의학-약물 조성물을 제공한다. 특히, 본 발명은 백신접종에 적합한 약학 또는 수의학-약물 조성물을 제공한다.

[0099] 바람직하게, 상기 약학 또는 수의학-약물 조성물은 적어도 하나의 생리학적으로 상용성인 비히클, 희석제, 항원 보강제 및/또는 부형제를 포함한다. 본 발명에 따른 케이. 락티스 균주는 약학적으로 상용성인 비히클 중에, 예를 들어 주사용 약학 조성물로서 통상적인 매질 중에, 예를 들어 수성 염수 매질 또는 완충액 중에 함유될 수 있다. 상기과 같은 매질은 통상적인 약학 물질, 예를 들어 삼투압 설정용의 약학적으로 상용성인 염, 완충제, 보존제 등을 또한 함유할 수 있다. 바람직한 매질은 생리 식염수 및 인간 혈청을 포함한다. 특히 바람직한 매질은 PBS-완충된 염수 용액이다.

[0100] 추가의 적합한 약학적으로 상용성인 비히클은 예를 들어 문헌[Remington's Practice of Pharmacy, 13th edition] 및 [J. of Pharmaceutical Science & Technology, Vol. 52, No. 5, Sept-Oct, pages 238-311]으로부터 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다.

[0101] 본 발명의 추가의 태양은 백신접종을 위한, 예를 들어 보호 면역화, 특히 병원체에 대한 보호 면역화의 생성을 위한 본 발명에 따른 제조합 케이. 락티스 효모의 용도를 제공한다.

[0102] 보호 면역화의 생성을 위한 상응하는 방법은 예를 들어 하기의 단계를 포함한다:

[0103] a) 본 발명에 따른 제조합 효모를 배양 및 증식시키고,

[0104] b) 상기 효모를 수확 및 불활성화시키고,

[0105] c) 상기 제조합 효모를 한정된 면역화 설계에 따라 투여하고,

[0106] d) 상기 형성된 항체의 역가를 측정하고, 및/또는

[0107] e) 면역화를 검출한다.

[0108] 본 발명에 따른 제조합 효모의 배양 및 증식을 임의의 통상적으로 입수할 수 있는 방법을 사용하여 성취할 수 있다. 비용-효과적인 방식으로 높은 세포 수율을 유도하는 방법이 특히 바람직하다. 이러한 방법에는 발효 방법, 특히 고-세포-밀도 발효 방법이 포함된다. 유가 발효 프로토콜을 사용하여 발효를 수행하는 것이 특히 유

리한 것으로 밝혀졌다.

- [0109] 바람직한 실시태양에서, 상기 보호 면역화는 재조합 효모를 경구/점막, 근육내 또는 피하 투여하여 성취된다.
- [0110] 상기 재조합 효모 세포는 본 발명에 따른 방법에서 불활성화된/사멸된 상태에서 사용되어야 한다. 이를 위해서, 상기 효모를, 외부 유전자의 배양 및 발현 후에 건조시키고 후속적으로 불활성화시킨다. 상기 불활성화는 임의의 통상적으로 입수할 수 있는 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 본 발명에 따른 방법에 사용하기에 특히 적합한 것은 열 불활성화(예를 들어 90℃에서 2시간 동안의 열불활성화) 또는 γ -조사(예를 들어 25 또는 50 kGy)이다.
- [0111] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 케이. 락티스 균주를 피실험체, 예를 들어 동물 또는 인간, 바람직하게는 동물에게, 상기 피실험체에서 하나 이상의 외부 항원에 대한 면역 반응, 바람직하게는 보호 면역 반응을 촉발시키기 위해 충분한 양으로 투여함을 포함하는, 백신접종 방법을 제공한다.
- [0112] 특별한 장점은, 본 발명에 따른 케이. 락티스 균주를 사용하는 경우, 하나의 병원체에 대한 보호 면역 반응이 단일 적용/면역화("원 샷") 후에 또는 이중 적용/면역화("프라임-부스트") 후에 단독으로 촉발된다는 것이다. 추가의 장점인 것으로 밝혀진 것은 본 발명에 따른 케이. 락티스 균주를 사용하는 경우, 병원체의 상이한 변종에 대한 교차-보호 면역 반응이 단일 적용/면역화("원 샷") 후에 또는 이중 적용/면역화("프라임-부스트") 후에 촉발될 수 있다는 것이다. 심지어, 본 발명에 따른 케이. 락티스 균주가 상이한 병원체의 항원에 대한 상이한 외부 유전자를 갖고 이를 발현하는 경우, 단일 적용/면역화("원 샷") 후에 또는 이중 적용/면역화("초회접종-추가접종") 후에 상이한 병원체에 대한 보호 면역 반응의 촉발이 가능하다.
- [0113] **발명의 장점의 요약**
- [0114] 상기 케이. 락티스 플랫폼에 대해 기재된 개선은 다수의 장점을 가져온다:
- [0115] a. 효모 기반 "서브유닛 백신"의 균주 구성에서 큰 단순화(바로 사용되는 툴박스/키트) 및 높은 재현성이 가능해진다. 본 발명에 이르러 상기 백신이 한정된, 짧은 기간내에 생성될 수 있다.
- [0116] b. 상기 효모 백신은 하나 이상의 항원을 함유할 수 있다; 상기 백신을 용통성있는 방식으로 맞춤 제조하고 상이한 양으로 생산할 수 있다.
- [0117] c. 더욱이, 자가영양성 효모의 효율적인 발효가 가능해진다.
- [0118] d. 재조합 단백질 생산의 엄격한 유도가 가능해진다. 후자는 CPE를 촉발할 수 있는 단백질에 특히 중요하다.
- [0119] e. 외부 유전자의 표적화된, 안전한 계능 통합 및 상기 균주의 관련된 유전학적 안정성은 생산 공정을 재현 가능하게 진행시킨다는 장점을 제공한다. 이는 GMP 생산에 특히 중요하다.
- [0120] f. 효모 백신의 보호성이, 외부 유전자 카피 및/또는 KIGAL4 농도의 증가의 결과로서 성취되는 재조합 항원 생산의 증가에 의해 개선된다.
- [0121] g. 또한, 투여되는 백신 용량이, 외부 유전자 카피 및/또는 KIGAL4 농도의 증가의 결과로서 성취되는 재조합 항원 생산의 증가에 의해 감소될 수 있다. 이에 의해 효모 생산은 보다 비용-효율적이며 상기 백신 수용자에 대한 상기 백신의 상용성이 개선된다.
- [0122] h. 다가 효모 백신을, 동일한 병원체의 상이한 변종에 대한 또는 상이한 병원체에 대한 예방을 위해 교차-보호 또는 다가 보호 방식으로 사용할 수 있다. 불활성화 및 적합한 항원보강제 및/또는 적합한 액체 부피의 혼합의 예는, 백신으로서 사용하기 위한 상기 효모의 추가적인 하류 가공이 요구되지 않는다.

도면의 간단한 설명

- [0123] 본 발명을 도면 및 예시적인 실시태양에 근거하여 하기에 보다 구체적으로 설명한다.

도 1은 2개의 KIGAL4 카피를 갖는 새로 생성된 케이. 락티스 배경 균주의 특성화를 도시한다. 식별된 통합 부위에 두 번째 이소성 KIGAL4 카피의 존재를 점검하고 효모 증식에 대한 통합 효과를 분석하였다. A: 이소성 KIGAL4 카피의 통합 부위의 다이어그램. 통합 부위를 나타내고 유전자 명칭을 제공한다. B: 추가로 통합된 이소성 KIGAL4 유전자가 있고(VAK1110) 없는(VAK367) 효모 균주의 KIAIT3 유전자좌의, 프라이머 VK183(5'-GAGCCACCACCTGCTCTG-3')(서열번호 9) 및 VK184(5'-CTGATGTATTGCGCTCCTTACTAAC-3')(서열번호 10)를 사용하는 PCR-증폭된 단편의 아가로스 젤. 각각의 예상된 단편 크기를 다이어그램의 우측에 제공한다. C: 글루코스(YPD)

또는 락토스(YPLac)상의 일련의 10배 희석물(출발-OD 1)에 대한 드롭 시험. 배양을 각각의 경우에 30℃ 및 37℃에서 수행하였다. 고유의 유전자좌에 *KIGAL4* 카피(VAK1139), 이소성 유전자좌에, 및 고유의 유전자좌에 결실된 *KIGAL4*(VAK1110)를 갖는, *KIGAL4* 카피가 없는($\Delta Kigal4$; VAK964) 또는 2개의 *KIGAL4* 카피를 갖는(VAK1168) 효모 균주의 증식을 비교하였다. 입증된 것은 추가의 *KIGAL4* 유전자의 한정된 통합이 단지 미미한 증식 결함을 유도한다는 것이다: 상기 결함은 오직 37℃ 및 유도 조건하에서만 볼 수 있다. 보다 분명한 것은 *KIGAL4*의 완전한 결실의 경우에 증식 결함이 있다는 것이다.

도 2는 추가적인 이소성 *KIGAL4* 카피를 갖는 IBDV-VP2-생산 케이. 락티스 균주의 단백질에 대한 웨스턴 블롯 분석을 도시한다. *LAC4-12* 프로모터-의존적인 재조합 단백질 생산에 대한 추가적인 *KIGAL4* 카피의 효과를 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다. 사용된 시험 균주는 IBDV-VP2 발현 카세트(하기 참조)를 갖는 효모 균주였으며, 상기 효모 균주를 다른 IBDV-VP2 효모 균주와 비교하였다. 이소성 *KIGAL4* 카피 및 직렬 IBDV-VP2 발현 카세트(하기 참조)의 존재(+) 또는 부재(-)를 위에 나타낸다. 균주 VAK911에서, 이소성 카피를 *BstEII*를 사용하여 플라스미드 pLI-1의 선형화에 의해 도입시켰으며(Krijger *et al.* 2012 and WO 2013107436), 균주 VAK1130에서, 이소성 *KIGAL4* 카피를 *KIAVT3* 유전자좌에 도입시켰다(도 1 참조). 효모 균주 VAK367은 외부 유전자가 없는 야생형 대조용으로서 포함되었다. 상기 효모 균주들을 YPD에서 예비 배양 후에 15h 동안 YPLac에서 배양하였다. 각각의 경우에 효모 균주당 20 μ g의 단백질 추출물을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 면역블롯팅을 항-IBDV 토끼 혈청(1:8000) 및 염소로부터의 HRP-접합된 항-토끼 항체(1:10 000)를 사용하여 수행하였다. 다량체성(agg.) 및 단량체성(mon.) IBDV-VP2를 우측에 화살표로 나타내고, 비특이적인 밴드를 별표로 나타낸다. 입증된 것은 추가적인 *KIGAL4* 유전자의 이소성 발현이, 직렬 발현 카세트의 존재에서와 같이(또한 하기 참조), 외부 항원 농도의 강한 증가를 유도한다는 것이다.

도 3은 유도되지 않은 재조합 단백질 생산 및 글루코스상의 효모 증식에 대한 *LAC4-12* 프로모터 중 LR2 결실의 영향을 예시한다. 변형되지 않은 *LAC4-12* 프로모터는 또한 비유도 조건하에서 GOI(관심 유전자)의 기본 발현을 나타낸다. 이는 세포독성적으로 작용하는 외부 항원의 경우에 특히 문제가 된다. 이들 실험으로 시험된 것은 *LAC4-12* 프로모터의 BC 영역 중 결실(LR2 결실)이 비유도 조건하에서 재조합 단백질 생산을 감소시킬 수 있는지 또는 심지어 완전하게 억제시킬 수 있는지의 여부였다. A: *LAC4-12* 프로모터($P_{LAC4-12}$)의 다이어그램. 기본 조절 영역(BCR), LR2 결실 및 4개의 *KIGAL4*-결합 부위(상류 활성화 서열: U1, U2, U4, U5) 및 또한 외부 유전자(GOI)의 암호화 핵산 서열이 도시된다. B: 비유도 조건하에서 배양(YP 3% EtOH) 후에, LR2 결실이 있고(VAK1131) 없는(VAK1130) IBDV-VP2 효모 균주의 웨스턴 블롯팅. VAK1111은 외부 유전자가 없는 야생형 대조용으로서 사용되었다. 각각의 효모 균주의 경우, 50 μ g의 단백질 추출물을 12% SDS 겔상에 로딩하였다. 면역블롯팅을 항-IBDV 토끼 혈청(1:5000) 및 염소로부터의 HRP-접합된 항-토끼 항체(1:10 000)를 사용하여 수행하였다. 로딩 대조용 *KINop1*을 마우스 항-Nop1 항체(1:5000) 및 염소로부터의 HRP-접합된 항-마우스 항체(1:10 000)를 사용하여 검출하였다. C: YPD, 0.5% 글루코스를 함유하는 YPD 및 YPLac 상의 일련의 10배 희석물(출발-OD 1)에 대한 드롭 시험. 배양을 각각의 경우에 30℃ 및 37℃에서 수행하였다. LR2 결실이 있고(VAK1243) 없는(VAK952), *LAC4* 유전자좌에 A형 인플루엔자 HA 외부 유전자를 갖는 효모 균주의 증식을 비교하였다. 효모 균주 VAK367을 외부 유전자가 없는 야생형 대조용으로서 사용하였다. 입증된 것은 LR2 결실이, 불필요한 기본적인 외부 단백질 발현을 방지한다는 것이다. 더욱 또한, 입증된 것은 LR2 결실이 비유도 조건 및 유도 조건의 모든 조건 하에서 세포독성 단백질(인플루엔자 헤마글루티닌, HA)을 발현하는 효모 균주의 증식을 개선시킨다는 것이다. 이는 37℃에서 특히 분명하다.

도 4는 케이. 락티스 계놈의 상이한 유전자좌내로의 단백질 발현 카세트의 통합에 사용될 수 있는 *KIp* 벡터를 도시한다. *LAC4* 유전자좌(*KIp3* 벡터 시스템)의 용도는 이미 기재되었지만(WO 20101054649 및 WO 2013107436), *KIURA3* 및 *KIMET5*의 용도는 새로운 것이다. A: 계놈 중 각각의 통합 부위와 함께 상이한 *KIp* 벡터의 다이어그램. B & C: 여기에서 새롭게 기재되는 *KIpURA3*(B) 및 *KIpMET5*(C) 벡터 중의 발현 카세트 및 인접 단위. 상이한 DNA 서열 분절 및 관련된 제한 부위를 나타낸다. GOI: 외부 유전자(관심 유전자). D: *KIp* 벡터(A, B & C)의 도움으로 구성된 효모 균주에서의 외부 단백질 발현의 웨스턴 블롯팅 분석. 여기에서, 외부 유전자는 Etx.B-HA이다. 효모 '하우스-키퍼' *KINop1* 단백질(KLLA0C04389g)이 로딩 대조용으로서 검출되었다. 효모 균주를 YPD(+U)에서 예비 배양 후에 4h 동안 YPLac(+U)에서 배양하였다. 각각의 효모 균주에 대해서, 30 μ g의 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE상에 로딩하였다. 면역블롯팅을 단클론 마우스 항-HA(1:5000) 및 항-KINop1(1:5000; Santa Cruz, TX, USA) 항체 및 또한 염소로부터의 HRP-접합된 항-마우스 항체(1:10 000; Jackson ImmunoResearch, PA, USA)를 사용하여 수행하였다. 입증된 것은, *LAC4* 유전자좌와 유사하게(WO 20101054649 및 WO 2013107436), *KIURA3* 및 *KIMET5*가 모두 이중 유전자 발현에 유용하다는 것이다.

도 5는 동일한 효모 균주에서 상이한 재조합 단백질의 생산을 도시한다. 상기 효모 균주(VAK1234)는 KlpURA3 및 Klp3-MCS 벡터를 사용하여 구성되었다. 외부 유전자로서 Etx.B-HA와 함께 추가적인 발현 카세트가 KlpURA3 벡터 (VAK1234)의 도움으로 도입된 직렬 IBDV VP2-발현 효모 균주(하기 참조)의 단백질에 대한 웨스턴 블롯팅 분석. 사용된 대조용은 계능 중의 LAC4(VAK899) 또는 KIURA3 유전자좌(VAK1235)에 Etx.B-HA와 함께 단지 발현 카세트 만, 또는 LAC4 유전자좌(VAK1171)에 단지 직렬 IBDV-VP2 발현 카세트만을 갖는 효모 균주였다. 상기 효모 균주를 YPD에서 예비 배양후에 6h 동안 YPLac에서 배양하였다. 각각의 효모 균주에 대해서, 30 μ g의 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE상에 로딩하였다. 면역블롯 중의 단백질의 검출을, Etx.B-HA의 경우에 마우스 항-HA 항체 (1:5000; Santa Cruz, TX, USA) 및 또한 염소로부터의 HRP-접합된 항-마우스 항체(1:10 000)를 사용하고 IBDV-VP2의 경우에 토끼 항-IBDV 항혈청(1:5000; Granzow et al.(1997)) 및 염소로부터의 HRP-접합된 항-토끼 항체 (1:10 000; Jackson ImmunoResearch, PA, USA)를 사용하여 수행하였다. 입증된 것은 상기 두 외부 단백질이 모두 동일한 효모 세포에서 발현된다는 것이다. 놀랍게도, 하나의 항원의 발현 수준은 또 다른 항원의 동시발현시 제한되지 않는다. 이는 1가 및 2가 균주에서의 발현 수준의 비교에서 분명하다(또한 도 12 참조).

도 6은 Klp 벡터 중의 발현 카세트에 대한 상이하게 유도된 LAC4-12 프로모터 변종을 도시한다. 상기 Klp 벡터의 발현 카세트에 상기 LAC4-12 프로모터의 상이한 변종이 제공되었다. 단백질 합성의 유도 강도에 대한 상기 프로모터 변종의 영향을, 외부 유전자로서 Etx.B-HA를 갖는 상응하는 발현 카세트를 함유하는 효모 균주의 분석을 토대로 시험하였다. A: 프로모터 변종, 외부 유전자로서 Etx.B-HA를 갖는 관련된 KlpURA3 벡터 및 이로부터 생성된 효모 균주의 도식적 표현. BCR: 전사 활성제 KICat8 및 KISip4, 비유도 조건하의 전사 활성제의 결합 영역; U1, U2, U4, U5: 전사 활성제 KIGal4에 대한 결합 영역(상류 활성화 서열). B: KlpURA3 벡터(A)를 사용하여 생성된 효모 균주 중 LAC4-12 프로모터 변종의 특성화를 위한 웨스턴 블롯팅 분석. 효모 균주를 YPD에서 예비 배양 후에 4h 동안 YPLac에서 배양하였다. 각각의 효모 균주에 대해서, 30 μ g의 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE상에 로딩하였다. 면역블롯팅을 단클론 마우스 항-HA(1:5000) 및 항-Nop1(1:5000) 항체 및 또한 염소로부터의 HRP-접합된 항-마우스 항체(1:10 000)를 사용하여 수행하였다. 입증된 것은 외부 유전자의 발현율이 사용된 프로모터의 성질에 따라 변한다는 것이다.

도 7은 재조합 단백질 생산에 대한 직렬 발현 카세트에 의한 외부 유전자 카피 수의 배가 효과를 도시한다. 직렬 발현 카세트에 의한 외부 유전자 카피 수의 증가에 의한 재조합 단백질 생산(IBDV-VP2)에 대한 영향을 시험하였다. A: 직렬 발현 카세트의 도식적 표현. DNA 분절 및 관련된 제한 부위를 나타낸다. GOI: 외부 유전자(관심 유전자). B: ScURA3 선택 마커의 도움으로 무작위 통합을 위한 (A)로부터 유래된 직접 구조물을 묘사한다. C: 직렬 발현 카세트(A)를 갖는 효모 균주(VAK1118) 및 단지 하나의 외부 유전자 카피만을 함유하는 발현 카세트를 갖는 효모 균주(VAK910)에서 IBDV-VP2 단백질 생산을 비교하기 위한 웨스턴 블롯팅 분석. 상기 효모 균주들을 YPD에서 예비 배양 후에 3h 또는 6h 동안 YPLac에서 배양하였다. 각각의 효모 균주의 경우에 60 μ g의 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE 상에 로딩하였다. 면역블롯팅을 항-IBDV 토끼 혈청(1:10 000) 및 염소로부터의 HRP-접합된 항-토끼 항체(1:10 000)를 사용하여 수행하였다. 응집된(agg.) 및 단량체성(mon.) IBDV-VP2를 우측에 화살표로 나타내고, 비특이적인 밴드를 별표로 나타낸다. D: 하나의 발현 카세트만을 갖는 Klp3-MCS-생성된 효모 균주 및 또한 추가적인 KIGAL4-1 카피(pLI-1)을 갖는 상기로부터 유래된 효모 균주와 비교된, 무작위 통합된 직렬 IBDV-VP2 발현 카세트(B)를 갖는 효모 균주의 웨스턴 분석. 상기 효모 균주들을 YPD에서 예비 배양 후에 8h 동안 YPLac에서 배양하였다. 면역블롯팅을 (b)에 기재된 바와 같이 수행하였다. 입증된 것은 직렬 발현 카세트의 사용이 외부 단백질 발현율을 현저하게 증가시킨다는 것이다.

도 8은 대립유전자 Klura3-20 및 Klmet5-1(A)의 유전자 기능을 회복시키기 위한 유전자 단편을 도시한다. KIURA3(A) 및 KIMET5(B)에 대한, 유전자좌 및 명시된 프라이머를 사용하여 증폭시킨 유전자 단편을 도식적으로 묘사한다. 상동성 재조합에 의해 이들 유전자 단편과 재편성된 대립유전자 Klura3-20(A) 및 Klmet5-1(B)의 돌연변이를 유전자 아래에 별표로서 도시한다. 서브클로닝된 단편이 컷아웃된 제한 부위를 도시한다. 상기 다이어그램은 URA3 또는 MET5 유전자좌에서 자가영양성 외부 유전자-발현 효모 균주를 생성시키는 전략을 예시한다.

