



등록특허 10-2704217



(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

전체 청구항 수 : 총 26 항

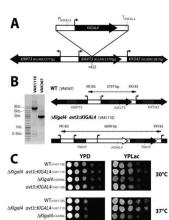
심사관 : 김정희

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

### (57) 요 약

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 계놈내로 표적 클로닝하기 위한 케이. 락티스 균주를 제공하며, 상기 케이. 락티스 균주는 *KILAC4* 유전자좌에 대한 대안으로서 또는 상기에 더하여, *KIURA3-20* 유전자좌(*KLLAOE22771g*) 및/또는 *KIMET5-1* 유전자좌(*KLLAOB03938g*) 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.

### 대 표 도



(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

**케바우어 팬디**

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 계놈 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 K1Ga14에 대한 결합 부위의 수가 다양하며, K1Ga14-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 K1Ga14-결합 부위가 존재하는 것을 특징으로 하는 변형된 *LAC4-12* 프로모터로 이루어진 균에서 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,

개놈 *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 *KLLAOE13795g*(*Klavr3::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 *KI1ac4*, *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 *KIMet5-1* 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 계놈 내로 표적 클로닝하기 위한 케이. 락티스 균주를 제공하며, 상기 케이. 락티스 균주는 *KILAC4* 유전자좌에 대한 대안으로서 또는 이에 더하여, *KIURA3-20* 유전자좌(*KLLAOE22771g*) 및/또는 *KIMET5-1* 유전자좌(*KLLAOB03938g*)상에 외부 항원을 위한 통합 발현 카세트를 가지는 것을 특징으로 한다. 본 발명은 더욱 또한 통합 발현 백터 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 전단법에도 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(IBD)은 비르나비리다에(*Birnaviridae*) 과의 이중-가닥, 분절된 RNA 게놈을 갖는 무-외막 바이러스인 전염성 F낭병 바이러스(IBDV)에 의해 촉발된다. IBD에 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 IBD 바이러스에 대해 보호를 제공하지만, 매우 독성인 IBD 바이러스 균주(vvIBDV)에 대해서는 그렇지 않다는 것이다. 최근까지, 매우 독성인, 약독화된 바이러스(중간 고온 균주)는 vvIBDV에 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 vvIBDV 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 오쏘믹소비리다에(*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 이종 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 최근에야 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 유효도이다. 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 숙련가에게 공지되어 있다. 일련의 미국 특히 출원 및 특히, 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 종 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 숙련가에게 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, 이종 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 다시 증가시키거나 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 이종 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 백터 및 케이. 락티스 효모의 신규의 유전자 변형된 변종을 함유하고 단백질 항원의 특정한 성질에 최적화된 백신 균주의 생산을 허용하는 모듈 시스템을 제공함으로써 성취되었다. 백터들간의 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(*KLLAOE22771g*) 및/또는 *KIMET5-1* 유전자좌(*KLLAOB03938g*)에 외부 항원을 위한 통합 발현 카세트를 가지는 것을 특징으로 한다. 상기 케이. 락티스 균주가 *KILAC4* 유전자좌에 더하여, *KIURA3-20* 유전자좌(*KLLAOE22771g*) 및/또는 *KIMET5-1* 유전자좌(*KLLAOB03938g*)에 외부 항원을 위한 통합 발현 카세트를 가질 때 특히 바람직하다. 상기 케이. 락티스 균주가 *KILAC4* 유전자좌에 더

하여, *KIURA3-20* 유전자좌(*KLLAOE22771g*) 및 *KIMET5-1* 유전자좌(*KLLAOB03938g*)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 웨티드, 폴리웨티드 및 단백질을 의미한다. 외부 단백질은 임의의 종류의 병원체 또는 종양으로부터 기원할 수 있으며, 상기에 대해 단독으로 보호 면역 반응을 유도할 수 있는, 바람직하게는 보호 체액 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 체액 면역 반응을 유도할 수 있는 항원이 특성화되었다.

[0027] 예를 들어, 이들은 하기와 같다:

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

세균으로부터 기원하는 외부 단백질

[0034] 마이코박테리움 투베르콜로시스(*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 웨티다제, 외독소 SPEA 및 SPEC, 피브로넥틴 결합 단백질

[0037] 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*): 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*)(노워크, 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; 혼파시바이러스 속 HCV): E1, E2, E<sup>RNS</sup>(페스티), C, NS3, NS4, NS5
- [0055] 혼파드나비리다에(*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] 혼르페스비리다에(*Herpesviridae*)(EBV, HSV2): gp350/220 (EBV), gB2, gD2 (HSV)
- [0060] 코로나비리다에(*Coronaviridae*)(SARS): CoV, N, M, S
- [0061] 오쏘믹소비리다에(*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 *KIURA3* 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 빼르고 효율적으로 연결시키고 상기 3개의 유전자좌 중 하나에 상기 발현 카세트를 한 단계로 도입시키기 위해 상술한 백터 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 *KIURA3-20* 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 직결 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 *KIURA3-20* 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 *KIURA3-20* 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 *KIURA3-20* 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 카페를 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 카페가 상기 균주 중에 존재하게 한다. 이는 복수 카페의 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) 카페를 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, *KIGAL4*를 암호화하는 플라스미드를 세포에 일시적으로 및 다수의, 조절되지 않은 카페 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 카페가, *KLLAOE13795g*(*Klavr3::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 카페를 추가로 함유하며, 상기에 상기 외부 항원 IBDV-VP2의 암호화 핵산 서열이 마찬가지로 존재한다. 상기 균주는 *KIGAL4* 유전자의 추가적인 이소성 카페가 없는 균주에 비해 상기 외부 항원 IBDV-VP2의 증가된 발현을 나타낸다.

[0071] 미생물에서 이종 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) 방해를 받는다. 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 실시에 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 K1Ga14에 대한 결합 부위의 수("상류 활성화 서열" 1, 2 및 4, 5)가 다양하고 1, 2, 3 또는 4개의 K1Ga14-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 *K11ac4*, *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 브라운슈바이크 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 *KIpURA3*(서열번호 3) 및 *KIpMET5*(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 계놈내에 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 *KIpURA3*에서 *NotI* 및 *BoxI*(또는 *MluI*)를 통해, *KIpMET5*에서 *NotI* 및 *Ecl136II*(또는 *SacI*)를 통해 교체될 수 있다. 대안의 발현 카세트를 *KIpURA3* 중의 제한 부위 *SmaI* 및 *BoxI*(또는 *MluI*) 사이, 및 *KIpMET5* 중의 *SmaI* 및 *Ecl136II*(또는 *SacI*) 사이에 클로닝시킨다. 상기 서술된 제한 효소를 사용하여, 상기 발현 카세트를 또한 *KIpMET5* 및 *KIpURA3* 벡터 사이에서 교환하거나 또는 추가적인 발현 카세트를 도입시킨다. *KIp3* 및 *KIp3-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, *KIpMET5-P<sub>LAC4-12</sub>-Et*, *KIpMET5-P<sub>LAC4-12-LR2</sub>-Et*, *KIpMET5-P<sub>LAC4</sub>-Et*, *KIpMET5-*

$P_{LAC4-LR2}$  및  $KI\text{pURA3-P}_{LAC4-12}\text{-Et}$ ,  $KI\text{pURA3-P}_{LAC4-12-LR2}\text{-Et}$ ,  $KI\text{pURA3-P}_{LAC4}\text{-Et}$  및  $KI\text{pURA3-P}_{LAC4-LR2}$ (서열번호 5, 6, 7 또는 8과 함께 서열번호 3 또는 서열번호 4) 중에서 선택된 통합 발현 백터를 제공한다.

[0090] 백터  $KI\text{pURA3-P}_{LAC4-12}\text{-Et}$ ,  $KI\text{pURA3-P}_{LAC4-12-LR2}\text{-Et}$ ,  $KI\text{pURA3-P}_{LAC4}\text{-Et}$  및  $KI\text{pURA3-P}_{LAC4-LR2}$ 는 백터  $KI\text{pURA3-Et}$ 의 변종이며, 각각의 경우에 상기 백터내로 Etx.B-HA 단백질의 암호화 핵산 서열이 삽입된다. 백터  $KI\text{pURA3-P}_{LAC4-12}\text{-Et}$ ,  $KI\text{pURA3-P}_{LAC4-12-LR2}\text{-Et}$ ,  $KI\text{pURA3-P}_{LAC4}\text{-Et}$  및  $KI\text{pURA3-P}_{LAC4-LR2}$ 는 백터  $KI\text{pURA3-Et}$ 에 비해 프로모터에 차이가 있다.

[0091] 백터  $KI\text{pMET5-P}_{LAC4-12}\text{-Et}$ ,  $KI\text{pMET5-P}_{LAC4-12-LR2}\text{-Et}$ ,  $KI\text{pMET5-P}_{LAC4}\text{-Et}$ ,  $KI\text{pMET5-P}_{LAC4-LR2}$ 는 백터  $KI\text{pMET5}$ 의 변종이며, 각각의 경우에 상기 백터내로 Etx.B-HA 단백질의 암호화 핵산 서열이 삽입된다. 백터  $KI\text{pMET5-P}_{LAC4-12}\text{-Et}$ ,  $KI\text{pMET5-P}_{LAC4-12-LR2}\text{-Et}$ ,  $KI\text{pMET5-P}_{LAC4}\text{-Et}$ ,  $KI\text{pMET5-P}_{LAC4-LR2}$ 는 백터  $KI\text{pMET5}$ 에 비해 프로모터에 차이가 있다.

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

(i)  $KI\text{pURA3}$  또는  $KI\text{pMET5}$  백터내에 목적하는 항원의 암호화 핵산 서열을 삽입하는 단계,

(ii) 변형되고 앞서 효소에 의해 절단된 백터 구조물(들)로 케이. 락티스 배양물을 형질전환시키는 단계,

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

(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. 상기와 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 재조합 케이. 락티스 효모의 용도를 제공한다.

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

a) 본 발명에 따른 재조합 효모를 배양 및 증식시키고,

b) 상기 효모를 수확 및 불활성화시키고,

c) 상기 재조합 효모를 한정된 면역화 설계에 따라 투여하고,

d) 상기 형성된 항체의 역ガ를 측정하고, 및/또는

e) 면역화를 검출한다.

[0108] 본 발명에 따른 재조합 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/접막, 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°C에서 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 촉발시키기에 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.