도 9는 표 1 및 표 2와 함께, 고전적인 초회-추가 백신접종 설계에서 vvIBDV에 대한 치킨의 보호 면역화를 예시한다. 2개의 실험(A 및 B)에서, 적어도 16 SPF 치킨 그룹을, 유전학적으로 최적화된 직렬 IBDV-VP2 케이. 락티스 효모 균주 VAK1127의 동결건조된 및 열-불활성화된 효모 세포로 초회-추가접종 방법에 따라 피하 백신접종하였다. 1차 백신접종은 부화 후 2주째에 발생하였고(초회접종), 2차(추가접종)는 그 후 2주째에 발생하였다. 상기 추가접종후 2주째에, vvIBDV 균주(매우 독성인 89163/7.3)에 의한 바이러스 공격을 수행하였다. 감염 대조용으로서 제공되는 하나의 피실험체 그룹에게, 단지 PBS 또는 항원보강제만이 투여되는 모의 처리를 가하였다. 실험 1(A)에서, 야생형 효모(VAK367)를 또한 대조용으로서 투여하였다. 그룹당 적어도 7마리의 치킨이 바이러스

공격 없는 대조용으로서 제공되었으며, 실험 2(B)에서는 적어도 5마리가 제공되었다. 상기 1차 투여 직전, 상기 공격 전후, 및 달리 10-일 간격으로 혈청을 수득하였다. 혈전전환의 강도를 ELISA(ProFLOK IBD Plus, Synbiotics)에 의해 측정하였다. 키트 정보에 따른 전환된 역가를 도시한다. A: 실험 2를 실험 1(A)와 동일한 방식으로 수행하였다. 12마리 동물의 ELISA 역가의 평균 값을 표준 편차와 함께 나타낸다. 상기 두 실험은 모두 VAK1127-백신접종된 동물의 경우에 항-IBDV VP2 항체 역가의 강한 발달을 도시한다. 관련된 표는 vvIBDV에 의한 공격에 대해 백신접종된 동물의 보호 결과를 도시한다: 상기 두 백신접종 실험 모두에서, 상기 바이러스 감염에 대한 완전한 보호를 성취하는 것이 가능하였다.

도 10은 직렬 IBDV-VP2 효모 균주의 재조합 단백질 생산량 및 면역원성에 대한, 자가영양성의 회복을 위한 유전학적 변형 효과를 도시한다. 영양요구성 직렬 IBDV-VP2 효모 균주 VAK1127 및 이로부터 유래된 자가영양성 효모 균주 VAK1171을 재조합 단백질 생산 효율 및 면역원성에 관하여 비교하였다. A: 새로 수확된 효모 물질 중 IBDV-VP2 함량을 확인하기 위한 웨스턴 블롯팅 분석. 효모 균주를 YPD에서 예비 배양 후에 8h 동안 YPLac에서 배양하였다. 효모 균주당 40 μ g의 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE 상에 로딩하였다. 면역블롯팅을 항-IBDV 토끼 항혈청(1:10 000) 및 염소로부터의 HRP-접합된 항-토끼 항체(1:10 000)를 사용하여 수행하였다. 응집된(agg.) 및 단량체성(mon.) IBDV-VP2를 우측에 화살표로 나타내고, 비특이적인 밴드를 별표로 나타낸다. B: 나중에 BALB/c 마우스에서 면역화 연구(C)에 사용된 동결건조된, 열-불활성화된 효모 물질 중 IBDV-VP2 함량을 확인하기 위한 웨스턴 블롯팅 분석. 상기 효모 균주들을 YPD에서 예비 배양 후에 15h 동안 YPLac에서 배양하였다. 각각의 효모 균주에 대해서, 10 μ g의 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE 상에 로딩하였으며, 달리는 상기 (A)에서와 같이 면역블롯팅을 수행하였고, 밴드를 상응하게 나타낸다. C: BALB/c 마우스의 면역화 실험에서 2개의 효모 균주 VAK1127 및 VAK1171의 면역원성 시험. 각각 5마리의 마우스 그룹을 상기-분석된(B) 효모 물질 0.1 mg(건조 중량)을 사용하여 피하로 3회 백신접종하였다. 사용된 대조용은 항원이 없는 야생형 균주(VAK367)이었다. 1차 투여를 항원보강제로서 CFA(완전 프로인트 항원보강제)를 사용하여 수행하였으며, 추가로 2번의 투여를, 항원보강제로서 IFA(불완전 프로인트 항원보강제)를 사용하여 2-주 간격으로 수행하였다. 3차 투여 후 1주일째에, 마우스를 안락사시키고 채혈하였다. 혈청을 IBDV-VP2 ELISA(IDEXX)에 의해 분석하였다. 항-IBDV-VP2 항체 역가와 상관있는, 650 nm에서의 흡광도를 표준 오차와 함께 나타낸다. 단클론 항-IBDV-VP2 항체(pos. mab64)를 ELISA에 대한 양성 대조용으로서 사용하였으며, 샘플 완충제(neg. 1) 또는 비특이적인 항체(neg. 2)를 음성 대조용으로서 사용하였다. 입증된 것은 상기 두 균주가 모두 유사한 수준의 외부 단백질 발현을 나타내고 면역원성 잠재성을 나타낸다는 것이다.

도 11은 표 3과 함께, 유전학적으로 최적화된 IBDV-VP2 백신 효모의 단일의 피하 투여에 의한, vvIBDV에 대한 SPF 치킨의 보호 면역화를 도시한다. 적어도 18마리의 SPF 치킨 그룹을, 부화 후 2주째에 유전학적으로 최적화된 직렬 IBDV-VP2 케이. 락티스 효모 균주 VAK1171의 열-불활성화된 세포 10 mg으로 피하로 단독으로 백신접종하였다. 사용된 대조용은 PBS 또는 10 mg의 VAK367에 의해 백신접종된 동물이었다. 이들을 부화 후 2주 및 4주째에, 2회 백신접종하였다. 모든 동물을 부화 후 6주째에 vvIBDV로 공격하였다. 혈청을 상술한 바와 같이 ELISA(ProFLOK IBD Plus, Synbiotics)에 의해 분석하였다. 확인된 항체 역가를 도시한다. 개별적인 점은 그룹당 분석된 12마리 치킨의 개별적인 항체 역가를 나타내며, 막대는 표준 편차와 함께 평균값을 나타낸다. 대조용의 경우에, 상기 공격 후에 오직 살아있는 치킨의 항체 역가만이 확인되었다. 입증된 것은 효모 서브유닛 백신 VAK 1171에 의한 '원-샷' 백신접종만이 vvIBDV에의 후속 노출에 대해 완전한 보호를 성취한다는 것이다.

도 12는 균주 VAK952 및 VAK1283의 특성화를 도시한다. (A) 효모 균주 VAK952(1가 HA) 및 VAK1283(2가 HA, M1)을 진탕 플라스크 중에서 YPD에서 예비배양시키고 후속적으로 6h 동안 YPL에서 유도하였다. 600 nm에서 광학 밀도를 측정하고 배양물의 30 OD 단위를 수확하였으며, 펠릿을 유리 비드를 사용하여 붕괴시키고, 용해성 단백질 분획(LF) 및 불용성 단백질 분획(P, 펠릿)을 면역블렛에서 검사하였다. 사용된 1차 항체는 α -HA1 또는 α -M1이었고 사용된 2차 항체는 α -마우스-IR-Dye800CW이었다. 적외선 영상화 시스템(LI-COR Biosciences)을 통해 신호를 생성시켰다. (B,C) 효모 균주를 진탕 플라스크에서 YPD에서 예비배양시키고 후속적으로 24h의 기간에 걸쳐 YPL에서 유도하였다. 명시된 시점에서, 효모 배양물의 광학 밀도를 측정하고 30 OD 단위를 수확하였다. (B) VAK1283의 펠릿을 유리 비드를 사용하여 붕괴시키고 면역블렛에서 분석하였다. (C) VAK952 및 VAK1283의 광학 밀도에 대해 측정된 값들을 시간의 함수로서 증식 곡선으로서 조합하고 적어도 2회의 독립적인 실험으로부터 평균하였다. (D) 도트 시험을 위해서, 효모 균주를 30°C에서 48h 동안 YPD-함유 영양 아가 플레이트상에서 배양하였다. 1 OD 단위로 출발하여, 효모를 연속적으로 희석시키고 후속적으로 YPD-함유 또는 YPL-함유 영양 아가 플레이트상에 드립하였다. 상기 플레이트를 30°C에서 48h 동안 배양하고 후속적으로 사진촬영하였다. 폰트 S: 각 분획, 로딩 대조용의 전체 효모 단백질의 염색. 입증된 것은 VAK952(1가 HA) 및 VAK1283(2가 HA, M1)이 HA 단백질을 필적하는 양으로 발현시킨다는 것이다. 더욱 또한, 입증된 것은 VAK1283 및 VAK952가 필적할만한 증식

성질을 가지며, 이때 VAK1283이 약간 유리하다는 것이다.

도 13은 노출 감염 전후에 VAK952(1가 HA) 및 VAK1283(2가 HA, M1)에 의한 면역화 후 BALB/c 마우스의 혈청 중 항체 역가를 예시한다. 상기 두 효모 균주를 모두 YPD가 있는 진탕 플라스크에서 예비배양하고 후속적으로 YPL에서 12h(VAK952) 또는 6h(VAK1283) 동안 유도하였다. 그 후에, 배양물을 수확하고, 동결-건조시키고, 효모 물질을 90℃에서 2h 동안 불활성화시켰다. 면역화를 위해서, 9-주된, 암컷 BALB/c 마우스를 3주 간격으로, 2 mg의 효모(VAK952, VAK1283) 또는 1 mg의 VAK1283으로 2회(초회-추가) 또는 1회(원샷), 또는 PBS(항원보강제 없이)로 2회 피하 백신접종하였다. 사용된 항원보강제는 AddaVax이었다. 최종 투여후 3 또는 6주째에, 동물을 5x MLD₅₀의 인플루엔자 A/PR/8/34(H1N1) 바이러스로 비내 감염시켰다. 사용된 감염 대조용은 바이러스 없이 PBS만을 비내 투여한 모의-감염된 동물(Mock)이었다. 최종 투여후 3 또는 6주째 및 노출 감염 동안, 동물의 혈청을 수득하고 VNT 중 중화 항체(nAb)에 대해 시험하였다. nAb 역가₅₀: 무-바이러스 대조용에 비해 플라크의 수를 50%까지 감소시키는 혈청 희석. 상응하는 혈청 희석의 log₂를 명시한다. 로그 플롯으로 인해, 값: log₂(2) = 1은 검출가능한 항체가 없는 혈청 샘플로 할당되었다. mAb: 시험 시스템 대조용(α -H1(H37-66)). 입증된 것은 상기 두 면역화 설계가 모두 중화 Ab의 현저한 유도를 도출하였다는 것이다. 더욱 또한, 상기 초회-추가 백신접종 실험 및 원-샷 백신접종 실험의 경우에 획득된 중화 항-HA 항체 역가가 VAK952 및 VAK1283에 대해 그다지 상이하지 않음이 분명하다.

도 14는 VAK952(1가 HA) 및 VAK1283(2가 HA, M1)에 의한 면역화 후 인플루엔자 A/PR/8/34(H1N1)에 의한 노출 감염을 도시한다. 최종 투여후 3 또는 6주째에(면역화 설계에 대해 도 13 참조), BALB/c 마우스를 5x MLD₅₀의 인플루엔자 A/PR/8/34(H1N1) 바이러스로 비내 감염시켰다. 사용된 감염 대조용은 바이러스 없이 PBS만을 비내 투여한 모의-감염된 동물(Mock)이었다. 그 후에, 상기 동물의 생존(A), 중량(B) 및 임상 증상(C)을 14일의 기간에 걸쳐 매일 수회 검사하였다. 상기 임상 증상의 경우에, 0-4의 점수를 한정하였으며, 이를 각 그룹에 대해 평균하였다(0: 비정상 없음; 1: 약간 텁수룩한 털; 2: 텁수룩한 털, 감소된 활동; 3: 텁수룩한 털, 체중의 15% 감소; 4: 텁수룩한 털, 체중의 >20% 감소). 입증된 것은 VAK952에 의한 초회-추가 면역화 방법이 바이러스 노출에 대한 최적의 보호를 제공하지 못하는 반면, VAK1283의 경우에는 이를 제공한다는 것이다. 상기 두 백신 모두의 경우, 원-샷 설계는 2 mg의 백신 투여로 최적의 보호를 생성시킨다. 1 mg 투여시, 상기 초회-추가접종 방법에서 2 mg의 VAK952의 경우와 유사한 보호율이 VAK1283에 의해 성취된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

예시적인 실시태양

실시예 1: 분리된 유전자좌에 안정하게 통합된 2개의 *KIGAL4* 유전자 카피를 갖는 숙주 균주의 생성

선택 마커가 없는 두 번째 *KIGAL4* 유전자 카피를 상이한 유전자좌에(이소성으로) 삽입하였다. 서열분석(*Klavl3::KIGAL4-1*, 서열번호 1)에 의해 *KIAVT3* 유전자(*KLLAOE13795g*) 중의 상기 삽입의 위치를 측정할 수 있었다(도 1). 생성된 균주를 VAK1111이라 칭한다. 2개의 *KIGAL4* 카피(염색체 E(이소성 카피) 및 D(게놈 카피)상에 있다)의 독립적인 감수분열 분리가 교차 실험에 의해 확인되었다. 더욱이, 같은 실험에서, 게놈 중 정확하게 2개의 *KIGAL4* 유전자 카피의 수가 확립되었다. VAK367-D4와 유사하게 *LAC4* 유전자좌에의 발현 카세트의 표적화된 통합에 VAK1111을 사용하기 위해, *lac4::ScURA3* 붕괴를 락토스 증식에 대한 선택하에 도입시켜(이는 상기 붕괴를 1 단계로 가능하게 한다), 마커 없이 Kl_p 벡터 기술에 의해 *LAC4* 프로모터와 *LAC4* 관독 프레임 사이에 목적하는 외부 유전자를 통합시켰다(Krijger et al.(2012)). 생성된 균주 VAK1123은 VAK367-D4와 단지 두 번째의 이소성 *KIGAL4* 유전자 카피만이 상이하다.

실시예 1.1: 추가로 통합된 *KIGAL4* 유전자를 갖는 효모 백신 균주의 개선된 생산성

하나의 예시적인 실시태양에서, IB_{BDV}-oVP2_{T25}(Arnold et al. (2012)) 유전자를 균주 VAK1123(생산된 균주 VAK1130)의 *LAC4* 유전자좌내에 삽입하였다. 단지 하나의 *KIGAL4* 카피만을 갖는 달리 동질의 균주에 비해 IB_{BDV}-VP2의 증가된 생성을 확립시킬 수 있었다. 비교로서, 단지 하나의 *KIGAL4* 카피만을 갖지만 2개의 *CDS VP2*_{IB_{BDV}} 카피(하기 참조)를 갖는 균주 VAK1118을 추가로 도시한다(도 2).

실시예 2: 세포병변 효과를 갖는 항원의 발현을 최적화하기 위해 감소된 기본 활성을 갖는 P_{LAC4-12LR2'} 프로모터

미생물에서 이중 단백질 생성은 세포병변 효과(CPE)를 도출하는 경우 문제가 된다. 따라서, 직면한 과제는 항원

생성 단계를 바이오매스 축적 단계와 분리시키는 방법을 찾는 것이다. 이는, 유도성 *LAC4* 프로모터로 인해, 유가 발효 공정에 의해 부분적으로 가능하지만, 프로모터 $P_{LAC4-12}$ 가 비유도 조건하에서 완전히 폐쇄되지 않기 때문에 방해가 된다. 매우 강한 CPE를 갖는 항원의 경우에, 발생하는 것은 증식물의 감소 및 세포 스트레스 반응의 유도이며, 이는 항원 생성에 불리한 영향을 미친다. 상기 문제는 *KIGAL4* 유전자 용량의 배가 및/또는 항원-암호화 서열 수의 증가(하기 참조)에 의해 악화된다. 해법은 -1065와 -1540 사이에서 프로모터 $P_{LAC4-12}$ 의 기본 조절 영역(BCR)을 결실시키는 것이었다(LR2 결실; $P_{LAC4-12-LR2}$; 서열번호 2). 상기 결실을 *lac4::ScURA3* 붕괴와 함께 계놈 *LAC4* 유전자좌에서 출발 균주 VAK367(하나의 *KIGAL4* 카피) 및 VAK1111(2개의 *KIGAL4* 카피)내에 도입시켰다. 상기 생성된 균주 VAK1109 및 VAK1124는 CPE를 갖는 항원의 발현에 적합하다. 프로모터 $P_{LAC4-12-LR2}$ 를 또한 통합 벡터 KlpURA3-ET 및 KlpMET5-ET(하기 참조)에 삽입하였다.

[0131] **실시예 2.1: 변형된 프로모터에 의한 항원의 기본(유도되지 않은) 발현의 억제**

[0132] 직렬 IBDV-VP2 발현 카세트를 VAK1124(생산된 효모 균주: VAK1131; '직렬 발현 카세트'란 용어의 설명에 대해서 하기 및 도 7을 참조하시오)내에 통합시킨 후에, *LAC4-12* 프로모터 중의 LR2 결실이 비유도 조건하에서 VP2 단백질 생산에 강한 감소를 도출함을 보일 수 있었다(도 3B). A형 인플루엔자 항원 헤마글루티닌을 발현하는 균주들(프로모터 중에 LR2 결실이 없는 VAK952, 프로모터 중에 LR2 결실이 있는 VAK1243)의 경우, 상기 LR2 결실의 결과로서 A형 인플루엔자 HA 항원의 세포병변 효과가 억제되고 비유도 조건하에서의 증식이 개선됨을 입증할 수 있었다(도 3C).

[0133] **실시예 3: 케이. 락티스 계놈내로의 다수의 발현 카세트의 표적화된 통합을 위한 다목적 벡터 시스템**

[0134] 앞서와 같이 VAK367-D4(Krijger *et al.* (2012), WO 20101054649)의 경우에, 효모 균주 VAK367은 본 명세서에 기재된 모든 케이. 락티스 균주의 유전학적 배경을 형성한다. 이러한 균주 배경은 2개의 유전자, *KIURA3(KLLA0E22771g)* 및 *KIMET5(KLLA0B03938g)*(이들은 대립유전자 *Klura3-20*(+345번 위치에 염기쌍이 없다) 및 *Klmet5-1*(G2555A; 및 A3682T)이라 지칭된다) 중의 돌연변이로 인해 우라실 및 메티오닌이 필요하며(우라실-및-메티오닌 영양요구성); 따라서 상기 대립유전자는 비기능성 유전자 변종이다.

[0135] 이들 돌연변이된 대립유전자는, Klp3/Klp3-MCS(Krijger *et al.* (2012))에 의해 이미 발생한 통합 부위 *LAC4* 외 표적화된 통합을 위한 추가의 유전자좌를 사용하고 이에 의해 다가 백신 균주를 생성시키기 위해 사용되었다(도 4A). 선택은 선택 마커의 추가적인 삽입 없이 상기 돌연변이된 유전자의 유전자 기능 회복에 의해 성취된다. 이를 위해서, 새로운 통합 벡터를 생성시켰다. 상기 벡터에서, 발현 카세트(각각의 경우에 *LAC4-12* 프로모터 또는 그의 변종의 조절하에)는 유전자 분절과 인접하고 있으며 이들은 상동성 재조합에 의해 *KIURA3* 유전자의 상류 통합 및 *KIMET5* 유전자의 하류 통합을 허용하고 동시에 이들 유전자의 야생형 서열을 회복시킨다.

[0136] 추가의 유전자좌를 돌연변이유발 및 대체 증식 물질에 대한 영양요구성에 대한 선택에 의해 통합 부위로서 유사하게 발생시킬 수 있다.

[0137] **실시예 3.1: *Klura3-20* 및/또는 *Klmet5-1* 대립유전자를 갖는 케이. 락티스 균주의 *KIURA3(KLLA0E22771g)* 및/또는 *KIMET5(KLLA0B03938g)* 유전자좌에 발현 카세트(유도성 *LAC4-12* 프로모터를 갖는다)의 표적화된 통합을 위한 벡터 KlpURA3 및 KlpMET5.**

[0138] 통합 발현 벡터 KlpURA3(서열번호 3) 및 KlpMET5(서열번호 4)를, 각각 *Klura3-20* 및 *Klmet5-1* 대립유전자의 기능성의 표적화된 회복을 허용하는 적합한 유전자 단편(*KIMET5/KIURA3* 표적화 서열)에 의해 구성하였다.

[0139] 상기 KlpMET5 발현 벡터는 *LAC4-12* 프로모터($P_{LAC4-12}$ 또는 그의 변종), 발현시키고자 하는 항원의 암호화 핵산 서열 및 *AgTEF1* 종결자로 이루어지는 발현 카세트를 함유하며; 상류에, 도입된 *ScCYC1* 종결자를 갖는 계놈 *KIMET5* 단편 및 하류에, 하류 *KIAIM18* 유전자를 갖는 *KIAIM18* 프로모터가 인접해 있다.

[0140] 상기 KlpURA3 발현 벡터는 *LAC4-12* 프로모터($P_{LAC4-12}$ 또는 그의 변종), 발현시키고자 하는 항원의 암호화 핵산 서열 및 *AgTEF1* 종결자로 이루어지는 발현 카세트를 함유하며; 상류에, 관련된 프로모터를 갖는 *KLLA0E22749g* 및 하류에, 하류 *KIURA3* 단편을 갖는 *KIURA3* 프로모터가 인접해 있다(도 4B, C).

[0141] 각각의 경우에, 항원-암호화 서열을 *AscI* 및 *NotI* 제한 부위를 통해 프로모터와 종결자 사이에 클로닝한다. 상기 생성된 플라스미드의 *Eco91I* 또는 *KpnI* 제한에 의해, 전체 발현 카세트를 KlpURA3 벡터 주체로부터 분리시키고, 생성된 플라스미드의 *HindIII* 또는 *BoxI* 제한에 의해 전체 발현 카세트를 KlpMET5 벡터 주체로부터 분리시

키며, 제한 물질을 *Klura3-30* 및/또는 *Klmet5-1* 대립유전자를 갖는 케이. 락티스 숙주 균주내로 형질전환시킨다. 이렇게 하여 *KIURA3-20* 또는 *KIMET5-1* 내에 통합된 외부 유전자-함유 발현 카세트는 K1p3-MCS 벡터(WO 20101054649)와 함께 VAK367-D4 중의 *LAC4*내에 또한 통합가능한 것에 상응한다. 우라실-자가영양성 및/또는 메티오닌-자가영양성 형질전환체에 대한 검사를 K1pMET5 형질전환체의 경우 프라이머 MAB6 및 VK211을 사용하여, 및 K1pURA3 형질전환체의 경우 프라이머 MAB6 및 VK71을 사용하여 콜로니 PCR을 통해 표준 방식으로 수행한다. *KIURA3* 또는 *KIMET5* 및 각각의 인접한 유전자 사이의 정확한 표적 부위에의 발현 카세트의 통합은 K1pMET5 형질전환체의 경우 1652 bp 크기 및 K1pURA3 형질전환체의 경우 1307 bp 크기의 산물을 생성시킨다. 이 옯하는 유전자들의 기능성이 상기 삽입에 의해 손상된다는 표시는 없었다.

[0142] 프라이머:

[0143] MAB6: 5'-CCCAGATGCGAAGTTAAGTG-3'(서열번호 11)

[0144] VK71: 5'-TACAACAGATCACGTGATCTTTTGTAAAG-3'(서열번호 12)

[0145] VK211: 5'-GATTTCGTAACCTATTGTTTCATGAATG-3'(서열번호 13)

[0146] 실시예 3.2: *KIURA3* 또는 *KIMET5* 유전자좌에서 암호화 유전자 카세트의 통합후 외부 항원의 발현

[0147] $P_{LAC4-12}$ 프로모터의 조절하에서 외부 유전자를, *LAC4*, *KIURA3* 및 *KIMET5* 유전자좌에 통합 후에 락토스에 의해 대략적으로 균등하게 강하게 유도한다. 이 콜라이로부터의 열-불안정성, 무독성 장독소 서브유닛 B(Etx.B) 및 C-말단의 (HA)₃ 에피토프(Etx.B-HA)를 벡터 시스템의 평가를 위한 시험 단백질로서 사용하였다. 암호화 서열을 벡터 K1pMET5, K1pURA3 및 K1p3-MCS내에 클로닝하고 게놈 유전자좌 *KIMET5*(VAK1251), *KIURA3*(VAK1235) 및 *LAC4*(VAK899)에 통합시켰다(도 4D). 웨스턴 블롯팅에 의해 나타난 바와 같이, 3개의 모든 균주 중의 Etx.B-HA 단백질의 농도는 매우 유사하다(도 4D). 따라서, 게놈내 발현 카세트의 통합 부위, 재조합 단백질 생산량에 따른 임의의 위치 영향을 확립시킬 수 없었다.

[0148] 실시예 3.3: 동일한 효모 세포에서 2개의 외부 항원의 동시발현

[0149] 동일한 효모 균주에서 $P_{LAC4-12}$ 프로모터의 조절하에 새로운 벡터 시스템을 통한 상이한 이중 단백질의 생성 가능성을, *KIURA3* 유전자좌에 Etx.B-HA 발현 카세트, 및 *LAC4* 유전자좌에 직렬로서 존재하는 2개의 VP2_{IDV} 카피를 갖는 발현 카세트를 갖는 효모 균주의 구성에 의해 입증할 수 있었다(VAK1234; 도 5; 상기 직렬 카세트의 설명에 대해서 하기 및 도 7을 참조하시오). 각각의 경우에 단지 하나의 발현 카세트만이 존재하는 효모 균주(VAK1235 또는 VAK1171)에 비해, VAK1234의 경우 Etx.B-HA 또는 VP2_{IDV}의 단백질 농도의 임의의 감소를 확립시킬 수 없었다.

[0150] 실시예 4: 유사한 유도 조건하에서 재조합 단백질 합성의 조절을 위한 *LAC4* 프로모터 변종

[0151] 항원의 면역원성 효과는 종종 비화확량론적 비의 다수 단백질의 조립에 기반한다. 효모-기반 백신에서 이를 가능하게 하기 위해서, 락토스 또는 갈락토스에 의해 상이하게 유도될 수 있는 $P_{LAC4-12LR2}$ 프로모터의 변종을 생성시켰다(도 6A). 이들은 활성제 K1Ga14에 대한 결합 부위(U1, U2, U4, U5; G_Ödecke et al. (1991))의 수 및 기본 조절 영역 BCR의 존재/부재에 의해 특성화된다. K1pURA3 벡터내에 삽입된, 도 3A에 도시된 구조물 외에, 추가의 결합 부위의 삽입에 의해 증가된 프로모터 강도를 갖는 프로모터 변종을 생성시킬 수 있었다. 상기의 결과는 벡터 시스템의 확대를 위한 합성적 락토스-유도성 프로모터이며, 동일한 유도 조건하에서 상이한 단백질 생산 또는 유전자 발현율을 실현시킬 수 있다.

[0152] 실시예 4.1: 다양한 *LAC4* 프로모터 변종의 조절하에서 외부 항원의 발현

[0153] 4개의 *LAC4-12* 프로모터 변종 조절하의 Etx.B-HA의 발현. 시험된 것은 전사 활성제 K1Ga14에 대한 결합 부위의 수 및 비유도 조건하에서 기본 발현을 위한 조절 영역(basal control region, BCR; 도 6A; 서열번호 14)의 존재/부재가 상이한 4개의 *LAC4* 프로모터 변종이었다. 상기 프로모터 변종을 사용하여, K1pURA3-Et 벡터 변종 K1pURA3-PL412-Et, K1pURA3-PL412LR2-Et, K1pURA3-PL4-Et 및 K1pURA3-PL4LR2를 생성시켰으며, Etx.B-HA 단백질을 각각의 경우에 시험 GOI로서 삽입하였다. 상술한 바와 같이, 대체 GOI의 삽입은 제한 부위 *AscI* 및 *NotI*를 통해 가능하다. 발현 카세트를 *KIURA3* 유전자좌내에 통합시키고 Etx.B-HA의 단백질 농도를 웨스턴 블롯팅을 통해 정량분석하였다(도 6B). 입증된 것은 동일한 유도 조건(락토스를 함유하는 완전 배지에서 4h)하에서, *LAC4* 및 *LAC12* 유전자 사이의 전체 유전자간 영역(intergenic region)을 포함하고 4개의 K1Ga14-결합 부위(U1, U2,

U4, U5)(Gödecke et al. (1991))를 함유하는 가장 긴 프로모터 변종 $P_{LAC4-12}$ 가 최고의 단백질 농도를 도출한다는 것이다. $LAC4$ 에 근접한 단지 2개의 U1 및 U2 결합 부위만이 존재하는 경우(-1064 내지 -10), BCR의 추가적인 결실(-1540 내지 -1065)은 또한 유도 조건하에서 단백질-감소 효과를 갖는다.

[0154] **실시예 5: 항원-암호화 유전자의 카피 수 증가에 의한 항원 생산의 상승**

[0155] 따라서 상술한 벡터 시스템을 다수의 유전자 카피를 연속해서 신속하고 효율적으로 연결시키고 상기 발현 카세트 3개의 유전자좌 중 하나에서 1 단계로 도입시키기 위해 변형시켰다(도 7A).

[0156] $LAC4$ 유전자좌에 통합 가능한 직렬 발현 카세트를 생산하기 위해서, 3개의 PCR-증폭된 단편을 1 단계(인-퓨전(in-fusion) 클로닝)로 임의의 목적하는 $Klp3$ (-MCS)-GOI 주형에 의해 융합시킨다: (1 및 2) $P_{LAC4-LR2}$ 및 T_{TEF} (프라이머: VK30 & VK31, 및 VK32 & VK33)를 함유하는 발현 카세트 및 (3) $LAC4$ 표적화 서열(VK34 & VK35). 예를 들어 $HpaI$ 를 사용하는 제한 후에, 직렬 발현 카세트를 기재된 바와 같이 $lac4::UR43$ 유전자좌에 통합시킬 수 있다(도 7). 상기 발현 카세트의 성공적인 통합 후에, 첫 번째 외부 유전자 카피를 출발 균주에 따라 $P_{LAC4-12}$ 또는 $P_{LAC4-12-LR2}$ 에 의해 조절하고 두 번째는 $P_{LAC4-LR2}$ 에 의해 조절한다. 한편으로, 상기 두 발현 카세트 사이의 선택 마커의 제한 부위 $SmiI$, $MluI$ 또는 $PmeI$ 내로의 삽입 및 $KpnI$ 를 통한 $LAC4$ 표적화 서열의 제거는 직렬 카세트를 생성시키며, 이를 NHEJ를 통해 방향이 없는 방식으로 게놈내에 통합시킬 수 있다. 상기 발현 카세트를 $MreI$ 및 $AvaI$ 를 사용하여 컷아웃하는 경우, 양립성 단부를 결합시킬 수 있으며 이에 의해 긴 다중 발현 카세트가 생성될 수 있다. $MreI$ 및 $AvaI$ 를 사용하는 반복된 제한에 의해, 상기 발현 카세트가 직렬로 배열된(머리에서 꼬리로) 단편이 결합 믹스 중에 농축된다. 이들을 형질전환시키고 마커에 대한 선택하에서 방향이 없는 방식으로 통합시킨다.

[0157] 프라이머:

[0158] VK30: 5'-TATAGGGCGAATTGGAGCTCCGCCGGCGGAAGAGGTAACGCCCTTTTGTTAAC-3'(서열번호 15)

[0159] VK31: 5'-CTAAACGGAAGCTCGCATTTAAATCTCGTTTTCGACACTGGATGG-3'(서열번호 16)

[0160] VK32: 5'-GCGAGTTCGGTTTAGACGCGTTAAACTTGTTTAATTATTATGGGGCAGGCGAGA-3'(서열번호 17)

[0161] VK33: 5'-CGGGGAATGCGCTGCTTTTCGACACTGGATGGCGCGTTA-3'(서열번호 18)

[0162] VK34: 5'-GCAGCGCATTCGCCGGGTACCGCTCTCGACTAGGTGATTAGCG-3'(서열번호 19)

[0163] VK35: 5'-AAAAGCTGGGTACCGGGCCCTAGTCGAGAGTTAACCGTGACTACAGCTA-3'(서열번호 20)

[0164] **실시예 5.1: 복수 카피 전략의 성공적인 사용.**

[0165] 상기 전략을 항원으로서 IBDV-VP2 및 직렬로 2개의 IBDV-VP2-암호화 서열($CDS-VP2_{IBDV}$)을 함유하는 $Klp3$ -유래된 발현 카세트를 사용하여 확인하였다. 상기 $Klp3$ 벡터 중의 직렬 IBDV-VP2 발현 카세트(도 7A)(플라스미드 $Klp3$ -직렬-oVP2_{T2S}, 서열번호 21)는 $Klp3$ -MCS-oVP2_{T2S}(Arnold et al., (2012))로부터의 $VP2_{IBDV}$ ($CDS-VP2_{IBDV}$)에 대한 2개의 $LAC4$ 프로모터-조절된 암호화 서열로 이루어진다. 상기 프로모터 서열은 첫 번째 카피에 대한 $LAC4$ 프로모터의 -1123 내지 -10 영역, 및 두 번째 카피에 대한 -1099 내지 -10으로 이루어진다. $CDS-VP2_{IBDV}$ 는 모두 3' 단부에서 $AgTEF1$ 종결자에 인접된다. 플라스미드 $Klp3$ -직렬-oVP2_{T2S}를 $HpaI$ 를 사용하여 절단하고 제한 물질을 균주 VAK367-D4내로 형질전환시켰다. 이렇게 하여 생성된 효모 균주 VAK1118은 $LAC4$ 유전자좌에 통합된 직렬 발현 카세트를 함유한다. 웨스턴 블롯팅에 의해 도시된 바와 같이, 단지 하나의 카피만을 갖는 동질 균주에 비해 상기 균주 중에 보다 높은 IBDV-VP2 단백질 농도가 존재한다(도 7B). 직렬 발현 카세트는 유전학적으로 매우 안정적이다: 유도 배지(YNB + 락토스) 중에서 78 세대에 걸쳐 증식 후에, PCR에 의해 시험된 100개의 콜로니 중 어느 것도 상기 발현 카세트에 대한 유전학적 변화를 나타내지 않았다(데이터 도시 안 됨).

[0166] **실시예 6: 합성 배지 및 완전 배지에서의 단순화된 발효를 위해 케이. 락티스 균주에서 자가영양성을 생성시키기 위한 도구**

[0167] 수행된 연구에서, 우라실-영양요구성 효모 균주는 우라실-자가영양성 균주보다 완전 배지에서 더 불량하게 성장함이 자명해졌으며, 상기 효과는 우라실의 첨가에 의해 단지 부분적으로 중화될 수 있었다. 상기 백신 균주의 발효를 단순화하고, 생산 공정의 설정을 용이하게 하고, 이들을 보다 비용-효율적으로 만들고, 메티오닌 및/또

는 우라실의 불충분한 흡수로 인한 증식 효과를 피하기 위해서, 발견해야 하는 것은 균주 구성에 요구되는 이들 영양요구성의 중화를 신속하고 재현가능하게 성취하는 방법이다. *Klura3-20*로부터 *KIURA3*의 재구성을 위해서, DNA 단편을 프라이머 VK67 및 VK69 및 주형으로서 야생형 *KIURA3* 유전자의 도움으로 PCR을 통해 생성시킨다(도 8A). *Klmet5-1* 대립유전자를 수복하기 위해서, PCR 단편을 프라이머 VK74 및 VK75 및 주형으로서 야생형 대립유전자 *KIMET5*의 도움으로 유사하게 생성시킨다(도 8B). 상기 PCR 단편의 상응하는 돌연변이된 균주내로의 형질전환(개별적으로 또는 함께) 및 메티오닌 부재 및/또는 우라실 부재 배지상에서의 선택은 상기 야생형 대립유전자의 재편성을 높은 효율로 도출하였다. 이러한 과정은 특히, 균주 VAK1171 및 VAK1400(상기 참조)의 생성을 위해 수행되었다.

[0168] 프라이머

[0169] VK67: 5'-GACATCACTGTCTCTTCCCTTAATGATC-3'(서열번호 22)

[0170] VK69: 5'-TCAGCAAGCATCAATAATCCCTTGGTTC-3'(서열번호 23)

[0171] VK74: 5'-GAAAGAAAGACGTTGGTCTCTACGCTTG-3'(서열번호 24)

[0172] VK75: 5'-AGATTATAAGTTCTGGGGCTTTACCCAC-3'(서열번호 25)

[0173] **실시예 7: 최적화된, 불활성화된 백신 효모에 의한 보호 면역화**

[0174] 실시예 1 내지 5에 따라 수행된 케이. 락티스 백신 플랫폼의 변형 및 최적화를 다양한 백신접종 연구에서 입증하였다.

[0175] **실시예 7.1: IBDV-VP2 효모 균주(VAK1127)의 예를 사용하는, 최적화된 케이. 락티스 플랫폼의 면역원성**

[0176] VAK1127 균주는 직렬의 IBDV-VP2 발현 카세트(서열번호 21), 2개의 *KIGAL4* 카피 및 *LAC4* 프로모터 중의 LR2 결실을 함유한다. 상기 효모 균주의 면역원성을 특성화하기 위해서, 면역화 실험을 표적 유기체 치킨에서 수행하였다. 공격 실험에서, 에테라도씨와 그의 동료(Eterradossi and colleagues (1997))에 의해 충분히 특성화된 매우 독성인(vv) IBDV 균주 89163/7.3(AFSSA, Ploufragan, France)에 대한 SPF 치킨의 완전한 보호를 성취하였다(표 1 및 2). 이를 위해서, 독립적으로 수행된 2개의 실험에서, 1 mg의 동결건조된, 열-불활성화된(2h, 90°C) 효모(VAK1127)를 불완전 프로인트 항원보강제(IFA)와 함께 피하로 2회 투여하였다(도 9A 및 B)(초회-추가접종). 상기 투여를 부화 후 2주 및 4주째에 수행하였으며, 바이러스 노출(공격)을 부화 후 6주 째에 수행하였다. 19일 후에, 항-IBDV-VP2 항체의 높은 역가를 상기 VAK1127-백신접종된 동물의 경우에 이미 측정할 수 있다. 대조용에서, 항-IBDV-VP2 항체의 역가는 오직 vvIBDV에 의한 공격 후에만 발생한다(도 9). 상기 두 실험 모두에서, 상기 vvIBDV에 의한 공격에 대한 상기 VAK1127-백신접종된 동물의 완전한 보호(0% 이환율, 0% 치사율)가 관찰되었다(표 1 및 2). 이들 실험에 의해서, 고전적인 초회-추가 백신접종 방법에서 서브유닛 백신을 사용하는 vvIBDV에 대한 보호를 관찰할 수 있었다.

[0177] 상기 백신 효모의 면역원성은 항원-함유 자가영양성 효모 균주에 대한 유전학적 역돌연변이에 의해 영향을 받지 않는다. 이를 영양요구성 형태 또는 자가영양성 형태의 IBDV-VP2 효모 균주의 도움으로 마우스에서 백신접종 실험에서 입증할 수 있었다(도 10C). 효모 균주 VAK1127(영양요구성)을 상술한 바와 같이(실시예 6; 도 8), VAK1171의 생성을 위한 PCR 단편을 사용하여 2 단계로 자가영양성으로 만들었다. 상기 두 균주 형태는 모두 재조합 단백질의 발현 수준의 현저한 차이를 나타내지 않는다(도 10A 및 B). 상기 마우스에게 2-주 간격으로 피하로 IFA와 함께 0.1 mg의 열-불활성화된 효모를 피하로 3회 백신접종하였다. 영양요구성 IBDV-VP2 균주(VAK1127)와 자가영양성 자손(VAK1171)간의 혈청전환 강도의 어떠한 차이도 확립시킬 수 없었다(도 10C).

[0178] **실시예 7.2: '원-샷' 설계에서 백신접종에 의한 완전한 보호**

[0179] '원-샷' 백신접종, 즉 백신의 단일 투여에 의한 백신접종은 면역원성의 부족으로 인해 통상적으로 서브유닛 백신으로 유효하지 않다. 그러나, 초회/추가접종 방법에서 최적화된 균주 VAK1127을 사용하여 획득된 항체 역가-발생 데이터(도 9)는 원-샷 접근법에서조차 보호가 획득될 가능성을 가리킨다. 이를 자가영양성 효모 균주 VAK1171에 의한 원-샷 백신접종을 수행함으로써 검사하였다(도 11; 표 3). 이를 위해서, 상기 효모를 상기 목적을 위해 상승된 용량(10 mg)으로 오직 단독으로 투여하였으며, 이어서 4주 간격으로 공격을 수행하였다. VAK1171에 의해, vvIBDV에 대한 완전한 보호(0% 이환율, 0% 치사율)가 '원 샷'을 사용하여 실제로 성취될 수 있음이 자명해졌다(표 3). 이 결과는 백신접종 후 대략 20일째에 높은 보호 항체 역가의 발생에 기여할 수 있었다(도 11). 원-샷 백신접종 설계가 고도의 보호로 vvIBDV를 보호한다는 사실은 사용된 백신의 강한 면역원성 가능

성을 나타내며 최적화된 백신 플랫폼의 인상적인 확인을 제공한다.

[0180] **실시예 7.3: A형 인플루엔자 바이러스 감염에 대해 사용시 1가 효모 백신과 비교하여 2가 효모 백신의 개선된 보호**

[0181] A형 인플루엔자 바이러스에 대한 백신접종을 위해서, 3개의 상이한 백신 균주를 생성시켰다. 첫 번째로, A형 인플루엔자 균주(푸에르토리코/8/1934; PR8/34)의 주요 항원, HA(헤마글루티닌) 유전자를 발현하는 VAK952(DSM 32705)를 생성시켰다. VAK952에서, 유전자를 문헌[Krijger *et al.* (2012)] 및 문헌[Arnold *et al.* (2012)]에 기재된 바와 같이 LAC4 유전자좌내로 게놈내에 통합시킨다. 두 번째로, VAK1283(DSM 32697)을 생성시켰다. 여기에서, LAC4 유전자좌 중의 PR8/34로부터의 HA 유전자 외에, M1 유전자를 URA3 유전자좌내로 추가로 통합시킨다. 상기 M1 유전자는 HA보다 명백하게 더 보존된 추가의 중요한 A형 인플루엔자 항원을 암호화한다. 이미 발행된 보고서들은 상기 두 항원의 병용이 A형 인플루엔자에 대한 백신의 면역원성을 상승시킬 수 있고 상이한 인플루엔자 바이러스에 대한 교차-보호성을 또한 성취할 수 있음을 입증할 수 있었다. 상기 태양을 2가 효모 백신으로 또한 확인하기 위해서, 추가의 균주(VAK1395; DSM 32706)를 생성시켰으며, 이는 마찬가지로 URA3 유전자좌 중에 M1 유전자를 함유하고 여기에서 PR8/34로부터의 HA 유전자가 인플루엔자 바이러스 캘리포니아/4/2009의 HA 유전자로 교체된다. HA의 필적하는 발현 및 각 균주의 M1의 추가적인 발현을 검사하였으며; 상기 균주들이 필적하는 증식을 나타내고, 이때 VAK1283이 VAK952보다 약간 유리함이 또한 입증되었다(도 12). 마우스 모델에서 상이한 효모 농도를 갖는 초회-추가접종 설계 및 원-샷 설계가 각각의 경우에 사용된 백신접종 연구들에서, VAK952 및 VAK1283은 각각 바이러스-중화 항체의 필적하는 역가를 유도하는 것으로 나타났다(도 13). 그러나, 공격 실험에서, 2가 VAK1283 백신은 초회-추가접종 설계 및 원-샷 설계 모두에서 최대의 보호를 허용하는 반면 1가 VAK952 백신에서는 그렇지 않음이 분명해졌다. 더욱이, 사용된 효모 물질의 절반에서 백신 VAK1283은 원-샷 실험에서, 초회-추가접종 접근법에서의 VAK952와 유사한 보호 효과가 성취되었다(도 14 및 표 3). VAK1395가 백신으로서 사용된 실험에서, 인플루엔자 PR8/34에 대한 보호를 또한 확립시킬 수 있었다. 따라서 상이한 인플루엔자 변종들에 대한 교차-보호가 2가 효모 백신을 사용하여 성취되었다.