### 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 융통성있는 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 게놈 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 카페 및/또는 KIGAL4 농도의 증가의 결과로서 성취되는 재조합 항원 생산의 증가에 의해 개선된다.

[0121] g. 또한, 투여되는 백신 용량이, 외부 유전자 카페 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 혼합외에는, 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* 카페를 갖는 새로 생성된 케이. 락티스 배경 균주의 특성화를 도시한다. 식별된 부위에 두 번째 이소성 *KIGAL4* 카페의 존재를 점검하고 효모 증식에 대한 통합 효과를 분석하였다. A: 이소성 *KIGAL4* 카페의 통합 부위의 다이어그램. 통합 부위를 나타내고 유전자 명칭을 제공한다. B: 추가로 통합된 이소성 *KIGAL4* 유전자가 있고(VAK1110) 없는(VAK367) 효모 균주의 *KIAVT3* 유전자좌의, 프라이머 VK183(5'-GAGCCCCACCACCTGCTCCTG-3')(서열번호 9) 및 VK184(5'-CTGATGTATTGCGCTCCTACTAAC-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°C 및 37°C에서 수행하였다. 고유의 유전자좌에 *KIGAL4* 카페(VAK1139), 이소성 유전자좌에, 및 고유의 유전자좌에 결실된 *KIGAL4*(VAK1110)를 갖는, *KIGAL4* 카페가 없는( $\Delta KIGAL4$ ; VAK964) 또는 2개의 *KIGAL4* 카페를 갖는(VAK1168) 효모 균주의 증식을 비교하였다. 입증된 것은 추가의 *KIGAL4* 유전자의 한정된 통합이 단지 미미한 증식 결함을 유도한다는 것이다: 상기 결함은 오직 37°C 및 유도 조건하에서만 볼 수 있다. 보다 분명한 것은 *KIGAL4*의 완전한 결실의 경우에 증식 결함이 있다는 것이다.

도 2는 추가적인 이소성 *KIGAL4* 카페를 갖는 IBDV-VP2-생산 케이. 락티스 균주의 단백질에 대한 웨스턴 블럿 분석을 도시한다. *LAC4-12* 프로모터-의존적인 재조합 단백질 생산에 대한 추가적인 *KIGAL4* 카페의 효과를 웨스턴 블럿팅에 의해 분석하였다. 사용된 시험 균주는 IBDV-VP2 발현 카세트를 갖는 효모 균주였으며, 상기 효모 균주를 다른 IBDV-VP2 효모 균주와 비교하였다. 이소성 *KIGAL4* 카페 및 직렬 IBDV-VP2 발현 카세트(하기 참조)의 존재(+) 또는 부재(-)를 위에 나타낸다. 균주 VAK911에서, 이소성 카페를 *Bst*EII를 사용하여 플라스미드 pLI-1의 선형화에 의해 도입시켰으며(Krijger *et al.* 2012 and WO 2013107436), 균주 VAK1130에서, 이소성 *KIGAL4* 카페를 *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  $\mu$ g의 단백질 추출물을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 면역블럿팅을 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 *K1Ga14*-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 블럿팅. VAK1111은 외부 유전자가 없는 야생형 대조용으로서 사용되었다. 각각의 효모 균주의 경우, 50  $\mu$ g의 단백질 추출물을 12% SDS 젤상에 로딩하였다. 면역블럿팅을 항-IBDV 토끼 혈청(1:5000) 및 염소로부터의 HRP-접합된 항-토끼 항체(1:10 000)를 사용하여 수행하였다. 로딩 대조용 *K1Nop1*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°C 및 37°C에서 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°C에서 특히 분명하다.

도 4는 케이. 락티스 계놈의 상이한 유전자좌내로의 단백질 발현 카세트의 통합에 사용될 수 있는 *K1p* 벡터를 도시한다. *LAC4* 유전자좌(*K1p3* 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 *K1p* 벡터의 다이어그램. B & C: 여기에서 새롭게 기재되는 *K1pURA3*(B) 및 *K1pMET5*(C) 벡터 중의 발현 카세트 및 인접 단부. 상이한 DNA 서열 분절 및 관련된 제한 부위를 나타낸다. GOI: 외부 유전자(관심 유전자). D: *K1p* 벡터(A, B & C)의 도움으로 구성된 효모 균주에서의 외부 단백질 발현의 웨스턴 블럿팅 분석. 여기에서, 외부 유전자는 Etx.B-HA이다. 효모 '하우스-키핑' *K1Nop1* 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  $\mu$ g의 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE상에 로딩하였다. 면역블럿팅을 단클론 마우스 항-HA(1:5000) 및 항-*K1Nop1*(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 이종 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 블러팅 분석. 사용된 대조용은 계놈 중의 *LAC4*(VAK899) 또는 *KIURA3* 유전자좌(VAK1235)에 Etx.B-HA와 함께 단지 발현 카세트만, 또는 *LAC4* 유전자좌(VAK1171)에 단지 직렬 IBDV-VP2 발현 카세트만을 갖는 효모 균주였다. 상기 효모 균주를YPD에서 예비 배양후에 6h 동안 YPLac에서 배양하였다. 각각의 효모 균주에 대해서, 30  $\mu$ g의 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE상에 로딩하였다. 면역블릿 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 K1Cat8 및 K1Sip4, 비유도 조건하의 전사 활성제의 결합 영역; U1, U2, U4, U5: 전사 활성제 K1Gal4에 대한 결합 영역(상류 활성화 서열). B: KlPURA3 벡터(A)를 사용하여 생성된 효모 균주 중 *LAC4-12* 프로모터 변종의 특성화를 위한 웨스턴 블러팅 분석. 효모 균주를YPD에서 예비 배양 후에 4h 동안 YPLac에서 배양하였다. 각각의 효모 균주에 대해서, 30  $\mu$ g의 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE상에 로딩하였다. 면역블릿팅을 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 블러팅 분석. 상기 효모 균주들을YPD에서 예비 배양 후에 3h 또는 6h 동안 YPLac에서 배양하였다. 각각의 효모 균주의 경우에 60  $\mu$ g의 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE 상에 로딩하였다. 면역블릿팅을 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 균주들을YPD에서 예비 배양 후에 8h 동안 YPLac에서 배양하였다. 면역블릿팅을 (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 블러팅 분석. 효모 균주를 YPD에서 예비 배양 후에 8h 동안 YPLac에서 배양하였다. 효모 균주당 40  $\mu$ g의 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE 상에 로딩하였다. 면역블러팅을 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 블러팅 분석. 상기 효모 균주들을 YPD에서 예비 배양 후에 15h 동안 YPLac에서 배양하였다. 각각의 효모 균주에 대해서, 10  $\mu$ g의 단백질 추출물을 12% SDS-PAGE 상에 로딩하였으며, 달리는 상기 (A)에서와 같이 면역블러팅을 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 그룹 당 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, M 1)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 봉괴시키고, 용해성 단백질 분획(LF) 및 불용성 단백질 분획(P, 펠릿)을 면역블러팅에서 검사하였다. 사용된 1차 항체는  $\alpha$ -HA1 또는  $\alpha$ -M1이었고 사용된 2차 항체는  $\alpha$ -마우스-IR-Dye800CW이었다. 적외선 영상화 시스템(LI-COR Biosciences)을 통해 신호를 생성시켰다. (B,C) 효모 균주를 진탕 플라스크에서 YPD에서 예비배양시키고 후속적으로 24h의 시간에 걸쳐 YPL에서 유도하였다. 명시된 시점에서, 효모 배양물의 광학 밀도를 측정하고 30 OD 단위를 수확하였다. (B) VAK1283의 펠릿을 유리 비드를 사용하여 봉괴시키고 면역블러팅에서 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. 폰소 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 종 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°C에서 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 MLD<sub>50</sub>의 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 역가<sub>50</sub>: 무-바이러스 대조용에 비해 플라크의 수를 50%까지 감소시키는 혈청 희석. 상응하는 혈청 희석의  $\log_2$ 를 명시한다. 로그 플롯으로 인해, 값:  $\log_2(2) = 1$ 은 검출 가능한 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 MLD<sub>50</sub>의 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

[0124]

#### 예시적인 실시태양

[0125]

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

[0126]

선택 마커가 없는 두 번째 *KIGAL4* 유전자 카피를 상이한 유전자좌에(이소성으로) 삽입하였다. 서열분석 (*Klavl3::KIGAL4-1*, 서열번호 1)에 의해 *Klavl3* 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* 봉괴를 락토스 증식에 대한 선택하에 도입시켜(이는 상기 봉괴를 1 단계로 가능하게 한다), 마커 없이 Klp 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.

[0127]

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

[0128]

하나의 예시적인 실시태양에서, IBDV-oVP2<sub>T2S</sub>(Arnold et al. (2012)) 유전자를 균주 VAK1123(생산된 균주 VAK1130)의 *LAC4* 유전자좌내에 삽입하였다. 단지 하나의 *KIGAL4* 카피만을 갖는 달리 동질의 균주에 비해 IBDV-VP2의 증가된 생성을 확립시킬 수 있었다. 비교로서, 단지 하나의 *KIGAL4* 카피만을 갖지만 2개의 *CDS VP2<sub>IBDV</sub>* 카피(하기 참조)을 갖는 균주 VAK1118을 추가로 도시한다(도 2).

[0129]

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

[0130]

미생물에서 이종 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 증식률의 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* 봉괴와 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 K1pURA3-ET 및 K1pMET5-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*(*KLLAOE22771g*) 및 *KIMET5*(*KLLAOB03938g*)(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] 이를 돌연변이된 대립유전자는, K1p3/K1p3-MCS(Krijger *et al.* (2012))에 의해 이미 발생한 통합 부위 *LAC4* 외에 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*(*KLLAOE22771g*) 및/또는 *KIMET5*(*KLLAOB03938g*) 유전자좌에 발현 카세트(유도성 *LAC4-12* 프로모터를 갖는다)의 표적화된 통합을 위한 벡터 K1pURA3 및 K1pMET5.

[0138] 통합 발현 벡터 K1pURA3(서열번호 3) 및 K1pMET5(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 K1pMET5 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 *K1AIM18* 유전자를 갖는 *K1AIM18* 프로모터가 인접해 있다.

[0140] 상기 K1pURA3 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 *KLLAOE22749g* 및 하류에, 하류 *K1URA3* 단편을 갖는 *K1URA3* 프로모터가 인접해 있다(도 4B, C).

[0141] 각각의 경우에, 항원-암호화 서열을 *Ascl* 및 *Not1* 제한 부위를 통해 프로모터와 종결자 사이에 클로닝한다. 상기 생성된 플라스미드의 *Eco91I* 또는 *Kpn1* 제한에 의해, 전체 발현 카세트를 K1pURA3 벡터 주체로부터 분리시키고, 생성된 플라스미드의 *HindIII* 또는 *BoxI* 제한에 의해 전체 발현 카세트를 K1pMET5 벡터 주체로부터 분리시

키며, 제한 물질을 *Klura3-30* 및/또는 *Klmet5-1* 대립유전자를 갖는 케이. 락토스 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 클로니 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 웃하는 유전자들의 기능성이 상기 삽입에 의해 손상된다는 표시는 없었다.

[0142] 프라이머:

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

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

[0145] VK211: 5'-GATTCGTAACCTATTGTTCATGAATG-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)<sub>3</sub> 에피토프(Etx.B-HA)를 벡터 시스템의 평가를 위한 시험 단백질로서 사용하였다. 암호화 서열을 벡터 *K1pMET5*, *K1pURA3* 및 *K1p3-MCS*내에 클로닝하고 계놈 유전자좌 *KIMET5*(VAK1251), *KIURA3*(VAK1235) 및 *LAC4*(VAK899)에 통합시켰다(도 4D). 웨스턴 블로팅에 의해 나타낸 바와 같이, 3개의 모든 균주 중의 Etx.B-HA 단백질의 농도는 매우 유사하다(도 4D). 따라서, 계놈내 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 이종 단백질의 생성 가능성을, *KIURA3* 유전자좌에 Etx.B-HA 발현 카세트, 및 *LAC4* 유전자좌에 직렬로서 존재하는 2개의 VP2<sub>IBDV</sub> 카페를 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<sub>IBDV</sub>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 비화학량론적 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; Gödecke 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-PL4LR2*를 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 블로팅을 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 카세트를 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  $lac4::URA3$  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  $SmaI$ ,  $MluI$  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 결찰시킬 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 결찰 믹스 중에 놓축된다. 이들을 형질전환시키고 마커에 대한 선택하에서 방향이 없는 방식으로 통합시킨다.

[0157] 프라이머:

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

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

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

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

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

[0163] VK35: 5'-AAAAGCTGGGTACCGGGCCCCTAGTCGAGAGTTAACCGTGACTACAGCTA-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<sub>T2S</sub>, 서열번호 21)는  $Klp3$ -MCS-oVP2<sub>T2S</sub>(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<sub>T2S</sub>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 블로팅에 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 안정성이다: 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*으로부터 *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 상용하는 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'-GACATCACTGTCTTCCCCCTTAATGATC-3'(서열번호 22)

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

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

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

#### 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.

#### 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* 카페 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).

#### 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 접근법에서 조차 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 계놈내에 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-증화 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

효모균주 (VAK)	백신접종 (a)					조직 병리학적 낭병변 평가					bu/bod 지수 (c)	
	백신 용량 VP2 양	항원보강제	0	1	2	3	4	노출	비노출	0 환율 (%) (d)	1 사율 (%) (e)	
367	없음	IFA	-	-	-	1	7	2.80 ± 1.32	5.36 ± 0.65 4.40 ±	6/10 (60) 4/10 (40)		
411 ± 0.25												
1127	μg	IFA	8	-	-	1	-	0.76	4.89 ± 0.63 4.08 ±	0/10 10/10	0/10	
	PBS	IFA	-	-	-	-	10	1.91	4.92 ± 0.94 (100)		8/10 (80)	

[표 2]

백신접종된 SPF 치킨에서 노출 방어에 대한 표시

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

[표 3] 백신접종된 SPF 치킨에서 노출 병어에 대한 표시

효모 균주 (VAK)	백신 접종 (a) 백신 용량(ug) VP2 양 항원보강제	조직 병리학적 낭병변 평가				bu/bod 지수 (c)		이환율 (%) (d)	치사율 (%) (e)	
		0	1	2	3	4	노출	비노출		
PBS	없음	MF59	-	-	-	9	3.73 ± 1.92	4.77 ± 1.02	9/9 (100)	6/9 (66)
VAK367	없음	MF59	-	-	-	10	4.09 ± 1.58	3.60 ± 0.89	10/10 (100)	9/10 (90)
VAK1171	35 ± 4.2 $\mu$ g	IFA	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 VAK1171의 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 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).

[0187]

(c) 낭 대 체중 지수(bu/bod)의 평균값을 산: (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 팔호안에 나타낸다.

[0189]

(e) 치사율은 전체 그룹 중 치킨수 당 죽은 치킨의 수로서 나타낸다. 죽은 치킨의 백분율을 팔호안에 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. 균주 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 팔호안에 나타낸다.

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

#### 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. 균주 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 팔호안에 나타낸다.

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

#### 서열

[0203] 특히 출원은 설명의 부분으로서 하기의 서열을 함유한다:

서열번호	명칭
1	케이. 락티스 <i>avr3::LAC9</i>
2	<i>PLACd-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>PLACd-12-LR2</i>
7	<i>LAC4-12</i> 프로모터 변종 <i>PLacd</i>
8	<i>LAC4-12</i> 프로모터 변종 <i>PLacd-LR2</i>
9	프라이머 서열 VK183
10	프라이머 서열 VK184
11	프라이머 서열 MAB6
12	프라이머 서열 WK71
13	프라이머 서열 WK211
14	<i>PLacd-12</i> 로 부터의 BCR
15	프라이머 서열 WK30
16	프라이머 서열 WK31
17	프라이머 서열 WK32
18	프라이머 서열 WK33
19	프라이머 서열 WK34
20	프라이머 서열 WK35
21	<i>K/p3-직렬~WP2T2S</i>
22	프라이머 서열 WK67
23	프라이머 서열 WK69
24	프라이머 서열 WK74
25	프라이머 서열 WK75

[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.
- Eterradossi, N.; Toquin, D.; Abbassi, H.; Rivallan, G.; Cotte, J. & Guillet, 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  $\beta$ -galactosidase 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.; Kölner, 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.

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

Kirchenbaum, G. A. & Ross, T. M.

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

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

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

Krammer, F. & Palese, P.

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

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

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

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

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.

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

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

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

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.

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

Ridpath, J. F.

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

[0207]

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

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

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

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.

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

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

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

WHO, Influenza (Seasonal), 2016.

WHO, Biologicals, Influenza, 2017.

[0208]

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

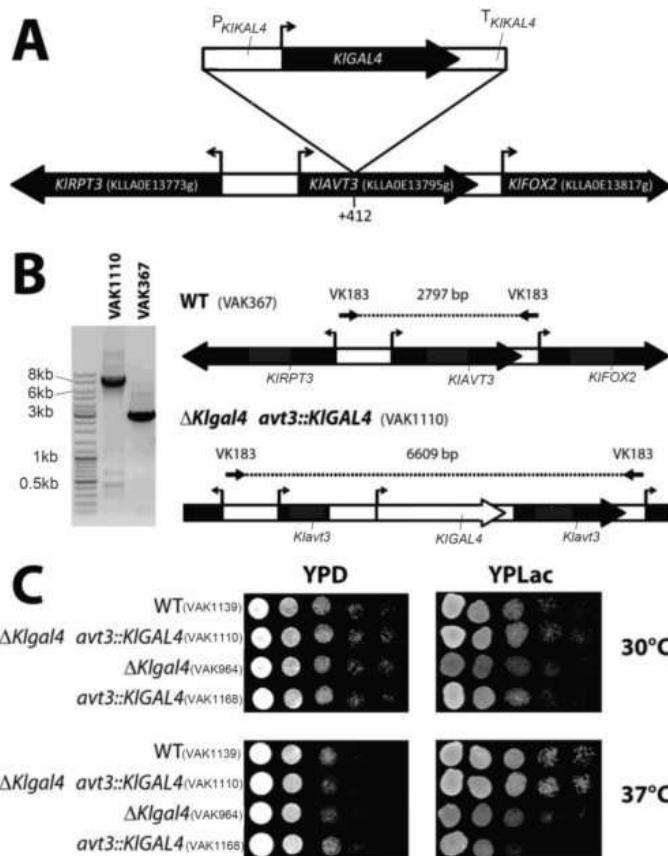
기탁기관명 : 독일생물자원센터 (DSMZ)