[표 1]

백신접종된 SPF 치킨에서 노출 방어에 대한 표시

백신접종 (a)		조직 병리학적 낭병변 평가					bu/bod 지수 (c)			
항원보강제	0	1	2	3	4	노출	비노출	이환율 (%) (d)	치사율 (%) (e)	
백신 용량당 VP2 양										
효모균주 (VAK)										
367	없음	IFA	-	-	1	7	2.80 ± 1.32	5.36 ± 0.65	6/10 (60)	4/10 (40)
1127	4.1 ± 0.25 µg	IFA	8	-	1	-	4.40 ± 0.76	4.89 ± 0.63	0/10 10/10	0/10
-	PBS	IFA	-	-	-	10	4.08 ± 1.91	4.92 ± 0.94	(100)	8/10 (80)

[표 2]

백신접종된 SPF 치킨에서 노출 방어에 대한 표시

백신접종 (a)		조직 병리학적 낭병변 평가				bu/bod 지수 (c)				
항원보강제	0	1	2	3	4	노출	비노출	이환율 (%) (d)	치사율 (%) (e)	
백신 용량당 VP2 양										
효모균주 (VAK)										
1127	4.1 ± 0.71 µg	IFA	6	-	-	-	5.10 ± 0.78	4.81 ± 1.20	0/9 (0)	0/9 (0)
-	PBS	IFA	-	-	-	8	4.09 ± 1.87	5.32 ± 0.85	9/9 (100)	7/9 (78)

[0182]

[표 3]

백신접종된 SPF 치킨에서 노출 방어에 대한 표시										
백신접종		조직 병리학적 상변변 평가				bu/bod 지수 (c)				
(a)		항원보강제								
호모 균주 (VAK)	백신 용량당 VP2 양	0	1	2	3	4	노출	비노출	이환율 (%) (d)	치사율 (%) (e)
PBS	없음	-	-	-	-	9	3.73 ± 1.92	4.77 ± 1.02	9/9 (100)	6/9 (66)
VAK367	없음	-	-	-	-	10	4.09 ± 1.58	3.60 ± 0.89	10/10 (100)	9/10 (90)
VAK1171	35 ± 4.2 µg	10	-	-	-	-	4.48 ± 0.37	3.96 ± 1.02	0/10 (0)	0/10 (0)

- [0183]
- [0184] 표 1에 대한 설명 주석
- [0185] (a) 치킨을 부화 후 2주째에 1 mg의 효모(또는 PBS) 및 항원보강제로서 IFA로 피하 백신접종하였다. 백신접종 후 2주째에, 동일한 방식으로 추가접종하였다. 추가로 2주 후에, 바이러스 노출 시험을 10^4 EID vvIBDV(매우 독성 89163/7.3)로 눈코 경로를 통해 수행하였다. 균주 VAK1127의 불활성화된 전체 효모를 백신 효모로서 사용하고, PBS 및 IFA만으로 백신접종한 그룹을 감염 대조용으로서 사용하였다. 항원 없는 야생형 효모(VAK367)를 투여한 그룹은 단독적인 효모 영향에 대한 대조용으로서 작용하였다.
- [0186] (b) 조직병리학적 상 변변 평가를 0-4의 등급을 사용하여 수행하였다: 0: 병변 없음; 1: 낭의 5-25%가 병들었음; 2: 낭의 26-50%가 병들었음; 3: 낭의 51-75%가 병들었음; 76-100% 낭 손상(구조 상실).
- [0187] (c) 낭 대 체중 지수(bu/bod)의 평균값을 식: (낭 중량/체중) * 1000을 사용하여 계산하였다. 노출되지 않은 대조군은 적어도 7마리의 치킨으로 이루어졌고, 노출된 그룹은 10마리로 이루어졌다. 표준 편차를 제공한다.
- [0188] (d) 이환율은 전체 그룹 중 치킨수 당 병든 치킨의 수로서 나타낸다. 병든 치킨의 백분율을 괄호안에 나타낸다.
- [0189] (e) 치사율은 전체 그룹 중 치킨수 당 죽은 치킨의 수로서 나타낸다. 죽은 치킨의 백분율을 괄호안에 나타낸다.
- [0190] 표 2에 대한 설명 주석
- [0191] (a) 치킨을 부화 후 2주째에 1 mg의 효모(또는 PBS) 및 항원보강제로서 IFA로 피하 백신접종하였다. 백신접종

후 2주째에, 동일한 방식으로 추가접종하였다. 추가로 2주 후에, 바이러스 노출 시험을 10^4 EID vvIBDV(매우 독성 89163/7.3)로 눈코 경로를 통해 수행하였다. 군주 VAK1127의 불활성화된 전체 효모를 백신 효모로서 사용하고, PBS 및 IFA만으로 백신접종한 그룹을 감염 대조용으로서 사용하였다.

[0192] (b) 조직병리학적 낭 병변 평가를 0-4의 등급을 사용하여 수행하였다: 0: 병변 없음; 1: 낭의 5-25%가 병들었음; 2: 낭의 26-50%가 병들었음; 3: 낭의 51-75%가 병들었음; 76-100% 낭 손상(구조 상실).

[0193] (c) 낭 대 체중 지수(bu/bod)의 평균값을 식: (낭 중량/체중) * 1000을 사용하여 계산하였다. 노출되지 않은 대조군은 적어도 5마리의 치킨으로 이루어졌고, 노출된 그룹은 9마리로 이루어졌다. 표준 편차를 제공한다.

[0194] (d) 이환율은 전체 그룹 중 치킨수 당 병든 치킨의 수로서 나타낸다. 병든 치킨의 백분율을 괄호안에 나타낸다.

[0195] (e) 치사율은 전체 그룹 중 치킨수 당 죽은 치킨의 수로서 나타낸다. 죽은 치킨의 백분율을 괄호안에 나타낸다.

[0196] **표 3에 대한 설명 주석**

[0197] (a) 치킨을 부화 후 2주째에 10 mg의 효모(또는 PBS) 및 항원보강제로서 IFA로 피하 백신접종하였다. 4주 후에, 바이러스 노출 시험을 10^4 EID vvIBDV(매우 독성 89163/7.3)로 눈코 경로를 통해 수행하였다. 군주 VAK1171의 불활성화된 전체 효모를 효모 백신으로 단독으로 사용하였다. 사용된 감염 대조용은 첫 번째로 PBS 및 MF59만으로 백신접종한 그룹, 두 번째로 야생형 효모 및 MF59로 백신접종한 그룹이었으며; 1차 백신접종 후 2주째에, 상기 둘을 모두 동일한 양의 효모 또는 PBS를 함유하는 추가접종으로 투여하였다.

[0198] (b) 조직병리학적 낭 병변 평가를 0-4의 등급을 사용하여 평가하였다: 0: 병변 없음; 1: 낭의 5-25%가 병들었음; 2: 낭의 26-50%가 병들었음; 3: 낭의 51-75%가 병들었음; 76-100% 낭 손상(구조 상실).

[0199] (c) 낭 대 체중 지수(bu/bod)의 평균값을 식: (낭 중량/체중) * 1000을 사용하여 계산하였다. 각 그룹은 적어도 9마리의 치킨으로 이루어졌다. 표준 편차를 제공한다.

[0200] (d) 이환율은 전체 그룹 중 치킨수 당 병든 치킨의 수로서 나타낸다. 병든 치킨의 백분율을 괄호안에 나타낸다.

[0201] (e) 치사율은 전체 그룹 중 치킨수 당 죽은 치킨의 수로서 나타낸다. 죽은 치킨의 백분율을 괄호안에 나타낸다.

[0202] **서열**

[0203] 특허 출원은 설명의 부분으로서 하기의 서열을 함유한다:

서열번호	명칭
1	케이, 락티스 <i>avr3::LAC9</i>
2	<i>PLAC4-12-LR2</i>
3	<i>K/pURA3</i> 벡터
4	<i>K/pMET5</i> 벡터
5	<i>LAC4-12</i> 프로모터 변종 <i>PLAC4-12</i>
6	<i>LAC4-12</i> 프로모터 변종 <i>PLAC4-12-LR2</i>
7	<i>LAC4-12</i> 프로모터 변종 <i>PLAC4</i>
8	<i>LAC4-12</i> 프로모터 변종 <i>PLAC4-LR2</i>
9	프라이머 서열 VK183
10	프라이머 서열 VK184
11	프라이머 서열 MAB6
12	프라이머 서열 VK71
13	프라이머 서열 VK211
14	<i>PLAC4-12</i> 로부터의 BCR
15	프라이머 서열 VK30
16	프라이머 서열 VK31
17	프라이머 서열 VK32
18	프라이머 서열 VK33
19	프라이머 서열 VK34
20	프라이머 서열 VK35
21	<i>K/p3-직렬-ovp2T2S</i>
22	프라이머 서열 VK67
23	프라이머 서열 VK69
24	프라이머 서열 VK74
25	프라이머 서열 VK75

[0204]

[0205]

참고문헌

- Arnold, M.; Durairaj, V.; Mundt, E.; Schulze, K.; Breunig, K. D. & Behrens, S.-E. Protective Vaccination against Infectious Bursal Disease Virus with Whole Recombinant *Kluyveromyces lactis* Yeast Expressing the Viral VP2 Subunit, *PLoS ONE, Public Library of Science*, **2012**, *7*, e42870.
- Berthoud, T. K.; Hamill, M.; Lillie, P. J.; Hwenda, L.; Collins, K. A.; Ewer, K. J.; Milicic, A.; Poyntz, H. C.; Lambe, T. & Fletcher, H. A. Potent CD8+ T-cell immunogenicity in humans of a novel heterosubtypic influenza A vaccine, MVA- NP+ M1, *Clinical infectious diseases, Oxford University Press*, **2011**, *52*, 1-7.
- Bathurst, I. C. Protein expression in yeast as an approach to production of recombinant malaria antigens, *The American journal of tropical medicine and hygiene, ASTMH*, **1994**, *50*, 20-26.
- Breunig, K. D. Multicopy plasmids containing the gene for the transcriptional activator LAC9 are not tolerated by *K. lactis* cells, *Current genetics, Springer*, **1989**, *15*, 143-148.
- de Silva; Chandimal, U.; Tanaka, H.; Nakamura, S.; Goto, N. & Yasunaga, T. A comprehensive analysis of reassortment in influenza A virus, *Biology open, The Company of Biologists Ltd*, **2012**, *1*, 385-390.
- Etteradossi, N.; Toquin, D.; Abbassi, H.; Rivallan, G.; Cotte, J. & Guittet, M. Passive Protection of Specific Pathogen Free Chicks Against Infectious Bursal Disease by In-Ovo Injection of Semi-Purified Egg-Yolk Antiviral Immunoglobulins, *Zoonoses and Public Health, Wiley Online Library*, **1997**, *44*, 371-383.
- Gellissen, G. & Hollenberg, C. P. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*-a review, *Gene, Elsevier*, **1997**, *190*, 87-97.
- Gödecke, A.; Zachariae, W.; Arvanitidis, A. & Breunig, K. D. Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β -galactoidase genes is achieved by interaction of multiple LAC9 binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter, *Nucleic acids research, Oxford University Press*, **1991**, *19*, 5351-5358.
- Granzow, H.; Birghan, C.; Mettenleiter, T. C.; Beyer, J.; Köllner, B. & Mundt, E. A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4, *Journal of virology, Am Soc Microbiol*, **1997**, *71*, 8879-8885.

[0206]

Kasanga, C. J.; Yamaguchi, T.; Wambura, P. N.; Maeda-Machang'u, A. D.; Ohya, K. & Fukushi, H. ¹

Molecular characterization of infectious bursal disease virus (IBDV): diversity of very virulent IBDV in Tanzania, *Archives of virology, Springer*, **2007**, 152, 783-790 ²

Kirchenbaum, G. A. & Ross, T. M. ¹

Eliciting broadly protective antibody responses against influenza, *Current opinion in immunology, Elsevier*, **2014**, 28, 71-76 ²

Kirunda, H.; Erima, B.; Tumushabe, A.; Kiconco, J.; Tugume, T.; Mulei, S.; Mimbe, D.; Mworoti, E.; Bwogi, J. & Luswa, L. ¹

Prevalence of influenza A viruses in livestock and free-living waterfowl in Uganda, *BMC veterinary research, BioMed Central*, **2014**, 10, 50 ²

Krammer, F. & Palese, P. ¹

Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines, *Current opinion in virology, Elsevier*, **2013**, 3, 521-530 ²

Krijger, J.-J.; Baumann, J.; Wagner, M.; Schulze, K.; Reinsch, C.; Klose, T.; Onuma, O. F.; Simon, C.; Behrens, S.-E. & Breunig, K. D. ¹

A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in *Kluyveromyces lactis*, *Microbial Cell Factories*, **2012**, 11, 112 ²

Kumar, K.; Singh, K. C. P. & Prasad, C. B. ¹

Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens, *Tropical animal health and production, Springer*, **2000**, 32, 357-360 ²

Negash, T.; Gelaye, E.; Petersen, H.; Grummer, B. & Rautenschlein, S. ¹

Molecular evidence of very virulent infectious bursal disease viruses in chickens in Ethiopia, *Avian diseases, BioOne*, **2012**, 56, 605-610 ²

Rautenschlein, S.; Kraemer, C. H.; Vanmarcke, J. & Montiel, E. ¹

Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers, *Avian diseases, BioOne*, **2005**, 49, 231-237 ²

Remington's Practice of Pharmacy, 13th edition and J. of Pharmaceutical Science & Technology, Vol. 52, No. 5, Sept-Oct, pages 238-311 ²

Ridpath, J. F. ¹

Emerging pestiviruses infecting domestic and wildlife hosts, *Animal Health Research Reviews, Cambridge University Press*, **2015**, 16, 55-59 ²

RKI, *Influenza (Teil 2): Erkrankungen durch zoonotische Influenzaviren* [Influenza (part 2): diseases due to zoonotic influenza viruses], **2016** ²

Schrauwen, E. J. A. & Fouchier, R. A. M. ¹

Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals, *Emerging microbes & infections, Nature Publishing Group*, **2014**, 3, e9 ²

Short, K. R.; Richard, M.; Verhagen, J. H.; van Riel, D.; Schrauwen, E. J. A.; van den Brand, J. M. A.; Mänz, B.; Bodewes, R. & Herfst, S. ¹

One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus, *One health, Elsevier*, **2015**, 1, 1-13 ²

Steel, J.; Lowen, A. C.; Wang, T. T.; Yondola, M.; Gao, Q.; Haye, K.; García-Sastre, A. & Palese, P. ¹

Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain, *MBio, Am Soc Microbiol*, **2010**, 1, e00018-10 ²

WHO, Influenza (Seasonal), **2016** ²

WHO, Biologicals, Influenza, **2017** ²

수탁번호

기탁기관명 : 독일생물자원센터 (DSMZ)

수탁번호 : DSM32696

수탁일자 : 20171124

기탁기관명 : 독일생물자원센터 (DSMZ)

수탁번호 : DSM32697

수탁일자 : 20171124

기탁기관명 : 독일생물자원센터 (DSMZ)

수탁번호 : DSM32698

수탁일자 : 20171124

기탁기관명 : 독일생물자원센터 (DSMZ)

수탁번호 : DSM32699

수탁일자 : 20171124

기탁기관명 : 독일생물자원센터 (DSMZ)

수탁번호 : DSM32700

수탁일자 : 20171124

기탁기관명 : 독일생물자원센터 (DSMZ)

수탁번호 : DSM32701

수탁일자 : 20171124

기탁기관명 : 독일생물자원센터 (DSMZ)

수탁번호 : DSM32702

수탁일자 : 20171124

기탁기관명 : 독일생물자원센터 (DSMZ)

수탁번호 : DSM32705

수탁일자 : 20171201

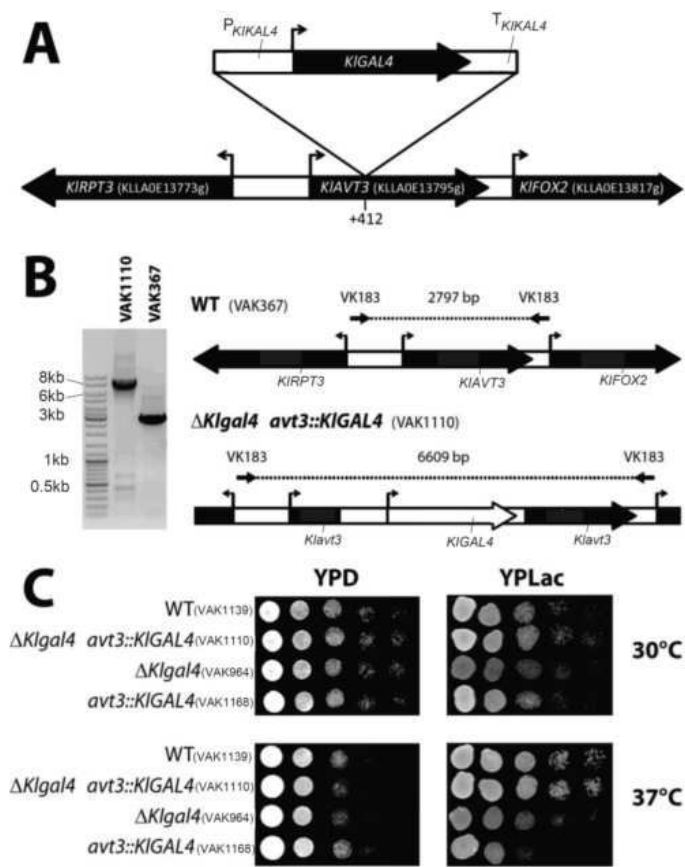
기탁기관명 : 독일생물자원센터 (DSMZ)