수탁번호 : DSM32706

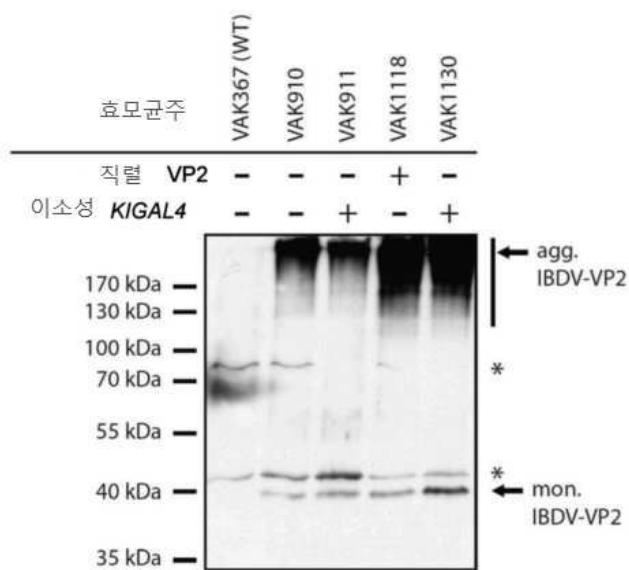
수탁일자 : 20171201

## 도면

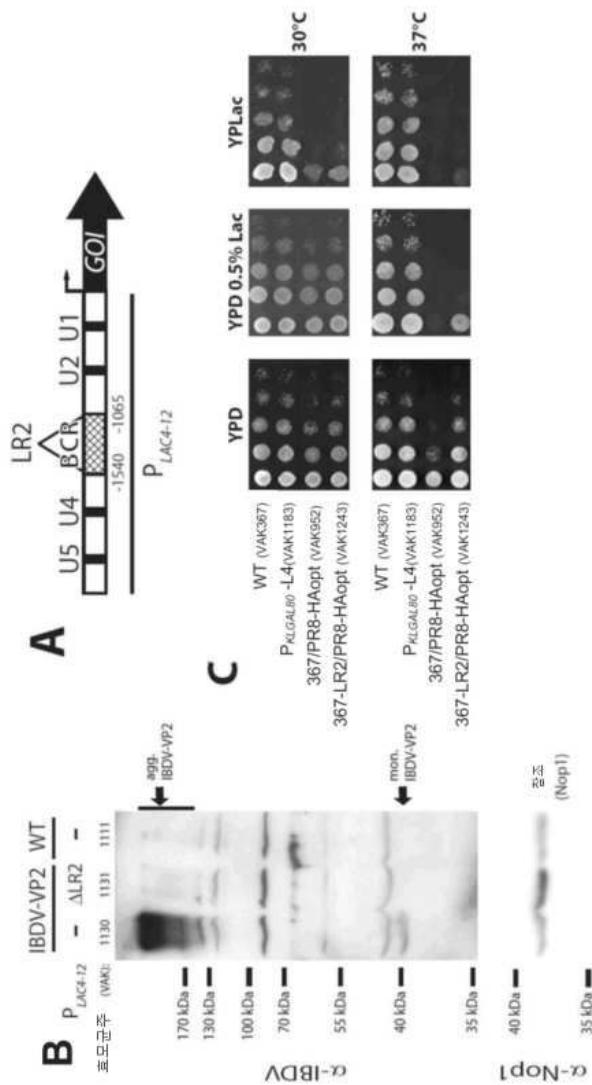
## 도면1



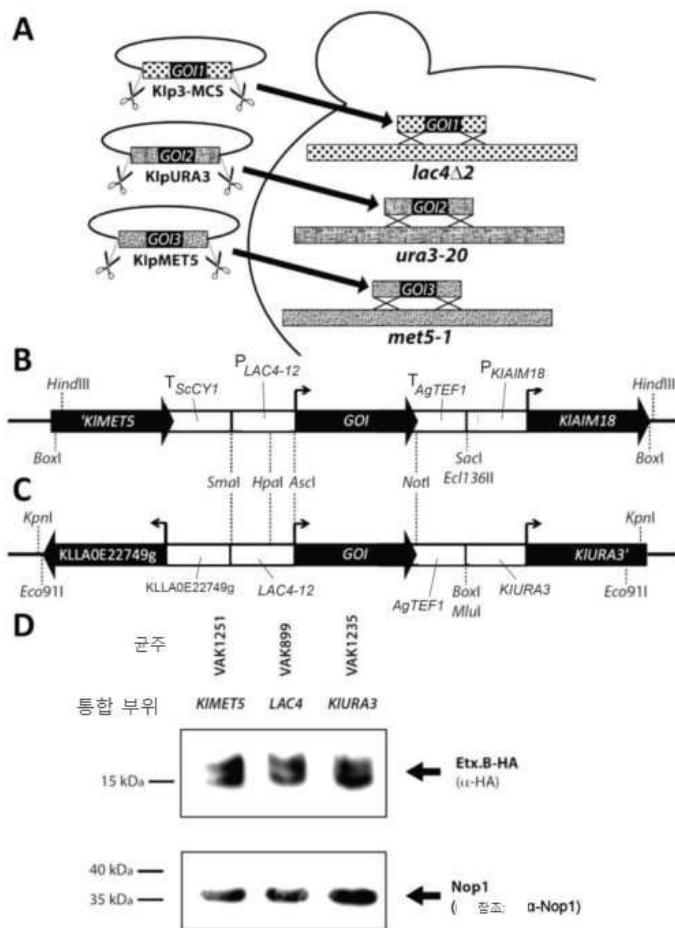
## 도면2



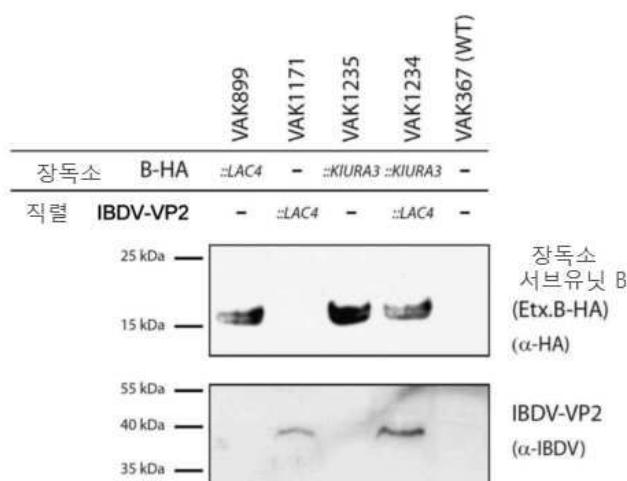
## 도면3



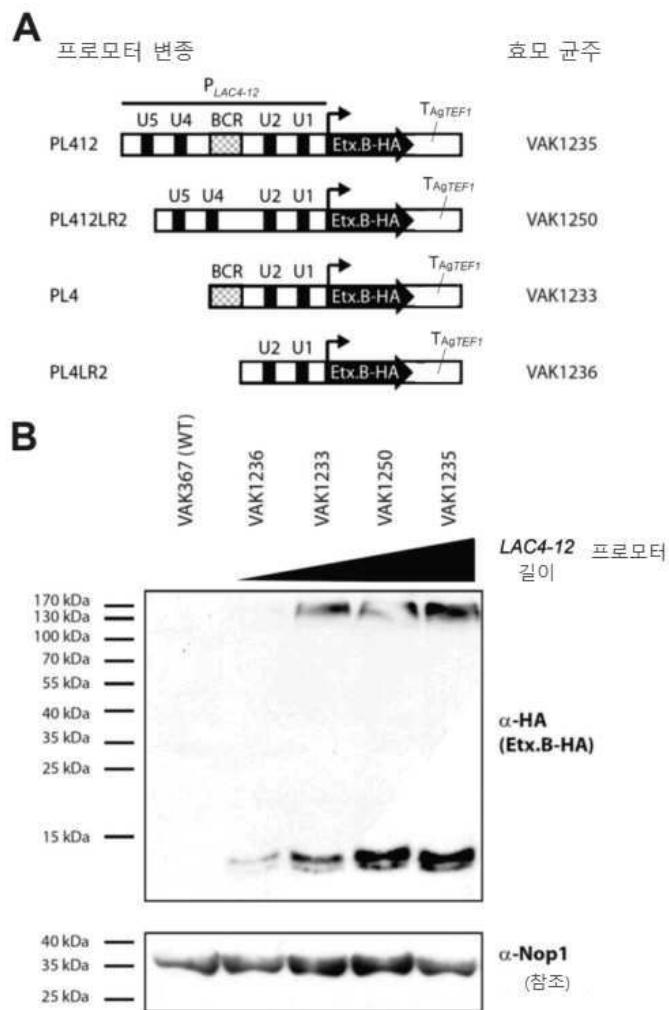
## 도면4



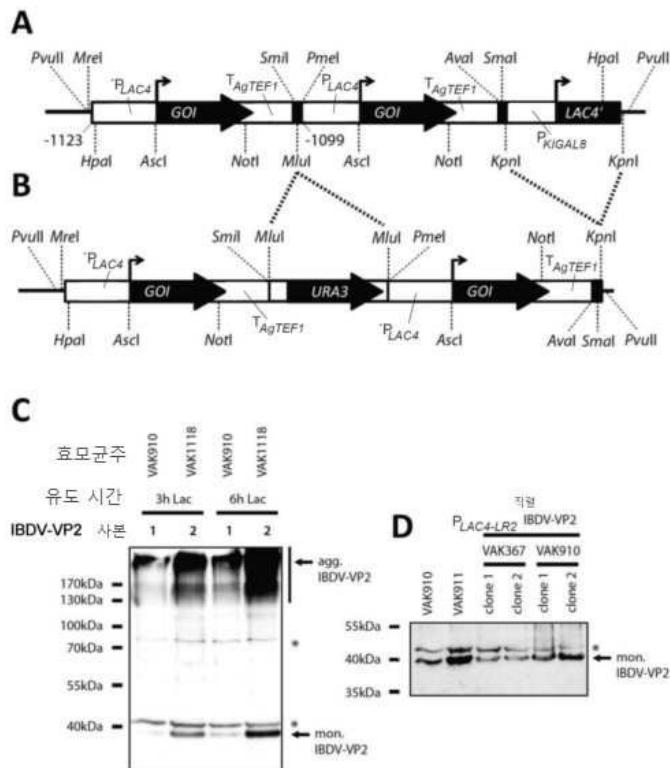
## 도면5



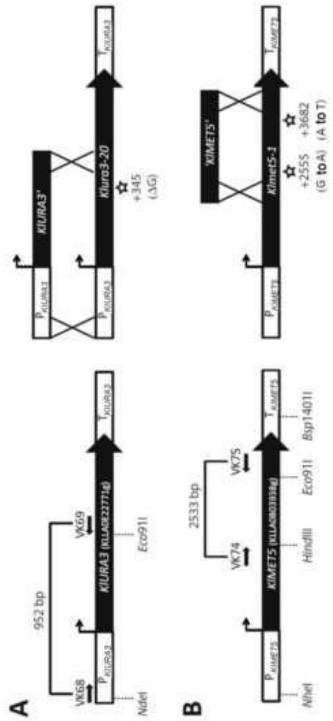
## 도면6



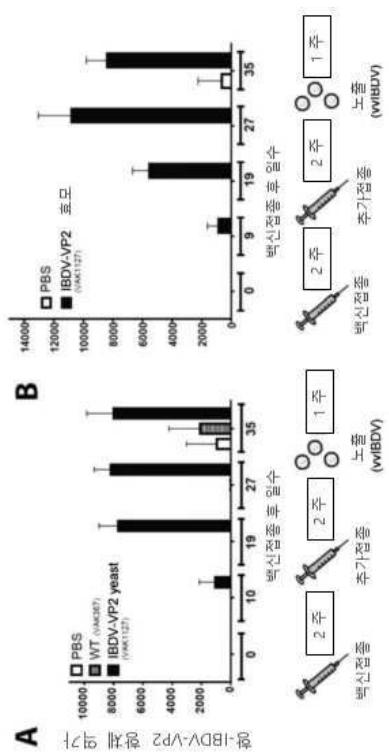
## 도면7



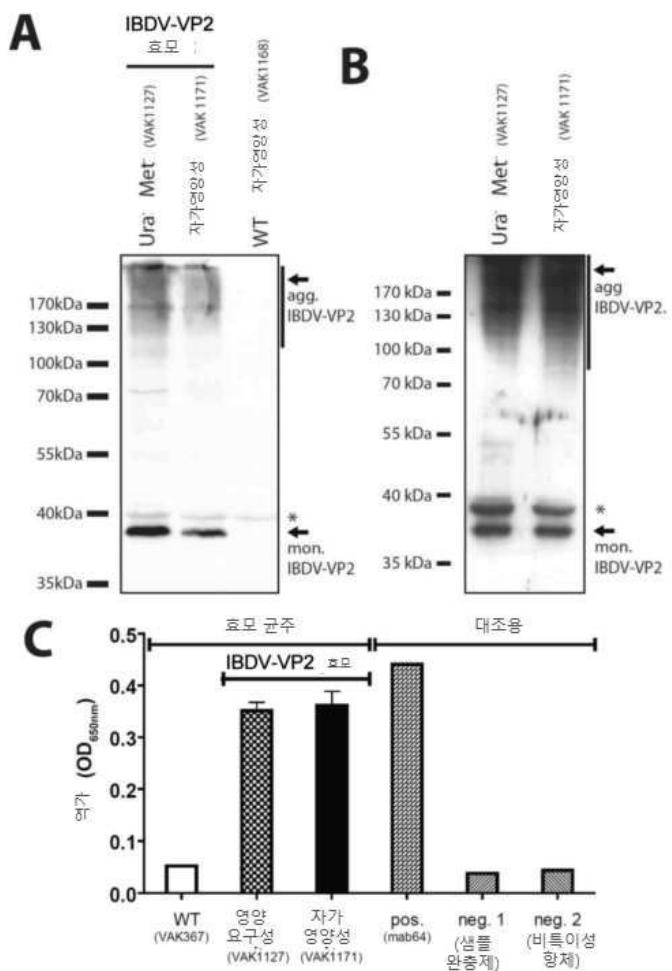
## 도면8



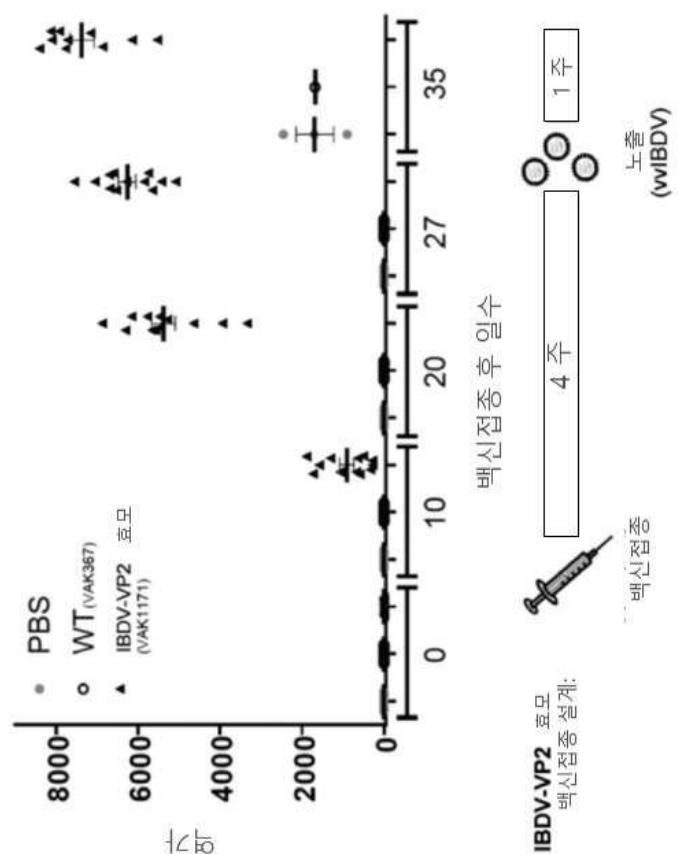
## 도면9



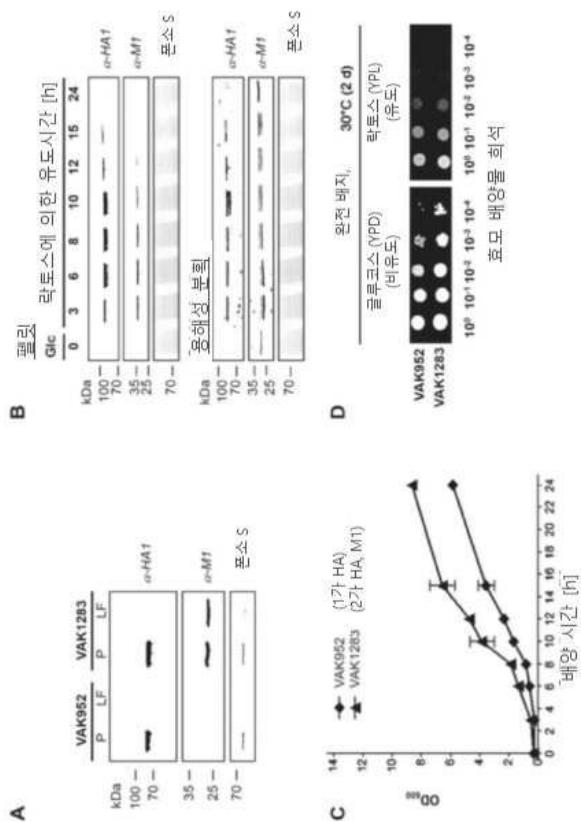
## 도면 10



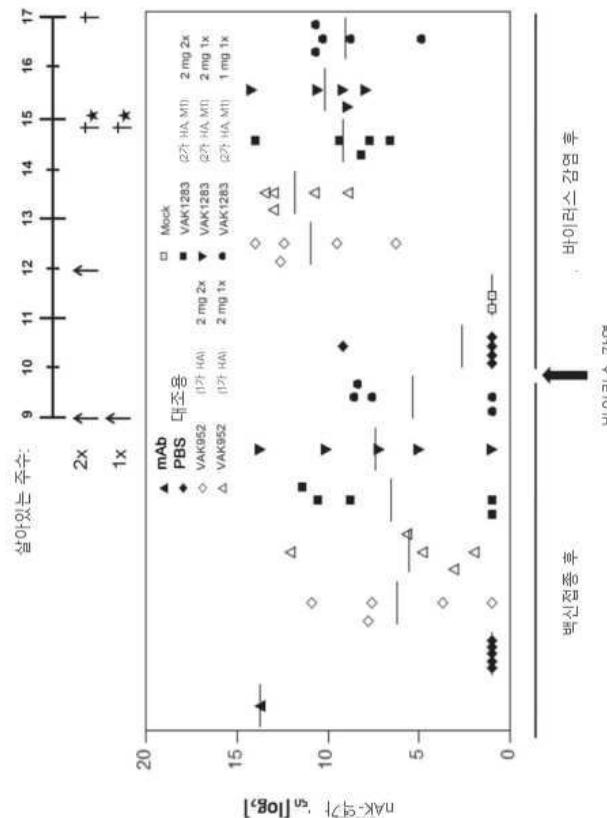
도면11



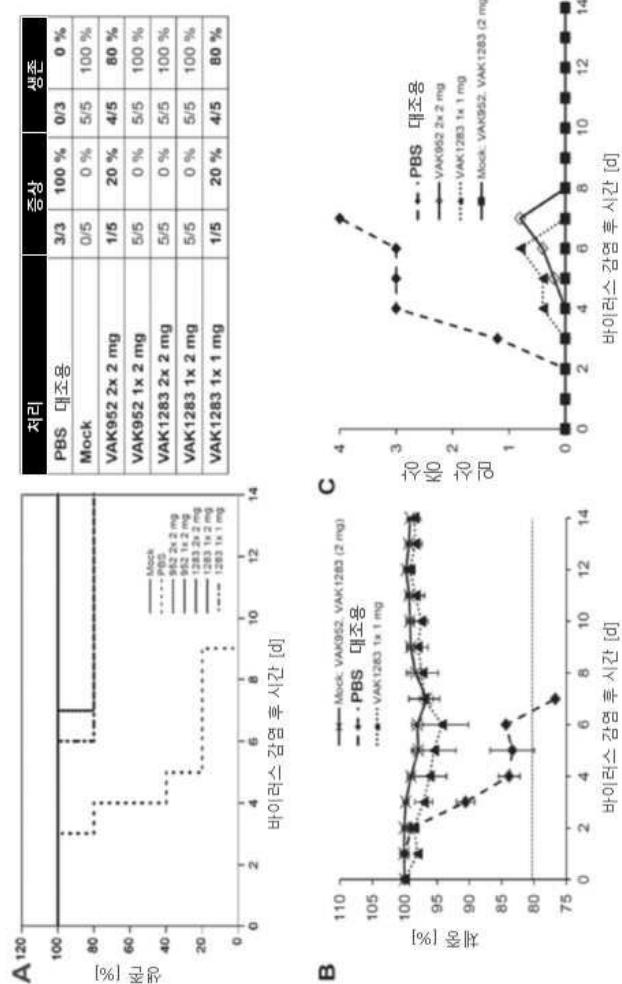
## 도면12



## 도면13



## 도면14



## 서열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Martin-Luther-Universit? Halle-Wittenberg

<120> Optimiertes Wirts-/Vektorsystem zur Erzeugung protektiver monovalenter und multivalenter subunit-Vakzine auf Basis der Hefe Kluyveromyces lactis