수탁번호 : DSM32706

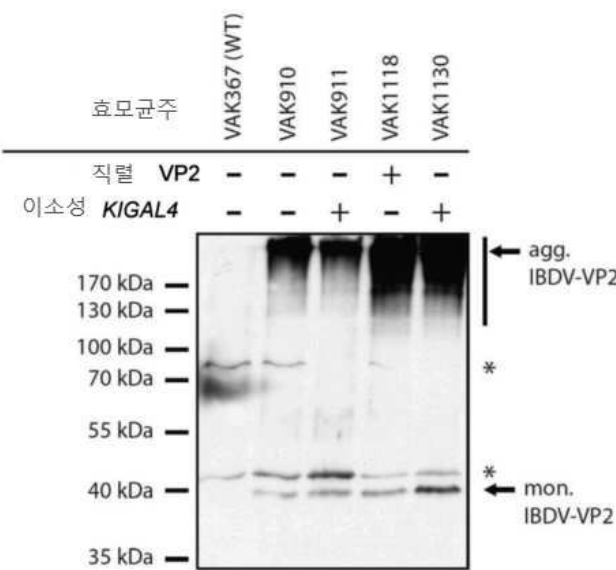
수탁일자 : 20171201

도면

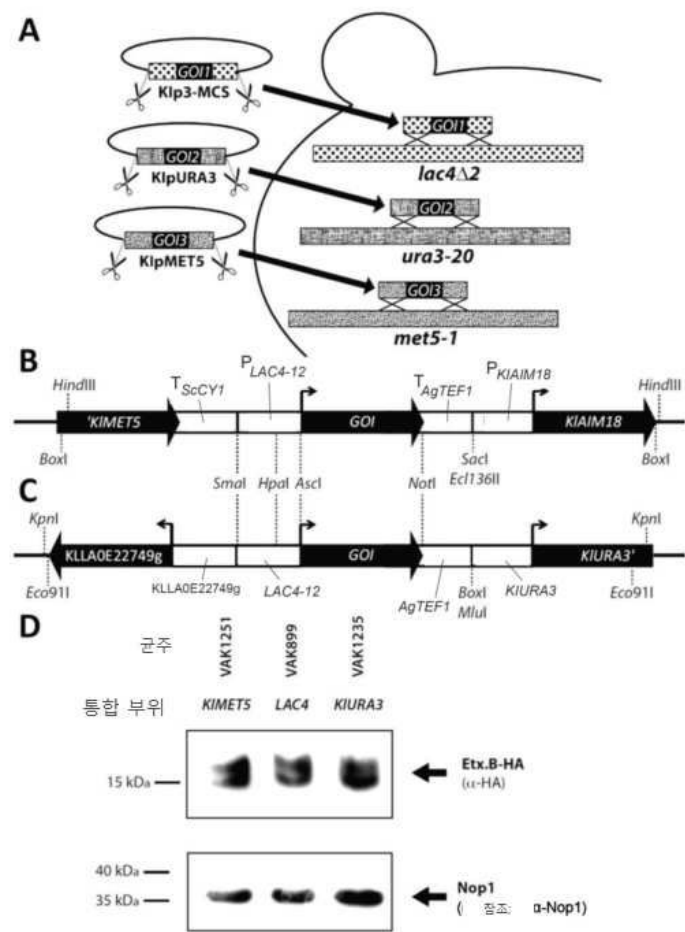
도면1



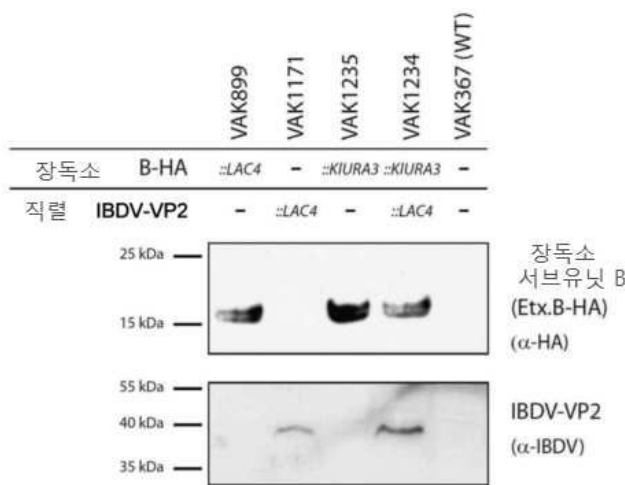
도면2



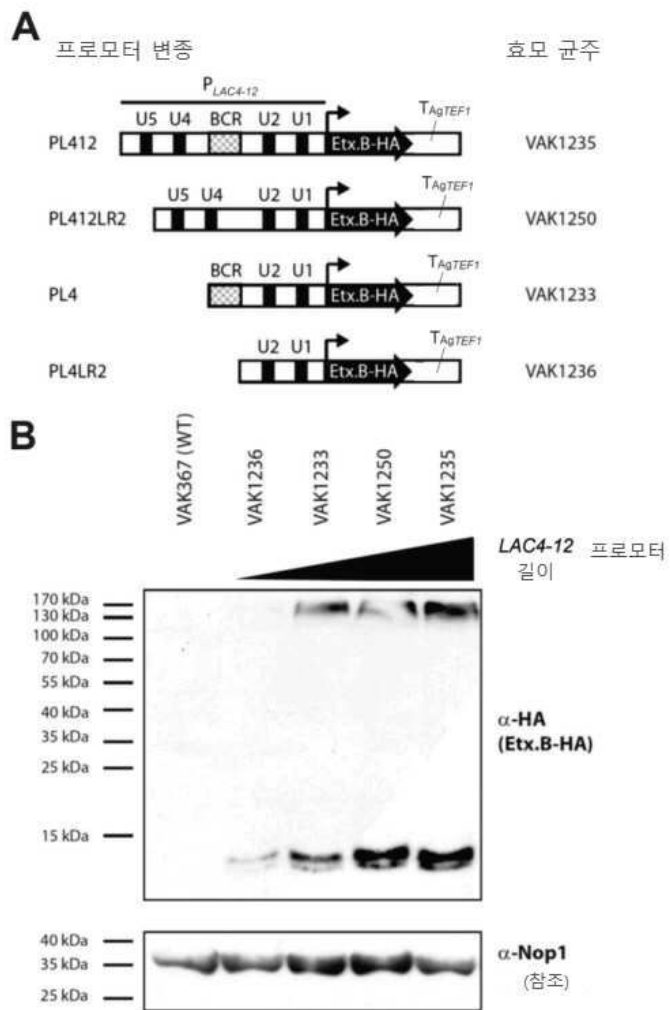
도면4



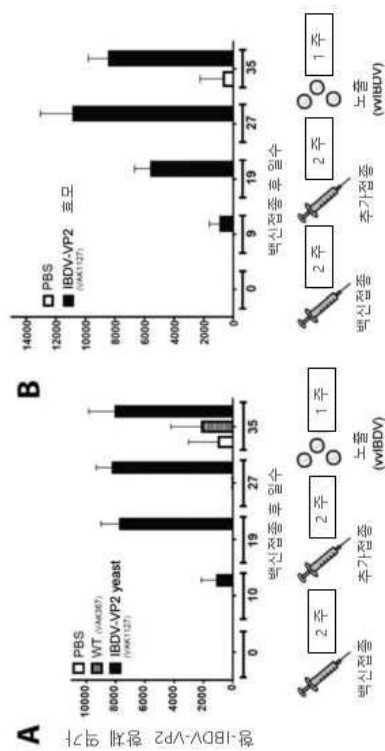
도면5



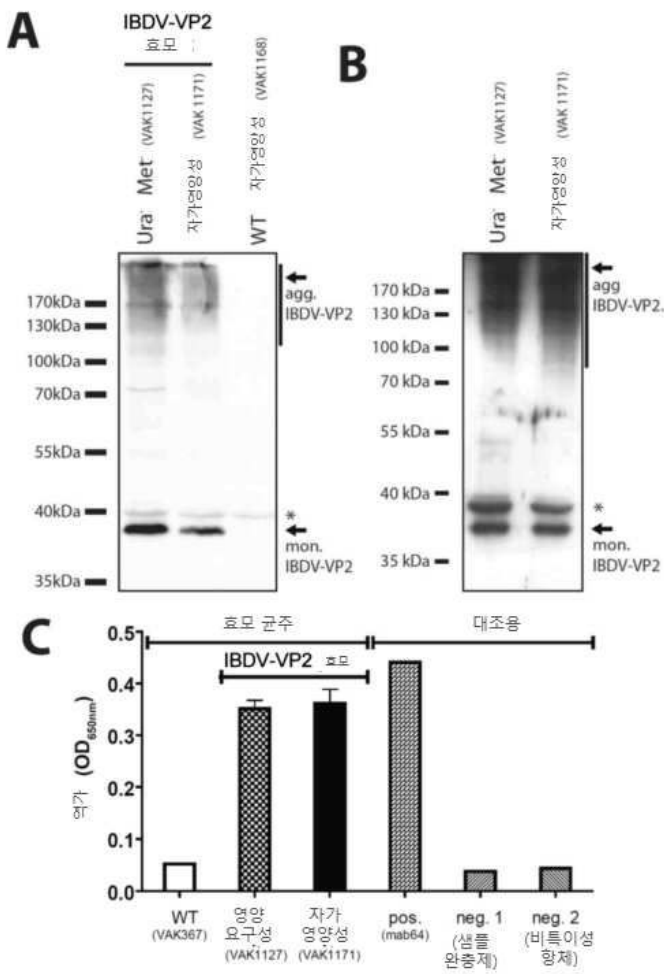
도면6



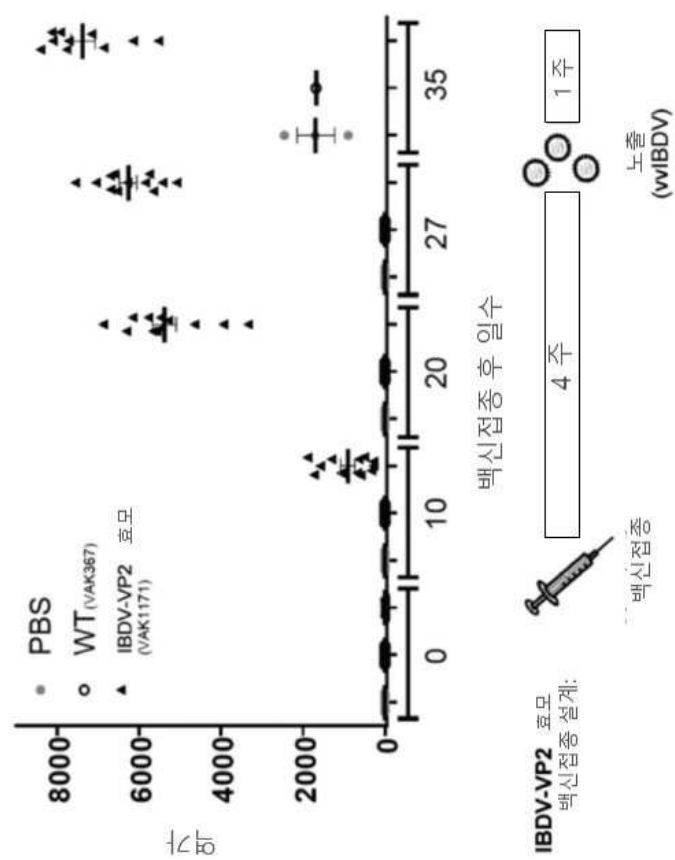
도면9



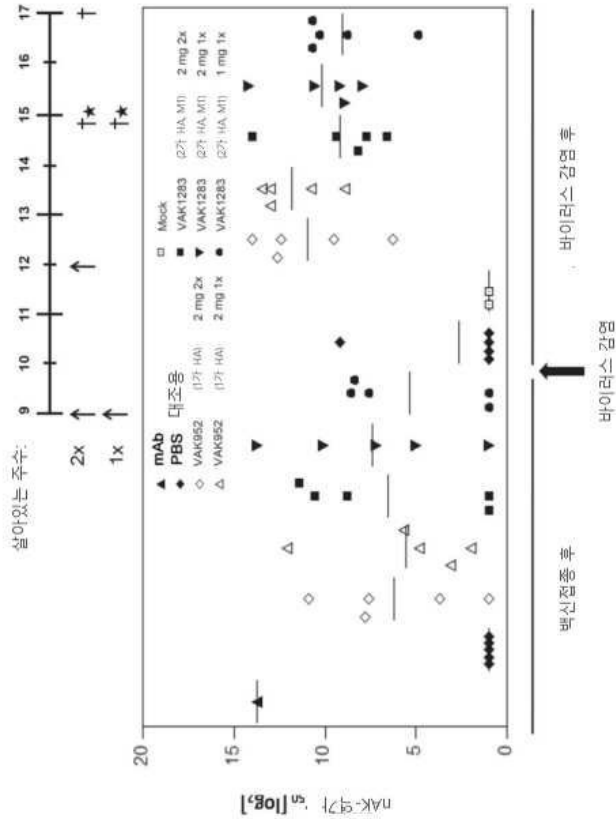
도면10



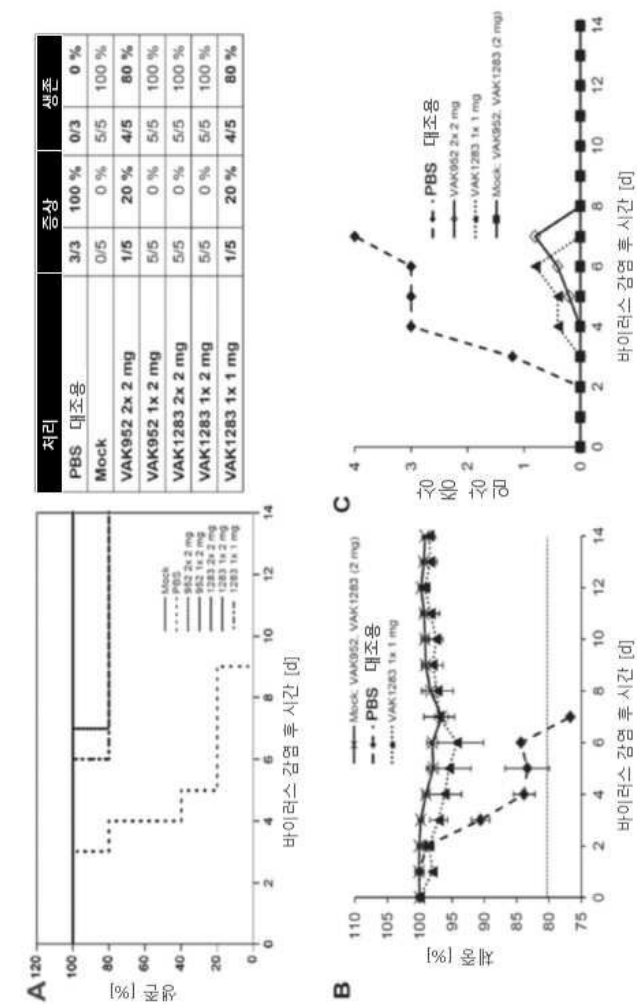
도면11



도면13



도면14



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Martin-Luther-Universit? Halle-Wittenberg
- <120> Optimiertes Wirts-/Vektorsystem zur Erzeugung protektiver mono- und multivalenter subunit-Vakzine auf Basis der Hefe Kluyveromyces lactis
- <130> VAK109
- <160> 25
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 5042
- <212> DNA
- <213> Kluyveromyces lactis

<400> 1

atgaatatca atatcaagaa agattctgga gggaatgggt ccgatttacc tcgatggaac	60
gattctccgg tgggaagttt agggtcgttt aatgggagaa gaagatcgat gtccttctct	120
gaatcagtaa acttcgcaag aaatactcag aacccattgg atatgtcagc tcaggaaatg	180
agaggattga atgggttcag aagatctttc atcgctcata agtcgttgaa acttcatggg	240
aagacaccga actttatcac taggaatttc aacgagtctt tgacgttata cggccatttc	300
gctgtgtaag atttgtccga ggatgaggaa acagaaactg aggtggagac tgatgaagat	360
gaggacgaag aagctgcgct tcttcgtcat ggtattaggg gcctgcgcca cctcgacaat	420
ttcaaacgta tcagagtgtt ttgccaattg ttcggcagca gtcttcatac ctcttacgat	480
ggcagggtat ggcgttacaa ggttatcagt atataggaca ccgaccttga tcttctgagg	540
cagttcagct tcctccaag gaatagggat actagtagta tcagattccc aaggcttacc	600
gtcattaatg taatgtttca taaagtaatc cagctcttca atagatctc tacgccggac	660
gcatcgtggc cggcatcacc ggccgacag gtgcggttgc tggcgctat atcgccgaca	720
tcaccgatgg ggaagatcgg gctcgccact tcgggctcat gagcgcttgt ttcggcgtgg	780
glatggtggc agggcccggt gccgggggac tgttggcgcc catctccttg catgcacat	840
tccttggggc ggccggtgtc aacggcctca acctactact gggtgcttc ctaatgcagg	900
agtcgcataa gggagagcgt cgatcgacct ttgacattcg ctgttcaaag tiaccacagc	960
agcaattgat ccaagctaac tcacggcacg ggcgtagcaa gtgaaccgtc gatattgagc	1020
agtgtatgaa tatgcattcg taccagtatt ttgtgtgac acgcaggact ttacggtttc	1080
acggaccgga acagaccgta ttctgtcct taagtgtaat gtatgggtgt gatctctgtc	1140
ctccgccttt ccatacaaa agttgctttg aaaaagaagt aactgcaaaa tcatagataa	1200
tgacactttg aataactaga aataacaact tcggaccctt gctcaattca agtaagacaa	1260
tatatagcgt acctgccgtt cttccaagtg agggtttggt ctgttgggtc agaaatccca	1320
ggatattcag agttttttaa agcttttctt agagtcaagg cactttttta caccaattgt	1380
actagtacc aactaaacat taaaagatca gcaaccatcc aaatggttta cgatttgacc	1440
atttgaacat cacagatctg aactttactc cgactgattg tttttactat acgaaatggg	1500
tagtagggcc tccaattcgc cttctttttc aagtaaggcg gaaacgttac tgccatcgga	1560
gtataaaaag aatgcggtta agaaggaaac aatacgcaat ggcaagaaaa ggaaattgcc	1620
tgatacagaa tcctcagatc ctgagtttgc aagtcggcgt ttgatagcta atgaaactgg	1680
cactgatgcg gtgagtaatg gtaacaaaaa tgatagcaat gccacaaca acaacaaca	1740

caacaacaag aaatcaagtg aagtaatgca ccaggcgtgc gatgcttgca ggaagaagaa	1800
gtggaaatgt tccaagacag taccgacttg cacgaactgt ctgaaataca atttagactg	1860
tgtctactct ccgcaagtig ttaggactcc gttgacaaga gcacatttaa cagagatgga	1920
aaatagggtt gcagagtigg aacagttttt gaaagaactt tttccagttt ggatatacga	1980
taggttactt cagcaaaaag atacatacag gattagggaa ttgcttacta tgggttctac	2040
aaatactgtt cggggacttg catcgaataa tatcgattca tcgttagaac agcccgttgc	2100
ctttggtact gcgcagccgg cacaatcttt gtcaactgat ccagcagtac aatctcaagc	2160
ctatccaatg caaccggtac cgatgacaga gcttcaatct atcaccaatc ttcgacacac	2220
gccatcactt ctggatgaac agcaaatgaa cacgatttcc acggcaacgc tgcggaacat	2280
gtactcttca ggtaacaata ataacaactt gggtaacatc tctggtctat cacctgttac	2340
agaggcattc ttccgttggc aggaaggtga aacgtcaatc gataatagtt attttggaaa	2400
aggttcaatt ttgttttggg tgaaccaatt actatcatca gaaaagatcg ctggcggttac	2460
atcaaaagta ggcaatgaca ttaacactaa taataataat ataaaccatc agaagctacc	2520
tctaatacta aacaataata ttactcataa tgtgtcggac ataaccacaa caagtacatc	2580
ttcaaacaaa agggcaatgt ctctcttttc tgccaatgac tctgtatatac tcgctaaaag	2640
agagacaata tccgcgtata tcgatgcgta cttcaagcac tatcatgcgc tatatccgtt	2700
ggtcagtaag gaaatgtttt tcgctcagta taatgatcaa attaaaccag agaacgttga	2760
gatatggcac atcttactaa acgcggtatt agctttgggt tcatggtgct ctaattcatg	2820
ttcaagtcac catactctct attacaaaaa cgcattatca tatttgtcca ccgctgtatt	2880
ggaaacaggg tccacagatt taaccatagc actcatactt ttaacgcatt atgttcaaaa	2940
gatgcataag ccaaacactg catggagtct cataggactt tgtagccata tggctacatc	3000
gttgggatta caccgggac taccaaaactc aacgatacat gatcagcaac tccgtagagt	3060
atttgtgtgg actatttatt gcacgggatg cgatctctca ttagagactg gaaggccctc	3120
attattgccc aatcttcagg ctattgatat accattacca gcttcactcg ccactatcaa	3180
agaaccaagc atatatctct ccatcataca agaattccaa tggctcctaaa tattgcaaca	3240
gaaattgtca aataactcat atcagcaaag tgcaggtgaa tgtctctcat ggttcgatag	3300
tgttcaagca tttttagacc actggcctac tctagtagc gaagctgaac tcaaagcctt	3360
aatgaaact caactagatt ggctaccatt agtgaagttc cggccatact ggatgttcca	3420
ttgttcctta atatcacttt tctcagtttt ttttgaagaa gatgccccaa ccgacaacaa	3480

cgtcatacgg tgcaaggagt tatgccttca actttcaagc agaaatatat ttagcgtggc 3540
 cacttttcta cggagctatg cattcaactc actttcctgt tggtagcgga cacattatct 3600
 tgttagaagc gcattagtgc ctctacattt cgcactctgg atatctccac agcacgcctt 3660
 gtgggagaca gttaaagcgc aattattatc agcccatgaa gcgatgggta tattgtcaca 3720
 agaactcttc ttggccgcta aatttgatgg gatattaacc aagaattatt ctgaaatact 3780
 acaaagagaa ggcatcaaca aaagccaact gatgccacca ccaactccat tgctacaatc 3840
 aaccagtttc tcggacctac ttctactgtg gtcagcaaac gcagaagacg ctccgagagt 3900

cagtaattcc cagatgcctc aatcgatcac tatcacggac tctttgctac agtcatcaac 3960
 aactcaaatg agacctcaa ccacatctgg atggcctgat accaacaact tcctgaatcc 4020
 atcgaccaa cagctattca acaccacaac aatggacgat gtgtacaact atatatattga 4080
 taacgacgag taagaaatct ctcttttccg tagtcaattg ggacagcatc aattcatgta 4140
 ttacttttt gttagtagc tatcaaatag ctatccaacg agaccactgg tacgaacagt 4200
 gtccatcatg cacattgtag gtaaccagg gagcggatcg gtatggcgaa gagacttcat 4260
 cgatggccat cgatgatgac gaaggtagt tt cggaaaataa cgatatccag caacaacagc 4320

agctgaagca gcagcagcag cacttgcata agaagaaaag aaatcgtcc accacgaagg 4380
 cggtagttct ctttctaag tcgttcgtag gtaccggggt tctttttcta cctagagctt 4440
 tccataacgg tgggtggttg ttcagtacgc tgtgtctttt gttctgcgcc acggtgtctt 4500
 tctactgctt catcctgttg atagacacga agactgctgt tggagtggat ggatacggtg 4560
 aattgggttc acgtttattc ggacccaaat tgaagttcac tgtcctttca tcgattgtac 4620
 tctcgcaaat cggatttgct gctgcttata ctgtgttcac tgcaacaaac ttgcaggcat 4680
 tcttcaaaca tgtcttttct ctgcaatact cgttaatctt ctggattatg atccaactag 4740

cattctatct gccgctatca ttgactagaa acattgcaag actcagtgcc accgctttgg 4800
 tagcagatct ttcatctctc ttgggtctag tatacgtcta ttattattcc agtttctata 4860
 ttggaacca tggcatcgtc tcggattcca tgggtgtctt caacaatcg gactggacgt 4920
 tatttattgg aactgcgata ttacatatg agggatatcg tctcttgatc ccaatccatg 4980
 aatctatgga aaaacctgca catttcaaac cggcattgat gtacgtcatc ctggttgtaa 5040
 ca 5042

<210> 2

<211> 2349

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Synthetische Polynukleins?re