&lt;130&gt; VAK109

&lt;160&gt; 25

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 5042

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Kluyveromyces lactis

&lt;400&gt; 1

atgaatatca atatcaagaa agattctgga ggaaatgggt ccgatttacc tcgatggAAC	60
gattctccgg tggaaagttt agggtcgTTT aatggagaa gaagatcgat gtccttctCT	120
gaatcagtaa acttcgcaag aaatactcg aaccattgg atatgtcAGC tcaggAAATG	180
agaggattga atgggttcAG aagatcttc atcgctata agtcgtgaa acttcatggG	240
aagacaccGA actttatcac taggaatttc aacgagttct tgacgttata cggccattc	300
gctggtaag atttgtccGA ggatgaggaa acagaaactg aggtggagac tgatgaagat	360
gaggacgaag aagctgcGCT tttcgTCat ggtattaggg gcctgcGCCa cctcgacaat	420
ttcaaacGta tcagagtGCT ttGCCATTG ttCGGAGCA gtcttcatac ctcttacgat	480
ggcagggtat ggcgttacaa ggttatcAGT atataggaca ccgaccttGA tcttctgagg	540
cagttcagct tctctccaag gaataggat actagtagta tcagattccc aaggcttacc	600
gtcattaatg taatgtttca taaagtaatC cagctttca atagatcctc tacGCCGAC	660
gcatcgtggc cggcatcacc ggcGCCACAG gtgcggTTGc tggcgcctat atcGCCGACA	720
tcaccgatgg ggaagatcgG gtcGCCact tcgggctcat gagcgcTTGT ttCGGCGTGG	780
gtatggTggc aggccccgtG gccggggac tggggcgc catctcTTG catgcaccat	840
tccttgcggc ggcggtgctc aacggcctca acctactact gggctgcTTc ctaatgcagg	900
agtgcataa gggagagcgt cgatcgacCT ttgacattG ctgttcaaAG ttaccacAGC	960
agcaattgat ccaagctaac tcacggcaCG ggcgtAGCAA gtgaaccGTC gatattGAGC	1020
agtgtatgaa tatgcattcg taccagtatt ttgtgtgatC acgcaggact ttacggTTc	1080
acggaccGGA acagaccGta ttctgtcCT taagtgtat gtatgggtGT gatctctGTC	1140
ctccgcTTT cccatacaaa agttgcTTG aaaaagaAGT aactgcAAAA tcatagataa	1200
tgacacttG aataactaga aataacaact tcggaccTT gctcaattca agtaagacaa	1260
tatatacgTt acctgcccTT cttccaAGTG agggTTTGTt ctgttggTT agaaatcccA	1320
ggatattcAG agtttttaa agctttctt agagtcaagg cacttttta caccaattgt	1380
actagtaccc aactaaacat taaaagatca gcaaccatcc aaatggTTA cgatttGACC	1440
atTTgaacat cacagatctG aactttactC cgactgattG ttttactat acgaaatggG	1500
tagtagggcc tccaattcgc cttttttc aagtaaggCG gaaacgttac tgccatcgGA	1560
gtataaaaAG aatgcggTTA agaaggaaAC aatacgcaat ggcaagaaaa ggaaattGCC	1620
tgatacagaa tcctcagatC ctgagTTGc aagtccggGT ttgatagCTA atgaaactgg	1680
cactgatgcG gtgagtaatG gtaacaaaaA tgatagcaat gccaacaaca acaacaacAA	1740

caacaacaag aaatcaagtg aagtaatgca ccaggcgtgc gatgcttgca ggaagaagaa	1800
gtggaaatgt tccaagacag taccgacttg cacgaactgt ctgaaataca attagactg	1860
tgtctactct ccgcaagttt ttaggactcc gttgacaaga gcacattaa cagagatgga	1920
aatagggtt gcagagttgg aacagtttt gaaagaactt ttcccagttt gggatatcga	1980
tagtttactt cagcaaaaag atacatacag gattaggaa ttgcttacta tgggttctac	2040
aaatactgtt ccgggacttg catgaataa tatcgattca tcgttagaac agccggtgc	2100
ctttggtaact ggcgcagccgg cacaatctt gtcaactgtat ccagcagttac aatctcaagc	2160
ctatccaaatg caaccggtaac cgatgacaga gcttcaatct atcaccaatc ttgcacacac	2220
gccatcaattt ctggatgaac agcaaataa cacgattcc acggcaacgc tgccgaacat	2280
gtactcttca ggttaacaata ataacaactt gggtaacatc tctggcttat cacctgttac	2340
agaggcattt ttccgttggc aggaaggtga aacgtcaatc gataatagtt atttggaaa	2400
aggttcaattt ttgttttgtt tgaaccaattt actatcatca gaaaagatcg ctggcggtac	2460
atcaaaaatgtt ggcaatgaca ttaacactaa taataataat ataaaccatc agaagctacc	2520
tctaataacta aacaataata ttactcataa tgtgtcgac ataaaccacaa caagtacatc	2580
ttcaaaacaaa agggcaatgtt ctcctttc tgccaaatgac tctgtatatc tcgtaaaag	2640
agagacaata tccgcgtata tcgatgcgtt cttcaaggcac tatcatgcgc tatatccgtt	2700
gttcgttcaag gaaatgtttt tcgctcgtttaa ataaaccatc agaacgttga	2760
gatatggcac atcttactaa acgcgttattt agcttgggt tcatgggtct ctaattcatg	2820
ttcaagtacatcatactctt attaccaaaa cgcattatca tatttgcgttcc cgcgttattt	2880
ggaaacaggg tccacagattt taaccatagc actcatactt ttaacgcattt atgttcaaaa	2940
gatgcataag ccaaactgtt catgggtctt cataggactt tgttagccatc tggctacatc	3000
gttgggatattt caccggatc taccatcactc aacgatacat gatcagcaac tccgttagat	3060
attgtggtgg actatattttt gcacggatc cgatctctca ttagagactg gaaggccctc	3120
attattggccc aatcttcagg ctattgtat accattacca gettcatctg ccactatcaa	3180
agaaccaagc atatattccctt ccatcataca agaatccaa tggtctcaaa tattgcaaca	3240
gaaattgtca aataactcat atcagcaag tgcagggtaa tgtctctcat ggttcgtat	3300
tgttcaagca tttagacc actggcctac tccttagtacc gaagctgaac tcaaagcctt	3360
aatgaaactt caactagattt ggcttaccattt agtgaagttc cggccataactt ggttgcgttca	3420
ttgttcccta atatcacttt tctcgtttt ttttgaagaa gatgccccaa ccgacaacaa	3480

cgtcatacgg tgcaggagt tatgccttca acttcaagc agaaatataat ttagcgtggc	3540
cactttgtatcgagctatg cattcaactc actttcctgt tggtacgcga cacattatct	3600
tgttagaagc gcattagtgc ctctacattt cgcatctcgat atatctccac agcacgcctt	3660
gtgggagaca gtiaagcgc aattattatc agccatgaa gcatggta tattgtcaca	3720
agaatcttcc ttggccgcta aatttgcgtt gatattaacc aagaattattt ctgaaatact	3780
acaaagagaa ggcataaca aagccaaact gatgccacca ccaactccat tgctacaatc	3840
aaccagttc tcggacctac tttcactgtg gtcagcaaac gcagaagacg ctccgagagt	3900
cagtaattcc cagatgcctc aatcgatcac tatcacggac tctttgtac agtcatcaac	3960
aactcaaatg agacctccaa ccacatctgg atggctgtat accaacaact tcctgaatcc	4020
atcgacccaa cagctattca acaccacaac aatggacgtat gtgtacaact atatatttga	4080
taacgacgag taagaaatct ctctttccg tagtcaatttgg gacagcatc aattcatgtat	4140
tttactttt gttcagtagc tatcaaatacg ctatccaaacg agaccactgg tacgaacagt	4200
gtccatcatg cacattgttag gtaacccagg gagcggatcg gtatggcgaa gagacttcat	4260
cgtggccat cgatgtatgcgaaatataa cgatattccatg caacaacacg	4320
agctgaagca gcagcagcag cacttgcata agaagaaaag aaatacgatcc accacgaagg	4380
cggtaacttct ctttctaaatg tcgttcgtat gtaccgggt tcttttcta cctagagtt	4440
tccataacgg tgggtggtttgc ttcagttacgc tggatctttt gttctgcgcac acgggtctt	4500
tctactgcctt catcctgttg atagacacgaa agactgcgtt tggatggat ggatacggtg	4560
aattgggttc acgttttattc ggacccaaat tgaagttcac tgcctttca tcgatgtac	4620
tctcgcaat cggatgttgc gtcgttata ctgtgttac tgcacaaac ttgcaggcat	4680
tcttcaaaca tgcgttttctt ctcgaataact cgatatttttgcgtt atccaacttag	4740
cattctatattt ggcgttatca ttgacttagaa acattgcata actcagtgcc accgcgttgg	4800
tagcagatct ttcatcttc ttgggtctatg tatacgatctt ttattattcc agtttctata	4860
tttggaaatccatc tggcatcgatc tggatccatc tggatctttt caacaatcg gactggacgt	4920
tattttatgg aactgcataatg agggtatcgat tctcttgcgtt ccaatccatg	4980
aatctatggaa aaaaacgtca catttcaaaatc cggcattgtat gtcgtatc ctcgttgcata	5040
ca	5042
<210> 2	
<211> 2349	
<212> DNA	
<213> Artifizielle Sequenz	

## <220><223> Synthetische Polynukleinsäure

<400> 2

acgcagaccc gagtttcttt cttacaaaag cgtgtacaca cgtaaacgcg ctcgggcac	420
cgaacggcca gggtcggggt tcattcgta tagagccacg caggttaactt gccaattcca	480
aaaaaaattha aatgacgata ctagtaacca aaggaaagga acagatagat aaaattccga	540
gactgtcaaa ttaggtttt ttctttttt ttggcgggag tcagtggcc gaaatatgtt	600
cttggcctag aacttaatct gggttcatca tgccaaatact tgcctgagtg cccgacttt	660
tgcaccctt ctgccttct gtctatcctt caaaacccac ctgtttcca gccgtatctt	720
cgcgtcgatc tacacatact gtgcataatc ttgtgtgttag ccggacgtga ctatgaccaa	780

ttgactacca accattatgt tggttgcaga aggcggaatt cgtcgacgaa ctgtttaat	1260
tattatgggg caggcgagag ggggaggaat gtatgtgtgt gaggcggcgc agacggagcc	1320
atccaggcca ggtagaaaata gagaaagccg aatgttagac aatatggcag cgttagtagag	1380
taggttaggta ggcaagtact gctagcaaag aggagaaggg taagctact ctgcattc	1440
cacaccgtta gtgtgtcagt ttgaacaaaa aaacaatcat cataccaatt gatggactgt	1500
ggactggctt ttggaacggc tttcggact gcgattattc gtgaggaaatc aaggttagaa	1560
tttggtcata ttacggaca acagtgggtt attccatat ggagtaggaa aacgagatca	1620

tggtatcctc agatatgtt cgaaattctg ttcaccgcaa agttcagggt gctctggtgg 1680  
gttccgggttgc tctttgttgc tgcttctccc ttgtcttgcata tgtaataat agccttagct 1740

gtgagcccaa acttagggta ggcttagtgt tggaacgtac atatgtatca cgttgacttg	1800
gtttaaccag gcgacctggc agccagccat acccacacac gtttttgta tcttcagttat	1860
agttgtgaaa agtgtacgg aaatttggg tccgagcaac agcgtcttt tctagtagtg	1920
cggtcggta ctgggttgc attggtaattt ggactttttt gctacaccat tcactacttg	1980
aagtcgagtg tgaagggtat gatttctagt ggtgaacacc ttttagttacg taatgtttc	2040

attgctgttt tacttgagat ttcgatttag aaaaaggat ttaatagctc gaatcaatgt	2100
gagaacagag agaggatgtt cttccctaac tcgaaaggta tatgaggctt gtgtttctta	2160
ggagaattat tattcttttg ttatgttgcg cttgtatgtg gaaaaggatga agagacaaaa	2220
gctggaattt tgacggata acaagctcaa cactgaaat ttagaaaga gcagaatttgc	2280
gcaaaaaaaaaaaa ataaacacac atactcatcg agaagctgta ccgtcgacgg	2340
cgcgccatg	2349