<400> 2

cgtaattctg tctttaatca ttaacactga ctgaaggata taattataag acaacacaca	60
gagacttttg ttigtgtttt agcttiacact ttccagctat attgaatagc atatatatgt	120
tccagaagct acaaccacct tgaactacag cccaactcaa cattgaaagt tactgccttt	180
atataccttg atacaccatt tagacctcca attaacgat tgtccttgtc ataatagagct	240
agagtagcaa ggiatcaaca acagiatgga catcttattg tcaactttct agtacggagg	300
gaagaatccc gaatatgtta aatctgacgc gcgggtattg ctaagtcacg ttgcaggccc	360
acgcagaccc gagtttcttt cttacaaaag cgtgtacaca cgtaaacgcg ctcggtgcac	420
cgaacggcca gggtcgggtt tcattcggta tagagccacg caggtaactt gccaattcca	480
aaaaaaaaa aatgacgata ctagtaacca aaggaaagga acagatagat aaaattccga	540
gactgtcaaa ttaggttttt ttcttttttt ttggcgggag tcagtgggcc gaaatatgtt	600
cttggcctag aacttaatct ggtttgatca tgccaatact tgcctgagtg cccgactttt	660
tgcccacctt ctgtccttct gtctatcctt caaaacccac ctgttttcca gccgtatctt	720
cgctcgcac tacacatact gtgccatac ttgtgtgtag ccggacgtga ctatgaccaa	780
aaacaacaa ggagaactgt tcgccgattt gtaacactcc tgcattccac caagtgggta	840
tgcgctatgc aatgttaagc taggtcaggt cagaccaggt ccaaggacag caacttgact	900
glatgcaacc ttaccatct ttgcacagaa catacttgta gctagctagt tacacttatg	960
gaccgaaaag gcacccacc atgtctgtcc ggcttttagag tacggccgca gaccgtgat	1020
ttgccttgcc aagcagtagt cacaatgcat cgcattgagca cacgggcacg ggcacgggca	1080
caggaacat ttgcaaaaat accagataca ctataccgac gtatatcaag cccaagtta	1140
aaattcctaa atttcgcggg ggatcgactc ataaaatagt aaccttctaa tgcgtatcta	1200
ttgactacca accattagtg tggttgcaga aggcggaatt cgtcgacgaa cttgtttaat	1260
tattatgggg caggcgagag ggggaggaat gtatgtgtgt gaggcgggag agacggagcc	1320
atccaggcca ggtagaaata gagaaagccg aatgttagac aatatggcag cgtagtagag	1380
taggtaggta ggcaagtact gctagcaaag aggagaaggg taagctcact cttcgattc	1440
cacaccgtta gtgtgtcagt ttgaacaaaa aaacaatcat cataccaatt gatggactgt	1500
ggactggctt ttggaacggc ttttcggact gcgattattc gtgaggaatc aaggtaggaa	1560
tttggtcata ttacggaca acagtgggtg attcccatat ggagtaggaa aacgagatca	1620
tggtatcctc agatatgttg cggaattctg ttaccgcaa agttcagggt gctctgggtg	1680
gtttcgggtg gtctttgctt tgcttctccc ttgtcttgca tgttaataat agcctagcct	1740

gtgagccgaa acttagggta ggcttagtgt tggaaacgtac atatgtatca cgttgacttg 1800
gtttaaccag gcgacctggg agccagccat acccacacac gttttttgta tcttcagtat 1860
agtttgtaaa agttagcggt aaatttgtgg tccgagcaac agcgtctttt tctagtagtg 1920
cggtcgggta ctiggttgac attggtatgt ggactttgtt gctacacat tcactacttg 1980
aagtcgagtg tgaagggtat gatttctagt ggtgaacacc tttagttacg taatgttttc 2040

attgctgttt tacttgagat ttcgattgag aaaaaggat ttaatagctc gaatcaatgt 2100
gagaacagag agaggatgtt cttccctaac tcgaaaggta tatgaggctt gtgtttctta 2160
ggagaattat tattcttttg ttatgttgcg ctgtagtgtg gaaaaggatga agagacaaaa 2220
gctggaattg tgagcggata acaagctcaa cacttgaaat ttaggaaaga gcagaatttg 2280
gcaaaaaaaaa taaaaaaaaa ataacacac atactcatcg agaagctgta ccgtcgacgg 2340
cgcgccatg 2349

<210> 3

<211> 7964

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Synthetische Polynukleins?re

<220><221> Variation

<222> (6628)..(6629)

<223> nn ist aa, ag oder ga

<400> 3

aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatgtt tctaaataca 60
ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa 120
aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgcgcctt attccctttt ttgcggcatt 180
ttgccttctt gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca 240
gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag 300

ttttcgcgcc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctctg tatgtggcgc 360
ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatc actattctca 420
gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt 480
aagagaatta tgcagtgtg ccataacat gagtgataac actgcggcca acttacttct 540
gacaacgacg ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt 600
aactgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaac acgagcgtga 660

caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact 720

tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcgataaag ttgcaggacc 780

acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga 840

gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt 900

agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga 960

gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact 1020

ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga 1080

taatctcatg accaaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt 1140

agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca 1200

aacaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgtt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct 1260

ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg 1320

gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc ttagcaccg cctacatacc tcgctctgct 1380

aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc 1440

aagacgatag ttaccggata aggcgagcgc gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca 1500

gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga 1560

aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc gcagggtcgg 1620

aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaacgcc tggatctttt atagtcctgt 1680

cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag 1740

cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggttc ctggcctttt gctggccttt 1800

tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt 1860

tgagtgagct gataccgtc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagtgagcga 1920

ggaagcgga gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta 1980

atgcagctgg cagcacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa 2040

tgtgagttag ctcaactatt aggcaaccca ggctttacac tttatgctcc cggtcgtat 2100

gttgtgtgga atgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta 2160

cgccaagcgc gcaattaacc ctactaaag ggaacaaaag ctgggtaccg gccccggtga 2220

cctcatgtca gtcgtttata ctctcagga gaacgcagtt gcgacctcat ataataagc 2280

aaaagaagac cggcagtagt tccaggaata attgccaaag tattcctagt aaaaccttta 2340

tataaccaag caatggtttc tctcttactt ctcttcatga aaaagaacac atgctcgaat 2400

gtaaccaagt atgagttgta atagatgtga aacctactac tgcctttggg tatccttatt 2460
 ttcgtatttg gaatatcttc ttagatgtga ctgacgttg atggttagatt tttgagataa 2520
 atatcgtagc cttcaagtct agagacgtgg attttctgta gctttaggaa cgggaattgc 2580
 accgattgaa gaacaaaagc tgctgtaaca cctccaataa aaatgaaaac tcttgaatac 2640
 cacatttctt ctttaggaga aattaacctt ggtttcttcg tttcaatctt attaccatct 2700
 tcatgaaaa atatatccga gagtcttggt tctgcaccg tataatttag ttcctataa 2760
 ttcttgataa aatctaact caattggcga attggctctc tgatcatttc aaaagtagtg 2820

 aaatacaatg caaagccaaa ggattctctt atgaatgata atccaaaccc accaaagcag 2880
 ccaatcaaac caatctctct gatcttatca cgactataaa gccatagatt atcatatttt 2940
 tttgcgttg ataaaagttc atcaatgttt gctcttgat aaatggcatc tattggagct 3000
 gagacaatgg cttgtgcagc acctgcaagg aatcctgctc ttaaaaaatc aaacatatta 3060
 tgttgaaaag cttgatctgt agccctcaac ggaaaattat tcaaagtggc taaataagta 3120
 gigtatagca caactccgc cagcgaattg gctactaatg gcggtaaaaat tctgtcaggt 3180
 atgactttcc aaccatactt gttcaatgct ttagtgacga ttccgattga agagttctcc 3240

 aaataataag tatactttgg attccaaaac cgatacctcg aacttcgtac tttgtctcg 3300
 gactgtgtat tatcgtacc tgtaagaagt actcgaatgt aatgagtata gtcaaatcta 3360
 gctgggtcga acaattttta cggagtcctc atgtaaaaag atgttagttg atacaccata 3420
 gatcttcac cagcagtagc agcaccaca agagaagagg tttggtttga taatgaattg 3480
 acatttgctt tatctgaaac atcttccaat ctcttggttg catcagaaga catcactgtc 3540
 tcttccctt aatgatcact tgaacaaaac tccgataggg tatagtcaat atgtgaaact 3600
 ggacactata tcaaagcaaa aagtagtgtt ggatgctaaa tgggatcggt ttatttaggt 3660

 tctatcgagg agaaaaagcg acaagaagag atagaccatg gataaatgat tatgttctaa 3720
 acactcctca gaagctcatc gaactgtcat cctgcgtgaa gattaaaatc caacttagaa 3780
 atttcgagct tcgaaccgcg gcccgggctc gacgtaatt ctgtctttaa tcattaacac 3840
 tgactgaagg atataattat aagacaacac acagagactt ttgtttgctg tttagcttac 3900
 actttccagc tatattgaat agcatatata tgttccagaa gctacaacca cttgaacta 3960
 cagcccaact caacattgaa agttactgcc tttatatacc ttgatacacc atttagacct 4020
 ccaattaacc gattgtcctt gtcataatga gctagagtag caaggtatca acaacagtat 4080

 ggacatctta ttgtcaactt tctagtacgg aggaagaat cccgaatatg ttaaatctga 4140
 cgcgcggtta ttgctaagtc acgttgcagg ccacgcaga cccgagtttc tttcttacia 4200
 aagcgtgtac acacgtaaac gcgctcgttg caccgaacgg ccagggtcgg ggttcattcg 4260

gtatagagcc acgcaggtaa cttgccaat ccaaaaaaaaa ttaaatgacg atactagtaa 4320
 ccaaaggaaa ggaacagata gataaaattc cgagactgtc aaattaggtt tttttctttt 4380
 tttttggcgg gagtcagtgg gccgaaatat gttcttggcc tagaacttaa tctggtttga 4440
 tcatgccaat acttgcctga gtgcccgaact ttttgcacac cctcttgcct tctgtctatc 4500

 cttcaaaacc cacctgtttt ccagccgtat cttcgctcgc atctacacat actgtgccat 4560
 atcttgtgtg tagccggacg tgactatgac caaaaacaaa caaggagaac tgttcgccga 4620
 tttgtaacac tcttgcaccc atccaagtgg gtatgcgcta tgcaatgtta agctagggtca 4680
 ggtcagacca ggtccaagga cagcaacttg actgtatgca acctttacca tctttgcaca 4740
 gaacatactt gtagctagct agttacacit atggaccgaa aaggcacccc accatgtctg 4800
 tccggcttta gactacggcc gcagaccgct gatttgcctt gccaagcagt agtcacaatg 4860
 catcgcatga gcacacgggc acgggcacgg gcacaggaac cattggcaaa aataccagat 4920

 acactatacc gacgtatatc aagcccaagt ttaaaattcc taaatttccg cggggatcga 4980
 ctcataaaat agtaaccttc taatgcgtat ctattgacta ccaaccatta gtgtggttgc 5040
 agaaggcgga attctccctt cttcgaattc agcttgcctt ttcatttttt attttccatt 5100
 tttcagtttt tgtttgtgtc gaatttagcc agttgcttct ccaagatgaa aaaaaccctt 5160
 gcgcagtttc tgtgtgcaa gatcctaate gacttttcca cccccacaa aagtaaatgt 5220
 tcttttgta cattcgctg ggtagctagc tcccgaate ttcaaaggac ttagggactg 5280
 cactacatca gagtgtgttc acctggtttg ctgcctggtt tgaaagaaaa gagcaggga 5340

 ctgcggggtt cccggcgaat aatcatgcga tagtcccttg gccttccaag tcacatgtag 5400
 agtagacaac agacaggag ggcaggaagg atctttcact gagatcctgt atcttgttgg 5460
 gtaagtcgga tgaaggga atcgtatgag attggagagg atgcggaaga ggtaacgcct 5520
 tttgttaact tgtttaatta ttatggggca ggcgagaggg ggaggaatgt atgtgtgtga 5580
 ggccggcgag acggagccat ccaggccagg tagaaataga gaaagccgaa tgtagacaa 5640
 tatggcagcg tagtagagta ggtaggtagg caagtactgc tagcaaagag gagaagggt 5700
 agtccactct tcgattcca caccgttagt gtgtcagttt gaacaaaaaa acaatcatca 5760

 taccaattga tggactgtgg actggctttt ggaacggctt ttcggactgc gattattcgt 5820
 gaggaatcaa ggtaggaatt tggatcatatt tacggacaac agtgggtgat tcccatatgg 5880
 agtaggaaaa cgagatcatg gtatcctcag atatgttgcg gaattctgtt caccgcaaag 5940
 ttcagggtgc tctggtgggt ttcggttgggt ctttgccttg cttctccctt gtcttgcag 6000
 ttaataatag ctagcctgt gagccgaaac ttagggtagg cttagtgttg gaacgtacgt 6060
 atgtatcacg ttgacttgggt ttaaccaggc gacctggtag ccagccatac ccacacacgt 6120

ttttgtatc ttcagtatag ttgtgaaaag ttagcggaa atttgtggtc cgagcaacag	6180
cgtctttttc tagtagtgcg gtcggttact tggttgacat tggatatttg actttgttgc	6240
tacaccattc actacttgaa gtcgagtgtg aagggtatga tttctagtgg tgaacacctt	6300
tagttacgta atgttttcat tgctgtttta cttagatatt cgattgagaa aaaggtattt	6360
aatagctcga atcaatgtga gaacagagag aggatgttct tccctaactc gaaaggtata	6420
tgaggcttgt gtttcttagg agaattatta tttttttgtt atgttgcgct ttagttgga	6480
aaaggtgaag agacaaaagc tggaattgtg agcggataac aagctcaaca ctgaaattt	6540
aggaaagagc agaatttggc aaaaaaata aaaaaaata aacacacata ctcatcgaga	6600
agctgtaccg tcgacggcgc gccatgttng cgcccgctc gactcagtac tgacaataaa	6660
aagattcttg ttttcaagaa ctgttcattt gtatagtttt tttatattgt agttgttcta	6720
ttttaatcaa atgttagcgt gatttatatt ttttttcgcc tcgacatcat ctgccagat	6780
gcgaagttaa gtgcgcagaa agtaatatca tgcgtcaatc gtatgtgaat gctggctcgt	6840
atactgctgt cgattcgata ctaacgccgc catccagtgt cgaaaacgag ctctcgacac	6900
gcgtcacaag ctccggagac aatcatatgg gagaagcaat tggaagatag aaaaaagta	6960
ctcggatcat aaatataatg gattctgggt agaagatcgg tctgcattgg atggtggtaa	7020
cgcatttttt tacacacatt acttgccctg agcatcaaat ggtggttatt cgtggatcta	7080
tatcacgtga ttgcttaag aattgtcgtt catggtgaca cttttagctt tgacatgatt	7140
aagctcatct caattgatgt tatctaagat catttcaact atctaagatg tggttgtgat	7200
tgggccattt tgtgaaagcc agtacgccag cgtcaatata ctcccgtaa ttagttgcac	7260
catgtccaca aaatcatata ccagtagagc tgagactcat gcaagtccgg ttgcatcgaa	7320
acttttacgt ttaatggatg aaaagaagac caatttgtgt gcttctcttg acgttcgttc	7380
gactgatgag ctattgaaac ttgttgaaac gttgggtcca tacatttgcc ttttgaaaac	7440
acacgttgat atcttggatg atttcagtta tgagggtact gtcgttccat tgaaagcatt	7500
ggcagagaaa tacaagttct tgatatattga ggacagaaaa ttcgccgata tcggtaacac	7560
agtcaaatga caatatacat cgggcgttta ccgtatcgca gaatggtctg atatcacaa	7620
cgccacggg gttactggtg ctggtattgt tgctggcttg aaacaagggt cgcaagaggt	7680
caccaagaa ccaaggggat tattgatgct tgctgaattg tcttccaagg gttctctagc	7740
acacggtgaa tatactaagg gtaccgagct ccaattcgcc ctatagttag tcgtattacg	7800
cgcgctcact ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttaccaac	7860

ttaatgcct tgcagcacat ccccttttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca 7920
 ccgatcgccc ttccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atgg 7964
 <210> 4
 <211> 9728
 <212> DNA
 <213> Artificielle Sequenz
 <220><223> Synthetische Polynukleins?re
 <220><221> Variation
 <222> (4962)..(4963)
 <223> nn is aa, ag oder ga
 <400> 4
 tcagctctgg gagaaacttg gtgtttccgg tgcaactgtc cctgatgaac caaagccgat 60
 caccaatgaa gatatcaaaa ttgcttccaa tttctcaga ggtacaattg tggaagggtc 120
 acaagatgaa tcaactggtg caatttctgc gtgggatcag caattaacca agttccatgg 180
 tatctatatg caagatgac gtgatataag agacactagg aagagtcaag gtcttgaacc 240
 ttattacatt ttcatgtcaa gagttagatt accagggtgga aaggccaatc cagatcaatg 300
 gtgtattctt gatcacttag cagacaaaac tggtaacggt acagttaaaa ttaccaccag 360
 agcaactttc caattgcatg gtgttgttaa gcacaattta aagcacacta tcagagctat 420
 gaattccacc ttgatggaca ctttagcggc gtgtggtgat gttaacagaa atgtcatgct 480
 ttctgctttg cctgctaatt ccacgggtca caaacaatt gcagacgttg gtacatatct 540
 ttctgaacgt ttcttgctc aaacaacggc gtatcacgaa atttgggttag aggggtccaga 600
 caaggatgat gaagatcctt cttggccaga gacctacgag aaaagacaag aaggtcctat 660
 aaagaagaag aaaactcttg ttgccggtaa tgcattagtt gatgcggaac cagtctatgg 720
 tccaacatac ttaccaagaa agttcaagat caatattact gttccacctt tcaatgatgt 780
 cgatgtgtgg tccagtgaac ttggtttgat tgcataaatt gatgaaccaa ctcaaactct 840
 aacaggtttc aatctctatg ttggtggtgg tatggggagt acccacaaca acaaaaagac 900
 ataccaaga acaggttctg tgttcgggta tgtctccgta gcagatgtgg gagatgccat 960
 tgaaaagggtg atgattgttc aaagagatca tggatgatcg accaacgta agcacgctcg 1020
 tttaaagtac actgttgatg atttgacat tgaaggttac aagcagaagg tcgaagaact 1080
 atggggcaag aagtttgaac ctgctgctgc gtatgagatc aaatcaaaca ttgattactt 1140
 cggttgggta aaggatgaaa ctggactaaa tcatttcact gccttcattg aaaatggtag 1200
 agtggaagat acagtagagc tgcctcagaa aacaggtttc aggaaaattg cacagttgat 1260

gaagaaagat aacttcggtc acttcagatt aaccggtaac caacacgttc ttatctcaga	1320
cgttgatgac gagcatttag acgaagttaa agctatcatg aacaagtaca agctagacaa	1380
cacgaacttc agtggattga ggttatcgtc tgcctgcatgt gttgctttgc caacctgtgg	1440
tttggctatg gccgaatctg aacgttattt gcctgtttta atcacaaagc tggagaatgc	1500
attagaagag tatgggttac gccacgattc tattgtcatg agaatgactg gttgtccaaa	1560
tggttgtgct cgtccatggt tagctgaggt tgccttagtg ggtaaagccc caggaactta	1620
taatctatta ctcgagggtg gttattacgg tcaaagattg aacaaactat acagagcatc	1680
catcaaagaa gatgaaattt tagccacatt gaaacctcta ttttaagaggt ggtccttgga	1740
aagactcgaa ggigaacact tcggggattt cgtcattaga gtaggtgtta tcaaaccaac	1800
cttgaaggt aaatacttcc atgatgatct tccagaagaa gctctatgag ggagccaact	1860
cctttcatat gggagggccg catcatgtaa ttagttatgt cacgcttaca ttcacgccct	1920
ccccccat ccgctctaac cgaaaaggaa ggagtttagac aacctgaagt ctaggtccct	1980
atttattttt ttatagtatt gttagtatta agaacgttat ttatatttca aatttttctt	2040
ttttttctgt acagacgctg gtacgcatgt aacattatac tgaaaacctt gcttgagaag	2100
gttttgggac gctcgaaggc ttttaatttc gcgccccggg ctgagcgta attctgtctt	2160
taatcattaa cactgactga aggatataat tataagacaa cacacagaga cttttgtttg	2220
ctgttttagct tacactttcc agctatattg aatagcatat atatgttcca gaagctacaa	2280
ccacctgaa ctacagccca actcaacatt gaaagtact gcctttatat accttgatac	2340
accatttaga cctccaatta accgattgtc cttgtcataa tgagctagag tagcaaggta	2400
tcaacaacag taigacatc ttattgtcaa ctttctagta cggagggaag aatcccgaat	2460
atgttaaate tgacgcgcgg gtattgctaa gtcacgttc aggccacgc agaccgagt	2520
ttctttctta caaaagcgtg tacacacgta aacgcgtcgt gtgcaccgaa cggccagggt	2580
cggggttcat tcggtataga gccacgcagg taacttgcca attccaaaaa aaattaatg	2640
acgatactag taaccaaagg aaaggaacag atagataaaa ttccgagact gtcaaattag	2700
gtttttttct ttttttttgg cgggagtcag tgggccgaaa tatgttcttg gcctagaact	2760
taatctggtt tgatcatgcc aatacttgcc tgagtccccg actttttgcc caccctcttg	2820
ccttctgtct atccttcaaa acccacctgt tttccagccg tatcttctgt cgcacttaca	2880
catactgtgc catatcttgt gtgtagccgg acgtgactat gaccaaaaaa aaacaaggag	2940
aactgttcgc cgatttgtaa cactcctgca tccatccaag tgggtatgcg ctatgcaatg	3000
ttaagctagg tcaggtcaga ccaggtccaa ggacagcaac ttgactgtat gcaaccttta	3060