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 7964

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetische Polynukleins?re

&lt;220&gt;&lt;221&gt; Variation

&lt;222&gt; (6628)..(6629)

&lt;223&gt; nn ist aa, ag oder ga

&lt;400&gt; 3

aggtggcact ttccgggaa atgtgcgcgg aacccttatt tgtttatttt tctaaataca	60
ttcaaatatg tatecgctca tgagacaata accctgataa atgcttaat aatattgaaa	120
aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgcgcctt attcccttt ttgcggcatt	180
ttgccttcct gttttgctc acccagaaac gctggtaaaa gtaaaagatg ctgaagatca	240
gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcgtaaga tccttgagag	300

ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgtt gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc	360
ggtattatcc cgtattgacg ccggcaaga gcaactcggt cgccgcatac actattctca	420
gaatgacttg ttgtgactt caccagtac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt	480
aagagaatta tgcagtgtc ccataaccat gagtgataac actgcggcca acttacttct	540
gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgctttttg cacaacatgg gggatcatgt	600
aactcgccctt gatcggtggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga	660

caccacgatg cctgttagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaaactact	720
tactctagct tcccgcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc	780
acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggta	840
gcgtgggtct cgcggatca ttgcagcact gggccagat ggtaagccct cccgtatcgt	900
agttatctac acgacgggaa gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga	960
gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagttact catataact	1020
tttagattgtat taaaacttc attttaatt taaaaggatc taggtgaaga tccttttga	1080
taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gtttcgttc cactgagcgt cagacccgt	1140
agaaaaagatc aaaggatctt cttagatcc ttttttctg cgcgtaatct gctgttgc	1200
aacaaaaaaaaa ccaccgtac cagcggtggt ttgttgccg gatcaagagc taccactct	1260
ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagataccca aatactgttc ttctagtgt	1320
gccgtagtttta ggccaccact tcaagaactc tgttagcaccg cctacatacc tcgcctctgt	1380
aatccgttta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtgc tgtagtaccg ggtaggactc	1440
aagacgatag ttaccggata aggccgacgc gtccggctga acgggggtt cgtgcacaca	1500
gcccgacttgc gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga	1560
aagcgccacg ctccccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcg	1620
aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatcttt atagtcctgt	1680
cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtag gggggcggag	1740
cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacggttc ctggccttt gctggccttt	1800
tgctcacatg ttcttcctg cgtagtcccc tgattctgtg gataaccgtt ttaccgcctt	1860
tgagtgagct gataccgctc gcccgcagccg aacgaccgag cgcagcgtt cagtgagcga	1920
ggaaagcggaa gagcgccaa tacgaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta	1980
atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgtca acgcaattaa	2040
tgtgagttag ctcaactcatt aggccacccca ggctttacac ttatgctcc cggctcgat	2100
gttgtgtgaa attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta	2160
cgcacggcgc gcaattaaacc ctcaactaaag ggaacaaaag ctgggtaccg ggccgggtga	2220
cctcatttgcgtca gtcgttata ctccctcaggaa gaacgcgtt ggcacccat ataatcaagc	2280
aaaagaagac cggcgttgcgtt tccaggaata attgccaag tattcctagt aaaaccttta	2340
tataaccaag caatggtttc tctttactt ctcttcatga aaaagaacac atgctcgat	2400



gtatagagcc acgcaggtaa cttgccaatt ccaaaaaaaaaa tttaaatgacg atactagtaa	4320
ccaaaggaaa ggaacagata gataaaattc cgagactgtc aaatttaggtt ttttcttt	4380
ttttggcgg gagtcagtgg gccgaaatat gttctggcc tagaacttaa tctggttga	4440
tcatgcaat acitgcctga gtgcccact tttigccac cctctgcct tctgtctatc	4500
cttcaaaacc cacctgttt ccagccgtat cttcgctgc atctacacat actgtgccat	4560
atcttgttg tagccggacg tgactatgac caaaaacaaa caaggagaac tggtcgccga	4620
tttgaacac tcctgcatcc atccaagtgg gtatgcgcta tgcaatgtta agctaggta	4680
ggtcagacca ggtccaagga cagcaacttg actgtatgca acctttacca tcttgcaca	4740
gaacatactt gttagcttagt agttacactt atggaccgaa aaggcacccc accatgtctg	4800
tccggctta gagtagggcc gcagaccgct gatttgcctt gccaaggcgt agtcacaatg	4860
catcgeatga gcacacgggc acgggcacgg gcacaggaac cattggcaaa aataccagat	4920
acactatacc gacgtatatac aagcccaagt taaaattcc taaattccg cggggatcga	4980
ctcataaaat agtaaccttc taatgcgtat ctattgacta ccaaccatta gtgtggttgc	5040
agaaggcggaa attccctt cttcgaaattc agcttgctt ttcattttt atttccatt	5100
tttcagttt tggttggtc gaatttagcc agttgtttct ccaagatgaa aaaaacccct	5160
gcmcagttc tgtgtgcaa gatcctaattc gactttcca ccccccacaa aagtaatgt	5220
tctttgtta cattcgcgtg ggtagctagc tcccaaggac ttcaaggac ttagggactg	5280
cactacatca gagtggttc acctggtttgc ctgcctgggt taaaagaaaa gagcaggaa	5340
ctcgcgggtt cccggcgaat aatcatgcga tagtccttg gccttccaag tcacatgttag	5400
agtagacaac agacagggag ggcaggaagg atcttcact gagatcctgt atcttgttg	5460
gtaagtcgga tggaaaggaa atcgatgag attggagagg atgcggaaaga ggttaacgcct	5520
tttggtaact tggtaattt ttatggggca ggcgagaggg ggaggaatgt atgtgtgtga	5580
ggcggcggag acggagccat ccaggccagg tagaaataga gaaagccaa tgtagacaa	5640
tatggcagcg tagtagagta ggttagttagg caagtactgc tagcaaagag gagaaggta	5700
agctcactct tcgcattcca caccgttagt gtgtcgtttt gaacaaaaaa acaatcatca	5760
taccaattga tggactgtgg actggctttt ggaacggctt ttggactgc gattattcgt	5820
gaggaatcaa ggttagaatt tggcatatt tacggacaac agtgggtgat tcccatatgg	5880
agtaggaaaa cggatcatg gtatcctcg atatgtcg gaattctgtt cacggcaag	5940
ttcagggtgc tctgggtgg ttcgggtgg ctttgcctt gtctgcatt	6000
ttaataatag cctagcctgt gagccgaaac ttagggtagg cttagtggtt gaaacgtacgt	6060
atgtatcagc ttgacttggt ttaaccaggc gacctggtag ccagccatac ccacacacgt	6120

tttttgtatc ttcatatag ttgtgaaaag tgtagcgaa atttgtggc cgagcaacag	6180
cgtcttttc tagtagtgcg gtcggttact tggttgacat tggttattgg actttgtgc	6240
tacaccattc actacttcaa gtcgagtgtg aagggtatga ttcttagtgg tgaacacctt	6300
tagttacgta atgtttcat tgctgttta cttgagattt cgattgagaa aaaggtattt	6360
aatagctcga atcaatgtga gaacagagag aggatgttct tccttaactc gaaaggtata	6420
tgaggcttgt gttcttagg agaatttata ttctttgtt atgttgcgct tgttagttgaa	6480
aaaggtgaag agacaaaagc tggaaatttg agcgataac aagctcaaca cttgaaattt	6540
aggaaagagc agaatttggc aaaaaaaata aaaaaaaata aacacacata ctcatcgaga	6600
agctgtaccg tcgacggcgc gccatgtng cggccgcctc gactcagtac tgacaataaa	6660
aagattcttgc tttaaagaa ctgtcattt gtatagttt ttatattgt agttgttcta	6720
tttaatcaa atgttagcgt gatttatatt tttttcgcc tcgacatcat ctgcccagat	6780
gcgaagttaa gtgcgcagaa agtaatatca tgcgtcaatc gtatgtgaat gctggcgct	6840
atactgtgt cgattcgata ctaacgccgc catccagtgt cgaaaacgag ctctcgacac	6900
gcgtcacaag ctccggagac aatcatatgg gagaagcaat tggaaagatag aaaaaaggta	6960
ctcggatcat aaatatatgt gattctgggt agaagatcgg tctgcatttg atggtgtaa	7020
cgcattttt tacacacatt acttgcctcg agcatcaaat ggtggattt cgtggatcta	7080
tatcacgtga ttgtttaag aattgtcggtt catggtgaca ctttagctt tgacatgatt	7140
aagctcatct caattgtatgt tatctaaagt cattcaact atctaagatg tggttgat	7200
tggccattt tggaaagcc agtacgcgcag cgtcaataca cttccgtcaa ttgttgac	7260
catgtccaca aaatcatata ccagtagagc tgagactcat gcaagtcgg ttgcattcgaa	7320
actttiacgt ttaatggatg aaaagaagac caatttggtt gcttctttt acgttcgttc	7380
gactgtatgag ctattgaaac ttgttgaac gttgggtcca tacattgcc tttgaaaac	7440
acacgttgat atcttggatg atttcagttt tgagggtact gtcgttccat tggaaacatt	7500
ggcagagaaa tacaagttct tgatatttga ggacagaaaa ttgcggata tcggtaacac	7560
agtcaaatttta caatatacat cggcggttta ccgtatcgca gaatggctg atatcacca	7620
cggccacggg gttactgggtt ctggatattgt tgctggcttg aaacaaggtg cgcaagaggt	7680
caccaaagaa ccaagggat tattgtatgt tgctgaatgt tttccaagg gttctctagc	7740
acacgggtgaa tatactaagg gtaccgagctt ccaattcgcc ctatgtgag tcgtattacg	7800
cgcgctactt gggcgatgtt ttacaacgtc gtgactggaa aaaccctggc gttacccaac	7860