ccatctttgc acagaacata cttgtagcia gctagttaca cttatggacc gaaaaggcac 3120

cccaccatgt ctgtccggt ttagagtacg gccgcagacc gctgatttgc cttgccaagc 3180

agtagtcaca atgcatcgca tgagcacacg gccacgggca cgggcacagg aaccattggc 3240

aaaaatacca gatacactat accgacgtat atcaagccca agtttaaaat tcctaaattt 3300

ccgcggggat cgactcataa aatagtaacc ttctaatacg tatctattga ctaccaacca 3360

ttagtgtggt tgcagaaggc ggaattctcc cttcttcgaa ttcagcttgc tttttcattt 3420

tttattttcc atttttcagt ttttgtttgt gtcgaattta gccagttgct tctccaagat 3480

gaaaaaaacc cctgcgcagt ttctgtgctg caagatccta atcgactttt ccacccccca 3540

caaaagtaaa tgttcttttg ttacattcgc gtgggtagct agctccccga atcttcaaag 3600

gacttaggga ctgcactaca tcagagtgtg ttacactggt ttgtgcctg gtttgaaaga 3660

aaagagcagg gaactcgcgg gtcccgggcg aataatcatg cgatagtcct ttggccttcc 3720

aagtcacatg tagagtagac aacagacagg gagggcagga aggatcttcc actgagatcc 3780

tgtatcttgt tgggtaagtc ggatgaaagg ggaatcgtat gagattggag aggatgcgga 3840

agaggtaacg cttttgtta acttgtttta ttattatggg gcaggcgaga gggggaggaa 3900

tgtatgtgtg tgaggcgggc gagacggagc catccaggcc aggtagaaat agagaaagcc 3960

gaatgttaga caatatggca gcgtagtaga gtaggtaggt aggcaagtac tgctagcaaa 4020

gaggagaagg gtaagctcac tcttcgcatt ccacaccgtt agtgtgtcag tttgaacaaa 4080

aaaacaatca tcataccaat tgatggactg tggactggct tttggaacgg cttttcggac 4140

tgcgattatt cgtgaggaat caaggtagga atttggatcat atttacggac aacagtgggt 4200

gattcccata tggagtagga aaacagatc atggatcct cagatatgtt gcggaattct 4260

gttcaccgca aagttcaggg tgctctggtg ggtttcgggt ggtctttgct ttgcttctcc 4320

cttgtcttgc atgttaataa tagcctagcc tgtgagccga aacttagggt aggcttagtg 4380

ttggaacgta cgtatgtatc acgttgactt ggtttaacca ggcgacctgg tagccagcca 4440

taccacaca cgttttttgt atcttcagta tagttgtgaa aagtgtagcg gaaatttgtg 4500

gtccgagcaa cagcgtcttt ttctagtagt gcggtcgggt acttgggtga cattggtatt 4560

tggactttgt tgctacacca ttactactt gaagtcgagt gtgaagggtg tgatttctag 4620

tgggtgaacac ctttagttac gtaatgtttt cattgctgtt ttacttgaga tttcgattga 4680

gaaaaaggta tttaatagct cgaatcaatg tgagaacaga gagaggatgt tcttcctaa 4740

ctcgaaagggt atatgaggct tgtgtttctt aggagaatta ttattctttt gttatgttgc 4800

gctttagt ggaagagg aagagacaaa agctggaatt gtgagcggat aacaagctca 4860
acacttgaaa ttaggaaa agcagaattt ggcaaaaaaa ataaaaaaa aataaacaca 4920
catactcadc gagaagctgt accgtcgacg gcgcgccatg tnnccggccg cctcgactca 4980
gtactgacaa taaaagatt cttgttttca agaactgtc atttgtatag tttttttata 5040
ttgtagtgt tctattttta tcaaatgtta gcgtgattta ttttttttt cgccctcgaca 5100
tcatctgccc agatgcgaag ttaagtgcgc agaaagtaat atcatgcgtc aatcgtatgt 5160
gaatgctggt cgctatactg ctgtcgattc gatactaacg ccgccatcca gtgtcgaaaa 5220

cgagctcggg agccaactcc tttcatatgc tcccacctgg ccaccaccc acacacacat 5280
acatacacia acacaaacga tttgtttatt taaatattta ttttgtacat tgtcgcatag 5340
aaaatgcata tttatctgac gttcttcttc gttacgcctt tcatgggttt aagggatgac 5400
tcaatttaca ctatctgca aggtgctaca acaatgtatt agtcaggatga tcgcaaatg 5460
catggaatat ccatggatc accaaagaag tttcaatctt aaagtcctct ggaaaacctt 5520
tcttactgtg ctttgaaaag acctatttcg tttcttacc ctttcaataa atgaccgtgg 5580
tttttttttg ttatcgttat aatattagac cataaaatat cgtttacgta aacggctcgac 5640

cttgtcaacg agaaaaagg aaacaagtcc aacgttattc tagaggtagc cttcatagtt 5700
tcaactggaa ctactccaaa ttatatcttc aaaccttcaa agtatgttga ggtttactca 5760
tgtgcttaat aatggggcga aacgtctgac tcttagttta ggaagaagct acttgctggtg 5820
tttcggttcc atgcatggac ctgagttgc tgtttcaact ttaatcaaaa aagacaagaa 5880
acctaatggc tttcgtggta tgttggtttt atttgtaggt atcggaacac tcgctgtaag 5940
cgggctttct acaaacttat acaatgatca aaatgttaag gaagatcctt ggaaaagtgt 6000
gtctgttgat aagtcatttg acccgtttcc aactgagtta aaggctcctg agttcccat 6060

ttctactgaa tatgttatgt taggttttgg tataaggtcg gttactttca ttagtttcaa 6120
agtttatggg ttaggtatct atgctgcaaa agaggatttg ggattaatcc cttaaagtatt 6180
ggattcaaac tttcttttca ctgcgttcat tgatttcgac tccagtaaaa gtcacagga 6240
gaatttgaag actgctttag acaacctga aacttcaga attctcatta acaacttatt 6300
ggatagtggg atcagatttg tcgcaaaaat cacacctatc agaaacactg acttcaacca 6360
tctcaagac ggtcttgtga aatccattct tgggcacccg gatagtaaaa aggatgaaga 6420
taggttaacg aatggattac aacaattacg cgatgctttc tcaagaaaag gttcagtacc 6480

aaagaataac gatttatgga ttgaattgca agccaacgga tatttgcaag taccctattt 6540
cgatagaaaa acaggagaat ccaccacaat gggacaggta aaagagacat tgatcggtaa 6600
attactcttc agtcaatatt taagtggacc taaaccgtta agtccaagca caaaagattc 6660

tgtggatctt aaattagtta cattggctta agacacgtgt caagcttgat atcctgcatt	6720
aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgttcct	6780
cgctcactga ctgcgtgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggatca gctcactcaa	6840
aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa	6900
aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc	6960
tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag tcagaggagg cgaaacccga	7020
caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc	7080
cgacctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttccgggaagc gtggcgcttt	7140
ctcatagctc acgtctagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct	7200
gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg	7260
agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta	7320
gcagagcgag gtatgtaggc ggtgtctacag agttcttgaa gtggtagcct aactacggct	7380
acactagaag aacagtatct ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttccgaaaaa	7440
gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaacaaa ccaccgtgg tagcgggtgt tttttgttt	7500
gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatccttg atcttttcta	7560
cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttgtc atgagattat	7620
caaaaaggat cttcacctag atctttttaa attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa	7680
gtatatatga gtaaacctgg tctgacagtt accaatgctt aatcagttag gcacctatct	7740
cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact ccccgctcg tagataacta	7800
cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgt	7860
caccgctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg	7920
gtcctgcaac ttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa	7980
gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt	8040
cacgtctgct gtttggtatg gcttcattca gctccggtc ccaacgatca aggcgagtta	8100
catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctcgc atcgttgta	8160
gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta	8220
ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct	8280
gagaatagtg taigcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg	8340
cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac	8400
tctcaaggat cttaccgtg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact	8460
gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa	8520

atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt 8580

ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat 8640

gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg 8700

acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc 8760

cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccg 8820

agaaagaaag acgttggctt ctacgtatg aactttggta acgttacgt cgcattctgtt 8880

gctgtttatt catcatacac acagctactt acatcatttg tcgaagcttc taaatttggt 8940

ggaccatcaa tcattctagc gtacttgcca tacaactcag aaagagacac tccactagaa 9000

gttttaaaag aaaccaaaat tgggtgacga agtgggttact ggcctttata caggtttaac 9060

ccttacgaag aacgcgacga ccaagttttc aaattggact cctctgttat caaacaacaa 9120

ctgaaggact ttttagaccg agagaataag ctactcttc tagctcaaaa gtccccagag 9180

cttgccagaa atttgaagca ttccgcctca gatgcgattc aattgaaaca agacagaagg 9240

gctaaagcag cattcgatca actcttagaa ggtctctctg gccctctctt tcacatttat 9300

catgcttctg acggtggcaa tgcagctaatt ttagcaaaaa gattgggtac aagggcattct 9360

gctagaggtc taaaaactat tgtactatca atggaagaca ttgttctaga agagttacca 9420

ggtgaagaga atgttgtatt tataacgtca actgctggtc aaggatgaatt ccctcaagat 9480

ggtgaaggcat ttgggatgc tctgaagtct tctactgacc tcgatttagc ttctttgaat 9540

ttctccgtgt ttggtttagg tgactctgca tactggccac gtaaggaaga cgccattac 9600

tacaacaac ccgctaagga tttgttcaag agattagaat tgctttctgg tcaagaacta 9660

gtttctttgg gattgggtga tgaccaggat gccgatgggt atcaaacagg ctatgctgtg 9720

tggaagc 9728

<210> 5

<211> 2794

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Synthetische Polynukleins?re

<400> 5

cgtaattctg tctttaatca ttaacactga ctgaaggata taattataag acaacacaca 60

gagacttttg ttgtctgttt agcttacact ttccagctat attgaatagc atatatatgt 120

tccagaagct acaaccacct tgaactacag cccaactcaa cattgaaagt tactgccttt 180

atataccttg atacaccatt tagacctcca attaacgat tgtccttgct ataagagct 240

agagtagcaa ggatcaaca acagtatgga catcttattg tcaactttct agtacggagg 300
 gaagaatccc gaatatgta aatctgacgc gcgggtattg ctaagtcacg ttgcaggccc 360

 acgcagaccc gagtttcttt cttacaaaag cgtgtacaca cgtaaacgcg ctcggtgcac 420
 cgaacggcca gggtcggggt tcattcggta tagagccacg caggtaactt gccaatcca 480
 aaaaaatta aatgacgata ctagtaacca aaggaaagga acagatagat aaaattccga 540
 gactgtcaaa ttaggttttt ttcttttttt ttggcgggag tcagtgggcc gaaatatgtt 600
 ctgtgcctag aacttaatct ggtttgatca tgccaatact tgcctgagtg cccgactttt 660
 tgcccacctt ctgtccttct gtctatcctt caaaacccac ctgttttcca gccgtatctt 720
 cgctcgcac tacacatact gtgccatac ttgtgtgtag ccggacgtga ctatgaccaa 780

 aaacaaacaa ggagaactgt tcgccgattt gtaacactcc tgcatccatc caagtgggta 840
 tgcgctatgc aatgttaagc taggtcaggt cagaccaggt ccaaggacag caacttgact 900
 gtagtcaacc ttiaccatct ttgcacagaa catacttgta gctagctagt tacacttatg 960
 gaccgaaaag gcacccacc atgtctgtcc ggctttagag tacggccgca gaccgtgat 1020
 ttgccttgcc aagcagtagt cacaatgcat cgcagtagca caggggcacg ggcacgggca 1080
 caggaaacct tggcaaaaat accagataca ctataccgac gtatatcaag cccaagtta 1140
 aaattcctaa atttcgcgg ggatcgactc ataaaatagt aaccttctaa tgcgtatcta 1200

 ttgactacca accattagtgt tggttgcaga aggcggaatt ctcccttctt cgaattcagc 1260
 ttgctttttc attttttatt ttccattttt cagtttttgt ttgtgtcgaa tttagccagt 1320
 tgctttccca agatgaaaaa aacccttgcg cagtttttgt gctgcaagat cctaactgac 1380
 ttttcaccc ccacaaaag taaatgttct ttgtttacat tcgctgggt agctagctcc 1440
 ccgaattctt aaaggactta gggactgcac tacatcagag tgtgttcacc tggtttgctg 1500
 cctggtttga aagaaaagag caggaactc gcgggttccc ggcaataat catgcgatag 1560
 tcctttggcc ttccaagtcg catgtagagt agacaacaga caggaggggc aggaaggatc 1620

 tttcactgag atcctgtatc ttgttgggta agtcggatga aagggaatc gtatgagatt 1680
 ggagaggatg cggaagaggt aacgcctttt gttaacttgt ttaattatta tggggcaggc 1740
 gagaggggga ggaatgtatg tgtgtgaggc gggcgagacg gagccatcca gccaggtag 1800
 aaatagagaa agccgaatgt tagacaatat ggacgctag tagagtaggt aggtaggcaa 1860
 gtactgctag caaagaggag aagggtaacg tcactcttcg cattccacac cgttagtgtg 1920
 tcagtttgaa caaaaaaaca atcatcatc caattgatgg actgtggact ggcttttgga 1980

acggcttttc ggactgcatg tattcgtgag gaatcaaggt aggaatttgg tcatatttac 2040

ggacaacagt gggatgattcc catatggagt aggaaaacga gatcatggta tcctcagata 2100

tggttgcggaa ttctgttcac cgcaaagttc aggggtgctct ggtgggtttc ggttggtctt 2160

tgctttgctt ctcccttgtc ttgcatgtta ataatagcct agcctgtgag ccgaaactta 2220

gggtaggctt agtgttggaa cgtacatatg tatcacgttg acttggttta accaggcgac 2280

ctggtagcca gccataccca cacacgtttt ttgtatcttc agtatagttg tgaaaagtgt 2340

agcggaaatt tgggtccga gcaacagcgt ctttttctag tagtgcggtc ggttacttgg 2400

ttgacattgg tatttggact ttgttgctac accattcact acttgaagtc gagtgtgaag 2460

ggatatgattt ctagtggatga acaccttttag ttacgtaatg ttttcattgc tgttttactt 2520

gagatttcga ttgagaaaaa ggtattttaat agctcgaatc aatgtgagaa cagagagagg 2580

atgtttcttc ctaactcgaa aggtatatga ggcttgtgtt tcttaggaga attattattc 2640

ttttgttatg ttgcgcttgt agttggaaaa ggtgaagaga caaaagctgg aattgtgagc 2700

ggataacaag ctcaacactt gaaatttagg aaagagcaga atttggcaaa aaaaataaaa 2760

aaaaaataaa cacacatact catcgagaag ctgt 2794

<210> 6

<211> 2329

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Synthetische Polynukleins?re

<400> 6

cgtaattctg tctttaatca ttaacactga ctgaaggata taattataag acaacacaca 60

gagacttttg ttgtctgttt agcttacact ttccagctat attgaatagc atatatatgt 120

tccagaagct acaaccacct tgaactacag cccaactcaa cattgaaagt tactgccttt 180

atataccttg atacaccatt tagacctcca attaacgat tgtccttgtc ataataagct 240

agagtagcaa ggtatcaaca acagtatgga catcttatgt tcaactttct agtacggagg 300

gaagaatccc gaatatgtta aatctgacgc gcgggtattg ctaagtcacg ttgcaggccc 360

acgcagaccc gagtttcttt cttacaaaag cgtgtacaca cgtaaacgcg ctcggtgcac 420

cgaacggcca gggtcggggg tcatcggta tagagccacg caggtaactt gccaattcca 480

aaaaaaatta aatgacgata ctagtaacca aaggaaagga acagatagat aaaattccga 540

gactgtcaaa ttaggttttt ttcttttttt ttggcgggag tcagtgggcc gaaatatgtt 600

cttggcctag aacttaactt ggtttgatca tgccaatact tgcctgagtg cccgactttt 660

tgcccaccct cttgccttct gtctatcctt caaaaccac ctgttttcca gccgtatctt	720
cgctcgcac tacacatact gtgccatac ttgtgtgtag ccggacgtga ctatgaccaa	780
aaacaaacaa ggagaactgt tcgccgattt gtaacactcc tgcatccac caagtgggta	840
tcgcctatgc aatgttaagc taggtcaggt cagaccaggt ccaaggacag caacttgact	900
gtatgcaacc ttaccatct ttgcacagaa catacttgta gctagctagt tacacttatg	960
gaccgaaaag gcacccacc atgtctgtcc ggcttttagag tacggccgca gaccgtgat	1020
ttgccttgcc aagcagtagt cacaatgcat cgcatgagca cacgggcacg ggcacgggca	1080
caggaacat ttgcaaaaat accagataca ctataccgac gtatatcaag cccaagtta	1140
aaattcctaa atttcgcgg ggatcgact ataaaatagt aaccttctaa tgcgtatcta	1200
ttgactacca accattagt ttggttcaga aggcggaatt cgtcgacgaa cttgtttaat	1260
tattatgggg caggcgagag ggggaggaat gtatgtgtgt gaggcgggag agacggagcc	1320
atccaggcca ggtagaaata gagaaagccg aatgttagac aatatggcag ctagtagag	1380
taggtaggta ggcaagtact gctagcaaag aggagaagg taagctcact cttcgattc	1440
cacacgtta gtgtgtcagt ttgaacaaaa aaacaatcat cataccaatt gatggactgt	1500
ggactggctt ttggaacggc ttttcggact gcgattattc gtgaggaatc aaggtaggaa	1560
tttggtcata ttacggaca acagtgggtg attcccatat ggagtaggaa aacgagatca	1620
tggtatcctc agatatgttg cggaattctg ttcaccgcaa agttcagggt gctctggtgg	1680
gtttcggttg gtctttgctt tgccttccc ttgtcttgca tgttaataat agcctagcct	1740
gtgagccgaa acttaggta ggcttagtgt ttggaacgtac atatgtatca cgttgacttg	1800
gtttaaccag gcgacctggt agccagccat acccacacac gttttttgta tcttcagtat	1860
agtttgtaaa agttagcgg aaatttgttg tccgagcaac agcgtctttt tctagtagtg	1920
cggtcggta cttggttgac attggtattt ggactttgtt gctacacat tcactacttg	1980
aagtcgagtg tgaagggtat gatttctagt ggtgaacacc tttagttacg taatgtttc	2040
attgctgttt tacttgagat ttcgattgag aaaaaggat ttaatagctc gaatcaatgt	2100
gagaacagag agaggatgtt cttccctaac tcgaaaggta tatgaggctt gtgtttctta	2160
ggagaattat tattcttttg ttatgttcg cttgtagtgt gaaaaggatga agagacaaaa	2220
gctggaattg tgagcggata acaagctcaa cacttgaaat ttaggaaaga gcagaatttg	2280
gcaaaaaaaaa taaaaaaaaa ataaacacac atactcatcg agaagctgt	2329
<210> 7	
<211> 1638	
<212> DNA	

<213> Artificielle Sequenz

<220><223> Synthetische Polynukleins?re

<400> 7

gcggggatcg acicataaaa tagtaacctt ctaatgcgta tctattgact accaaccatt	60
agtggtgttg cagaaggcgg aattctccct tcttcgaatt cagcttgctt tttcattttt	120
tattttccat ttttcagttt ttgtttgtgt cgaatttagc cagttgcttc tccaagatga	180
aaaaaacccc tgcgcagttt ctgtgctgca agatccta at cgacttttcc accccccaca	240
aaagtaaatg tttttttgtt acattcgcgt gggtagctag ctccccgaat cttcaaagga	300
cttagggact gcactacatc agagtgtgtt cacctggttt gctgcctggt ttgaaagaaa	360
agagcaggga actcgcgggt tcccggcgaa taatcatgcg atagtccttt gcccttccaa	420
gtcgcatgta gagtagacaa cagacaggga gggcaggaag gatctttcac tgagatcctg	480
tatcttgttg ggtaagtcgg atgaaagggg aatcgatga gattggagag gatgcggaag	540
aggtaacgcc ttttgttaac ttgtttaatt attatggggc aggcgagagg gggaggaatg	600
tatgtgtgtg aggcgggcga gacggagcca tccaggccag gtagaaatag agaaagccga	660
atgtagaca atatggcagc gtagtagagt aggtaggtag gcaagtactg ctagcaaaga	720
ggagaagggg aagctcactc ttcgcattcc acaccgttag tgtgtcagtt tgaacaaaaa	780
aacaatcacc ataccaattg atggactgtg gactggcttt tggaacggct tttcgactg	840
cgattattcg tgaggaatca aggtaggaat ttggtcatat ttacggacaa cagtgggtga	900
ttcccatatg gagtaggaaa acgagatcat ggtatcctca gatatgttgc ggaattctgt	960
tcaccgcaaa gticagggtg ctctgggtggg tttcggttgg tctttgcttt gcttctccct	1020
tgtcttgcac gtttaataata gcctagcctg tgagccgaaa cttagggtag gcttagtgtt	1080
ggaacgtaca tatgtatcac gttgacttgg ttttaaccagg cgacctggtg gccagccata	1140
cccacacacg ttttttgtat cttcagtata gttgtgaaaa gtgtagcgga aatttgttgt	1200
ccgagcaaca gcgtcttttt ctagtagtgc ggtcgggttac ttggttgaca ttggtatttg	1260
gactttgttg ctacaccatt cactacttga agtcgagtgt gaagggtatg atttctagtg	1320
gigaacacct ttagttacgt aatgttttca ttgctgtttt acttgagatt tcgattgaga	1380
aaaaggtatt taatagctcg aatcaatgtg agaacagaga gaggatgttc ttcctaact	1440
cgaaagggtat atgaggcttg tgtttcttag gagaattatt attcttttgt tatgttgcgc	1500
ttgtagttagg aaaaggtgaa gagacaaaag ctggaattgt gagcgataa caagctcaac	1560
acttgaaatt taggaaagag cagaatttgg caaaaaaat aaaaaaaaaa taaacacaca	1620
tactcatcga gaagctgt	1638

<210> 8

<211> 1081

<212> DNA

<213> Artificielle Sequenz

<220><223> Synthetische Polynukleins?re

<400> 8

```

aacttgttta attattatgg ggcaggcgag agggggagga atgtatgtgt gtgaggcggg      60
cgagacggag ccatccaggc caggtagaaa tagagaaagc cgaatgttag acaatatggc      120
agcgtagtag agtaggtagg taggcaagta ctgctagcaa agaggagaag ggtaagctca      180
ctcttcgcat tccacaccgt tagtgtgtca gtttgaacaa aaaaacaatc atcataccaa      240
ttgatggact gtggactggc ttttgaacg gcttttcgga ctgcgattat tctgaggaa      300
tcaaggtagg aatttggta tatttacgga caacagtggg tgattcccat atggagtagg      360

aaaacgagat catggtatcc tcagatatgt tgcggaattc tgttcaccgc aaagttcagg      420
gtgctctggt gggtttcggt tggcttttgc tttgcttctc ccttgtcttg catgttaata      480
atagcctagc ctgtgagccg aaacttaggg taggcttagt gttggaacgt acatatgtat      540
cacgttgact tggtttaacc aggcgacctg gtageccagcc ataccacac acgttttttg      600
tatcttcagt atagtgtga aaagtgtagc ggaaatttgt ggtccgagca acagcgtctt      660
tttctagtag tgcggtcggt tacttgggtg acattgggtat ttggactttg ttgctacacc      720
attcactact tgaagtcgag tgtgaagggt atgatttcta gtggtgaaca cctttagtta      780

cgtaatgttt tcattgctgt tttacttgag atttcgattg agaaaaaggt atttaatagc      840
tcgaatcaat gtgagaacag agagaggatg ttcttccta actcgaaagg tatatgaggc      900
ttgtgtttct taggagaatt attattcttt tgttatgttg cgctttagt tggaaaaggt      960
gaagagacaa aagctggaat tgtgagcgga taacaagctc aacacttgaa atttaggaaa     1020
gagcagaatt tggcaaaaaa aataaaaaaa aaataaacac acatactcat cgagaagctg     1080
t                                                                                   1081

```

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificielle Sequenz

<220><223> Primer

<400> 9

gagccaccca cctgctcctg	20
<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial seurence	
<220><223> Primer	
<400> 10	
ctgatgtatt gcgctcctta ctaac	25
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artifizielle Sequenz	
<220><223> Primer	
<400> 11	
cccagatgcg aagttaagtg	20
<210> 12	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artifizielle Sequenz	
<220><223> Primer	
<400> 12	
tacaacagat cacgtgatct ttttgtaag	29
<210> 13	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artifizielle Sequenz	
<220><223> Primer	
<400> 13	
gatttcgtaa ccctattgtt catgaatg	28
<210> 14	
<211> 475	
<212> DNA	
<213> Artifizielle Sequenz	
<220><223> Synthetische Polynukleins?re	

<400> 14

ttctcccttc ttcgaattca gcttgctttt tcatttttta ttttccattt ttcagttttt 60

gtttgtgtcg aatttagcca gttgcttctc caagatgaaa aaaaccctg cgcagtttct 120

gtgctgcaag atcctaatacg acttttccac cccccacaaa agtaaatgtt cttttgttac 180

attcgctgg gtagctagct ccccgaaatct tcaaaggact tagggactgc actacatcag 240

agtgtgttca cctggtttgc tgcctggttt gaaagaaaag agcagggaac tcgcgggttc 300

ccggcgaata atcatgcgat agtccttttg ccttccaagt cgcatgtaga gtagacaaca 360

gacaggagg gcaggaagga tctttcactg agatcctgta tcttgttggg taagtcggat 420

gaaaggggaa tcgtatgaga ttggagagga tgcggaagag gtaacgcctt ttgtt 475

<210> 15

<211> 52

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Primer

<400> 15

tatagggcga attggagctc cgccggcgga agaggtaacg ccttttgta ac 52

<210> 16

<211> 44

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Primer

<400> 16

ctaaacggaa ctgcattta aatctcggtt tcgacactgg atgg 44

<210> 17

<211> 55

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Primer

<400> 17

gcgagttccg tttagacgcg tttaaacttg tttaattatt atggggcagg cgaga 55

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificielle Sequenz

<220><223> Primer

<400> 18

cggggaatgc gctgcttttc gacactggat ggcggcgtta 40

<210> 19

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificielle Sequenz

<220><223> Primer

<400> 19

gcagcgcatc ccccggtac cgctctcgac taggtgatta gcg 43

<210> 20

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificielle Sequenz

<220><223> Primer

<400> 20

aaaagctggg taccgggccc actagtcgag agttaaccgt gactacagct a 51

<210> 21

<211> 11582

<212> DNA

<213> Artificielle Sequenz

<220><223> Synthetische Polynukleins?re

<400> 21

ggacgcgcc ttagcgccg cattaagcgc ggcggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 60

cgctacactt gccagcgccc tagcgccgc tcctttcgct ttcttccctt cctttctcgc 120

cagttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctcccttttag ggttccgatt 180

tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 240

gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc ttgacgttg gaggccacgt tctttaatag 300

tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 360

ataagggtt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 420

taacgcgaat ttaacaaaa tattaacgtt tacaatttcg cgccattcgc cattcaggct 480

gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgcg ggccctcttcg ctattacgcc agctggcgaa 540
 agggggatgt gctgcaagcg gattaagttag ggtaacgccca gggttttccc agtcacgacg 600
 ttgtaaaacg acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaaat tggagctccg 660
 ccggcggaag aggtaacgcc ttttgtaac ttgtttaatt attatggggc aggcgagagg 720
 gggaggaatg tatgtgtgtg aggcgggcga gacggagcca tccaggccag gtagaaatag 780

agaaagccga atgttagaca atatggcagc gtagtagagt aggtaggtag gcaagtactg 840
 ctagcaaaga ggagaagggt aagctcactc ttcgcattcc acaccgttag tgtgtcagtt 900
 tgaacaaaaa aacaatcatc ataccaattg atggactgtg gactggcttt tggaaaggct 960
 tttcggactg cgattattcg tgaggaatca aggtaggaat ttggtcatat ttacggacaa 1020
 cagtgggtga ttcccatatg gagtaggaaa acgagatcat ggtatcctca gatatgttgc 1080
 ggaattctgt tcaccgcaa gttcagggtg ctctggtggg tttcggttgg tctttgcttt 1140
 gcttctccct tgccttgcac gtttaataata gcctagcctg tgagccgaaa cttagggtag 1200

gcttagtggt ggaacgtaca tatgtatcac gttgacttgg ttttaaccagg cgacctgta 1260
 gccagccata cccacacacg ttttttgtat cttcagtata gtttgtaaaa gtgtagcgga 1320
 aatttgttgt ccgagcaaca gcgtcttttt ctagtagtgc ggtcggttac ttggttgaca 1380
 ttggtatttg gactttgttg ctacaccatt cactacttga agtcgagtgt gaagggtatg 1440
 atttctagtgt gtgaacacct ttagttacgt aatgttttca ttgctgtttt acttgagatt 1500
 tcgattgaga aaaaggtatt taatagctcg aatcaatgtg agaacagaga gaagatgttc 1560
 ttccctaact cgaaaggtat atgaggcttg tgtttcttag gagaattatt attcttttgt 1620

tatgttgcgc ttgtagttag aaaaggtgaa gagacaaaag ctggaattgt gagcggataa 1680
 caagctcaac acttgaaatt taggaaagag cagaatttgg caaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
 taaacacaca tactcatcga gaagctgtac cgtcgacggc gcgccgatgt ccaacttaca 1800
 agaccaaacc caacaaatcg tcccttttat cagatcctta ttaatgccta ctaccggtcc 1860
 tgcttctatt cctgatgaca ccttggaata acacaccttg agatccgaaa cttcaaccta 1920
 taacttgact gtcggtgaca ctggttctgg tttaatcggt ttcttccctg gttttcctgg 1980
 ttcaattgtc ggtgcccact ataccttaca aggtaacggt aactataagt tcgatcaaat 2040

gttgttgacc gcccaaaatt tgectgctc ctataactat tgtagattgg tttctagatc 2100
 ttttaaccgtc agatcatcca ctttgccctg tggtgtctat gctttgaacg gtacaatcaa 2160
 cgctgtcaca tttcaaggtt ccttgtccga attgaccgat gtctcctata acggtttaat 2220
 gtccgtact gccaatatca atgacaaaat tggtaacgtc ttagtcggtg aaggtgttac 2280
 tgttttgagt ttgccaacct cttatgactt gggttatgtc agattgggtg accctattcc 2340

tgctatcggg ttagacccaa aaatggttgc cactttgtgac tctagtata gaccaagagt	2400
ctataccatc actgctgccg atgactatca attctcctcc caatatcaac ctggtggtgt	2460
cactatcacc ttgttctctg ccaacatcga cgtataaaca tctttgtccg tcggtggtga	2520
attggtattc caaacctccg tccatgggtt agtattgggt gccaccatct atttgattgg	2580
tttcgacggg acaaccgtca ttactagagc cgttgcctgc aacaatggtt taaccactgg	2640
tactgacaac ttgatgcat tcaacttggg aatccctacc aacgaaatca cacaaccaat	2700
cacatccatc aaattggaaa ttgtcacctc caaatccggg ggtcaagccg gtgaccaaat	2760
gtcatggagt gctagagggt cattagccgt aaccatccac ggtggttaact atcctggtgc	2820
cttgagacct gtcactttag tcgcctatga aagagttgct actggttccg tcgttactgt	2880
tgccggtgtt tcaaacttcg aattgatccc aaaccagaa ttggccaaaa acttggttac	2940
cgaatatggt agattcgacc ctggtgctat gaactataca aaattgatct tatccgaaag	3000
agacagattg ggatcaaaa ctgtctggcc tactagagaa tataccgact ttagagaata	3060
tttcatggaa gtcgccgact taaattcccc attgaaaatc gccggtgcct ttggttttaa	3120
ggacatcatt agagccatta gaagaatagc cgtctgagcg gccgcctcga ctcagtactg	3180
acaataaaaa gattcttgtt ttcaagaact tgtcatttgt atagtttttt tatattgtag	3240
ttgttctatt ttaatcaaat gttagcgtga ttatatattt ttttcgctc gacatcatct	3300
gcccagatgc gaagttaagt gcgcagaaaag taatatcatg cgtcaatcgt atgtgaatgc	3360
tggtcgtctat actgctgtcg attcgatact aacgccgcca tccagtgtcg aaaacgagat	3420
ttaaattgca gttccgttta gacgcgttta aacttgttta attattatgg ggcaggcgag	3480
aggggggagga atgtatgtgt gtgaggcggg cgagacggag ccatccaggc caggtagaaa	3540
tagagaaagc cgaatgttag acaatatggc agcgtagtag agtaggtagg taggcaagta	3600
ctgctagcaa agaggagaag ggtaagctca ctcttcgcat tccacaccgt tagtgtgtca	3660
gtttgaacaa aaaaacaatc atcatacca ttgatggact gtggactggc ttttgaacg	3720
gcttttcgga ctgcgattat tcgtgaggaa tcaaggtagg aatttggca tatttacgga	3780
caacagtggg tgattcccat atggagtagg aaaacgagat catggtatcc tcagatatgt	3840
tgcggaattc tgttcaccgc aaagttcagg gtgctctggt gggtttcggt tggctttgc	3900
tttgcttctc cttgtcttg catgttaata atagcctagc ctgtgagccg aaacttaggg	3960
taggcttagt gtiggaacgt acatatgtat cacgttgact tggtttaacc aggcgacctg	4020
gtagccagcc ataccacac acgttttttg tatcttcagt atagttgtga aaagtgtagc	4080

ggaaatttgt ggiccagaca acagcgtctt tttctagtag tgcggtcggg tacttggttg 4140

acattgggtat ttggactttg ttgctacacc attcactact tgaagtcgag tgtgaagggt 4200

atgatttcta gtgggaaca cctttagtta cgtaatgttt tcattgctgt tttacttgag 4260

atttcgattg agaaaaaggt atttaatagc tcgaatcaat gtgagaacag agagaagatg 4320

ttcttccta actcgaaagg tatatgaggc ttgtgtttct taggagaatt attattcttt 4380

tgttatgttg cgctttagt ttgaaaaggt gaagagacaa aagctggaat tgtgagcgga 4440

taacaagctc aacacttgaa atttaggaaa gagcagaatt tggcaaaaaa aataaaaaaa 4500

aaataaacac acatactcat cgagaagctg taccgtcgac ggcgcgccga tgtccaactt 4560

acaagaccaa acccaacaaa tcgtcccttt tatcagatcc ttattaatgc ctactaccgg 4620

tcctgcttct attcctgatg acaccttgga aaaacacacc ttgagatccg aaacttcaac 4680

ctataacttg actgctgggtg acactgggtc tggtttaate gttttcttcc ctggttttcc 4740

tggttcaatt gtcgggtgcc actatacctt acaaggtaac ggtaactata agttcgatca 4800

aatgttggtg accgcccacaa atttgctgc ctctataac tatttagat tggtttctag 4860

atctttaacc gtcagatcat ccactttgcc tgggtggtgc tatgctttga acgttacaat 4920

caacgctgac acatttcaag gttccttgc cgaattgacc gatgtctcct ataacggttt 4980

aatgtccgct actgccaata tcaatgacaa aattggtaac gtcttagtcg gtgaagggtg 5040

tactgttttg agtttgccaa cctcttatga ctgggttat gtcagattgg gtgacctat 5100

tcctgtctac ggttttagacc caaaaatggg tgccacttgt gactctagt atagaccaag 5160

agtctatacc atcactgctg ccgatgacta tcaattctcc tccaatatc aacctggtgg 5220

gtgactatc acctgttct ctgccaacat cgacgtata acatctttgt ccgtcgggtg 5280

tgaattggta ttccaaacct ccgtccatgg tttagtattg ggtgccacca tctatttgat 5340

tggtttcgac ggtacaaccg tcattactag agccgttgct gccacaatg gtttaaccac 5400

tgggtactgac aacttgatgc cattcaactt ggtaatccct accaacgaaa tcacacaacc 5460

aatcacatcc atcaaatgg aaattgtcac ctccaaatcc ggtggtcaag ccggtgacca 5520

aatgtcatgg agtgctagag gttcattagc cgtaacatc cacggtggta actatcctgg 5580

tgcttgaga cctgtcactt tagtcgcta tgaaagagtt gctactggtt ccgtcgttac 5640

tgttgccggt gtttcaact tcgaattgat cccaaacca gaattggcca aaaacttgg 5700

taccgaatat ggiagattcg accctgggtc tatgaactat acaaaattga tcttatccga 5760

aagagacaga ttgggtatca aaactgtctg gcctactaga gaatataccg actttagaga 5820

atatttcattg gaagtcgccc acttaaatc cccattgaaa atcgccggtg cctttggttt 5880
 taaggacatc attagagcca ttagaagaat agccgtctga gcggccgcct cgactcagta 5940
 ctgacaataa aaagattctt gttttcaaga acttgctcatt tgtatagttt ttttatattg 6000
 tagttgttct attttaatca aatgtagcg tgatttatat ttttttcgc ctgcacatca 6060
 tctgcccaga tgcgaagtta agtgccgaga aagtaatatc atgcgtcaat cgtatgtgaa 6120
 tgctggctgc tatactgctg tcgattcgat actaacgccg ccatccagtg tcgaaaagca 6180
 gcgcattccc cgggtaccgc tctcgactag gtgattagcg gggggagatg aaaagtgtta 6240

 caacgtttgt ctgcaccct gtaaccttat actattgaac aaaccaacta aaacaaaaaa 6300
 aaaaactact atcaacaaaa cttcgagctt taaccaagt tatcaattgt ttaaatgac 6360
 tctaaatttc taataccctt attctttcta ttcttcttct tcttttaac tatatctact 6420
 tatattctat taaatatcac atttacgttt gtattacatg actactcttg tcaaccagga 6480
 cgtttagtgg ccataacctc aggttcagcc ggtcatagt cttccgaatc gtacattatt 6540
 catcgctcgg acctctccat tccgttattt tatccactct ttgttctct caattcaaga 6600
 attattcact ttaaccactt caacgaaatc aaataaaaact ccgtcgaatc agtacagtca 6660

 ggaatcacca ccctggacac tcccttccat tgtgtttgtg tttgtgttg tactttcatt 6720
 cattgtccct ttttgacaat ataaagggtta aacagagagc tatagtatat ctgggacaa 6780
 ttgtgattha gtcacttga aagtgttatt atttgatcca gtgtacacaa tatctcgga 6840
 ggacggcacc atggcttgcc ttattcctga gaatttaagg aaccccaaaa aggttcacga 6900
 aaatagattg cctactaggg cttactacta tgatcaggat attttcgaat ctctcaatgg 6960
 gccttgggct tttgcgttgt ttgatgcacc tcttgacgct ccggatgcta agaatttaga 7020
 ctgggaaacg gcaaagaaat ggagcaccat ttctgtgcca tccattggg aacttcagga 7080

 agactggaag tacggtaaac caatttacac gaacgtacag taccctatcc caatcgacat 7140
 cccaaatcct cccactgtaa atcctactgg tgtttatgct agaacttttg aattagattc 7200
 gaaatcgatt gagtcgttcg agcacagatt gagatttgag ggtgtggaca attgttacga 7260
 gctttatgtt aatggtcaat atgtgggttt caataagggg tcccgtaacg gggctgaatt 7320
 tgatatcaa aaglacgttt ctgagggcga aaacttagtg gtcgtcaagg tttcaagtg 7380
 gtccgattcc acttatatcg aggaccaaga tcaatggtgg ctctctggta ttacagaga 7440
 cgtttcttta ctaaaattgc ctaagaaggc ccatattgaa gacgttaggg tcactacaac 7500

 ttttgggac tctcagtatc aggatgcaga gctttctgtg aaagtgtatg tccagggttc 7560
 ttcttatgat cacatcaatt tcacacttta cgaacctgaa gatggatcta aagtttacga 7620
 tgcaagctct ttgtgaacg aggagaatgg gaacacgact tttcaacta aagaatttat 7680

ttcctttctcc accaaaaaga acgaagaaac agctttcaag atcaacgtca aggccccaga	7740
acattggacc gcagaaaatc ctactttgta caagtaccag ttggatttaa ttggatctga	7800
tggcagtgtg attcaatcta ttaagcacca tgttggtttc agacaagtgg agttgaagga	7860
cggtaacatt acigttaatg gcaaagacat tctctttaga ggtgtcaaca gacatgatca	7920
ccatccaagg ttcggtagag ctgtgccatt agattttgtt gttagggact tgattcta	7980
gaagaagttt aacatcaatg ctgttcgtaa ctcgcattat ccaaaccatc ctaaggtgta	8040
tgacctcttc gataagctgg gcttctgggt cattgacgag gcagatcttg aaactcatgg	8100
tgttcaagag ccatttaate gtcatacgaa ctggaggct gaatatccag atactaaaa	8160
taaactctac gatgttaatg cccattactt atcagataat ccagagtacg aggtcgcgta	8220
cttagacaga gcttccaac ttgtcctaag agatgtcaat catccttcga ttattatctg	8280
gtccttgggt aacgaagctt gttatggcag aaaccacaaa gccatgtaca agttaattaa	8340
acaattggat cctaccagac ttgtgcatta tgagggtgac ttgaacgctt tgagtgcaga	8400
tatctttagt ttcatgtacc caacatttga aattatggaa aggtggagga agaaccacac	8460
tgatgaaaat ggtaagtttg aaaagccttt gatcttgtgt gactacggcc atgcaatggg	8520
taacggctct ggctcttga aagaatatca agagtgttc tacaaggaga agttttacca	8580
aggtggcttt atctgggaat gggcaaatca cggatattgaa ttcgaagatg ttagtactgc	8640
agatggtaag ttgcataaag cttatgctta tgggtgtgac tttaaaggaag aggttcatga	8700
cggagtgttc atcatggatg gtttgtgtaa cagtgagcat aatcctactc cgggccttgt	8760
agagtataag aaggttatg aaccggttca tattaaaatt gcgcacggat ctgtaacaat	8820
cacaaataag cagcacttca ttacgacaga ccacttattg tttatcgaca aggacacggg	8880
aaagacaatc gacgttccat ctttaaagcc agaagaatct gttactattc cttctgatac	8940
aacttatgtt gttgccgtgt tgaaagatga tgcgtgtgtt ctaaaggcag gtcataaat	9000
tgcctggggc caagctgaac ttccattgaa ggtaccgat tttgttacag agacagcaga	9060
aaaagctgcg aagatcaacg acggtaaacg ttatgtctca gttgaatcca gtggattgca	9120
ttttatcttg gacaaattgt tgggtaaaat tgaaagccta aaggtcaagg gtaaggaaat	9180
ttccagcaag tttgagggtt cttcaatcac tttctggaga cctccaacga ataagatga	9240
acctagggac tttagaact ggaagaagta caatattgat ttaatgaagc aaaacatcca	9300
tggagtgagt gtcgaaaaag gttctaattg ttctctagct gtagtcacgg ttaactctcg	9360
actagtgggc ccggtaccca gcttttgttc ctttagtga gggtaattc cgagcttggc	9420
gtaatcatgg tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat ccgtcacaa ttccacacaa	9480
catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctgggtgcc taatgagtga gctaactcac	9540

attaattgcg ttgcgctcac tgcccgtttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca	9600
ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc	9660
ctcgctcact gactcgtgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggat cagctcactc	9720
aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc	9780
aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag	9840
gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgtca agtcagaggt ggcgaaaccc	9900
gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccttggaagc tccctcgtgc gctctcctgt	9960
tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct	10020
ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg	10080
ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccgga ccgctgcgcc ttatccgta actatcgtct	10140
tgagtccaac ccgtaagac acgacttacc gccactggca gcagccactg gtaacaggat	10200
tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtcttg aagtgggtgc ctaactacgg	10260
ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgtctcgtc aagccagtta ccttcggaaa	10320
aagagttggt agctcttgat ccggcaaaaca aaccaccgct ggtagcgggt gttttttgt	10380
ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc	10440
tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctacgctaa gggattttgg tcatgagatt	10500
atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta	10560
aagtatatat gagtaaacctt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat	10620
ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg ttagataaac	10680
tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg	10740
ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag	10800
tggtcctgca actttatccg cctccateca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt	10860
aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt	10920
gtcacgctcg tcgtttggta tggttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt	10980
tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt	11040
cagaagtaag ttggccgcag tggtatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct	11100
tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt	11160
ctgagaatag tgiatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac	11220
cgcgccacat agcagaactt taaaagtgtc catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa	11280

actctcaagg atcttaccgc tggtgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa 11340
ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca 11400
aaatgccgca aaaaaggga taaggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttct 11460
ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga 11520
atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc 11580
tg 11582

<210> 22

<211> 29

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Primer

<400> 22

gacatcactg tctcttcccc ttaatgatc 29

<210> 23

<211> 29

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Primer

<400> 23

tcagcaagca tcaataatcc ccttggttc 29

<210> 24

<211> 28

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Primer

<400> 24

gaaagaaaga cgttggtctc tacgcttg 28

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Primer

<400> 25

agattataag ttctggggc ttaccac

29