ttaatgcct tgcagcacat cccccttcg ccagctggcg taatagcgaa gagggccgca	7920
ccgatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atgg	7964
<210> 4	
<211> 9728	
<212> DNA	
<213> Artifizielle Sequenz	
<220><223> Synthetische Polynukleins?re	
<220><221> Variation	
<222> (4962)..(4963)	
<223> nn is aa, ag oder ga	
<400> 4	
tcagctctgg gagaaacttg gtgttccgg tgcaactgtc cctgatgaac caaagccat	60
caccaatgaa gatatcaaaa ttgcttccaa tttcctcaga ggtacaattt tggaaggcgt	120
acaagatgaa tcaactggtg caatttctgc gtgggatcag caattaacca agttccatgg	180
tatctatatg caagatgatc gtgatataag agacactagg aagagtcaag gtcttgaacc	240
tttattacatt ttcatgtcaa gagttagatt accaggtgga aaggccaatc cagatcaatg	300
gttgattctt gatcaacttag cagacaaaac tggtaacggt acagttaaaa ttaccaccag	360
agcaacttcc caattgcattt gtgttgttaa gcacaattt aagcacacta tcagagctat	420
gaattccacc ttgatggaca ctttagcggc gtgtgggtat gttaacagaa atgtcatgct	480
ttctgcttg cctgctaattt ccacggttca caaacaattt gcagacgttg gtacatatct	540
ttctgaacgt ttcttgccctt aaacaacggc gtatcacgaa atttggtagt agggtccaga	600
caaggatgat gaagatcctt cttggccaga gacctacgag aaaagacaag aaggtcctat	660
aaagaagaag aaaacttttgg tggccgtaa tgcattagtt gatgcggAAC cagtctatgg	720
tccaaacatac ttaccaagaa agttcaagat caatattact gttccacctt tcaatgtatgt	780
cgtatgtgg tccagtgcacg ttgggtttagt tgctataattt gatgaaccaa ctcaaaactct	840
aacagggttc aatctctatg ttgggtggat tatggggagt acccacaaca acaaaaagac	900
atacccaaga acagggtcgt tggcggta tgcctccgtt gcagatgtgg gagatgccat	960
tgaaaagggtg atgattgttc aaagagatca tggatgtcgtt accaaccgtt agcacgtcg	1020
ttaaagtac actgttgatg atttgcattt tgaagggttac aagcagaagg tcgaagaact	1080
atggggcaag aagtttgaac ctgctgctgc gtatgagatc aaatcaaaca ttgattactt	1140
cgggtggta aaggatgaaa ctggactaaa tcatttactt gccttcatttggaaaatggtag	1200
agtggaaatgtt acagtagagtc tgcctcggaa aacagggttc agggaaaatttgcacatgtatgt	1260

gaagaaagat aacttcggtc acttcagatt aaccggtaac caacacgttc ttatctcaga	1320
cgttgatgac gagcattag acgaagttaa agctatcatg aacaagtaca agctagacaa	1380
cacgaacttc agtggattga gtttatcgct tgctgcatgt gttgcttgc caacctgtgg	1440
tttggctatg gccgaatctg aacgttattt gcctgttta atcacaaagc tggagaatgc	1500
attagaagag tatgggttac gccacgattc tattgtcatg agaatgactg gttgtccaaa	1560
tggtgtgct cgtccatggt tagctgaggt tgcttagtg ggtaaagccc caggaactta	1620
taatctatta ctcggaggtg gttattacgg tcaaagattg aacaaactat acagagcatc	1680
catcaaagaa gatgaaattt tagccacatt gaaacctcta tttaagaggt ggtccttgaa	1740
aagactcgaa ggtgaacact tcggggattt cgtcattaga gtaggtgtt tcaaaccaac	1800
cttggaaaggt aaataacttcc atgatgatct tccagaagaa gctctatgag ggagccaact	1860
ccttcataat gggagggccg catcatgtaa ttagttatgt cacgcttaca ttcacgcct	1920
ccccccacat ccgctctaac cgaaaaggaa ggagttagac aacctgaagt cttagtccct	1980
atttatttt ttatagttat gtttagtatta agaacgttat ttatattca aatttttctt	2040
tttttctgt acagacgcgt gtacgcattt aacattatac tgaaaacctt gcttggaaag	2100
gttttggac gctcgaaggc tttaatttgc ggccccggg ctgcggcgta attctgtctt	2160
taatcattaa cactgactga aggtataat tataagacaa cacacagaga ctttggttt	2220
ctgttagct tacacttcc agctatattt aatagcatat atatgttcca gaagctacaa	2280
ccacctgaa ctacagccca actcaacatt gaaagttact gcctttat accttgatac	2340
accattttaga cctccaatta accgattgtc cttgtcataa tgagctagag tagcaaggta	2400
tcaacaacag tatggacatc ttattgtcaa ctttctgtt cggagggaaag aatcccgaat	2460
atgttaatc tgacgcgcgg gtattgttac gtacgttgc agggccacgc agacccgagt	2520
ttctttctta caaaagcgtt tacacacgtt aacgcgcctcg gtgcaccgaa cggccagggt	2580
cgggttcat tcggataga gccacgcagg taacttgcca attccaaaaaa aaattaaatg	2640
acgatacttagt taaccaaagg aaaggaacag atagataaaa ttccgagact gtcaaattag	2700
gttttttctt tttttttgg cgggagtcag tggggccaaa tatgttcttgcctagaact	2760
taatctggtt tggatcatgccc aatacttgcc tgagtgcgg acttttgcc cacccttttgc	2820
ccttcgtct atccctcaaa acccaccctgt ttccagccg tattttcgct cgcattaca	2880
catactgtgc catactttgt gtgttagccgg acgtgactat gaccaaaaac aaacaaggag	2940
aactgttgcg cgtttgttac cactctgca tccatccaag tgggtatgcg ctatgcaatg	3000
ttaagctagg tcaggtcaga ccaggtccaa ggacagcaac ttgactgtat gcaaccttta	3060

ccatcttc acagaacata cttgttagcta gctagttaca cttatggacc gaaaaggcac	3120
cccaccatgt ctgtccggct ttagagtacg gccgcagacc gctgatttc cttgccaagc	3180
agtagtcaca atgcatcgca tgagcacacg ggcacggca cgggcacagg aaccattggc	3240
aaaataccca gatacactat accgacgtat atcaagccca agttaaaat tcctaaat	3300
ccgcgggat cgaactcataa aatagtaacc ttctaatgcg tatctattga ctaccaacca	3360
tttagtgtgt tgcaagaaggc ggaattctcc cttctcgaa tttagcttgc ttttcattt	3420
tttattttcc attttcagt ttttgttgt gtcgaattta gccagttgc tctccaagat	3480
gaaaaaaaaacc cctgcgcagt ttctgtgctg caagatccta atcgactttt ccaccccca	3540
caaaagtaaa ttttttttgc ttacattcg cttggtagt agctccccga atcttcaaag	3600
gacttaggga ctgcactaca tcagagtgtg ttccacctgtt tgctgcctg gtttgaaga	3660
aaagagcagg gaactcgcgg gttcccgccg aataatcatg cgatagtcct ttggcctcc	3720
aagtccatg tagagtagac aacagacagg gagggcagga aggttttc actgagatcc	3780
tgtatcttgc tggttaagtc ggttggaaagg ggttgcgtat gagattggag aggtgcgg	3840
agaggttaacg cttttgtta acttggtaaa ttattatgg gcaggcgaga gggggaggaa	3900
tgtatgtgtg tgaggcgggc gagacggagc catccaggcc aggtagaaat agagaaagcc	3960
gaatgttaga caatatggca gcgttagtaga gtaggttagt aggcaagtac tgctagcaa	4020
gaggagaagg gtaagctcac tcttcgcatt ccacaccgtt agtgtgtcag tttgaacaaa	4080
aaaacaatca tcataccaaat tgatggactg tggactggct tttggaaacgg ctttcggac	4140
tgcgattatt cgtggaaat caaggttagga atttggcat attacggac aacagtgggt	4200
gattccata tggagtagga aaacgagatc atggatcct cagatatgtt gcgaaattct	4260
gttcaccgca aagttcaggg tgctctgggt ggtttcggtt ggttttgc ttgtttctcc	4320
cttgcgttgc atgttaataa tagcctagcc tgtgagccga aacttagggt aggcttagtg	4380
ttggAACGTA CGTATGTATC ACGTTGACTT GGTTAACCA GGCACCTGG TAGCCAGCCA	4440
taccacaca CGTTTTGT ATCTTCAGTA TAGTTGTGAA AAGTGTAGCG GAAATTGTG	4500
gtccgagcaa CAGCGCTTT TTCTAGTAGT GCGGTCGGTT ACTGGTTGA CATTGGTATT	4560
tggactttgt tgctacacca ttcaactactt gaagtgcagt gtgaagggtt tgatttctag	4620
tggtaacac ctttagttac gtaatgtttt cattgtgtt ttacttgaga tttcgattga	4680
gaaaaaggta tttaatagct cgaatcaatg tgagaacaga gagaggatgt tcttcctaa	4740
ctcgaaaggt atatgaggct tttttttttt aggagaattttt ttattttttt gttatgttgc	4800

gctttagtt ggaaaagggtg aagagacaaa agctggaatt gtgagcggat aacaagctca 4860  
acacttggaa tttaggaaag agcagaattt ggaaaaaaa ataaaaaaaaa aataaacaca 4920  
catactcatc gagaagctgt accgtcgacg ggcgcgcatt tnngcggccg cctcgactca 4980  
gtactgacaa taaaaagatt cttgtttca agaacttgtc atttgtatag ttttttata 5040  
ttgttagtgt tctattttaa tcaaagtta gcgtgattta tattttttt cgcctcgacata 5100  
tcatctgccc agatgcgaag ttaagtgcgc agaaaagtaat atcatgcgc aatcgatgt 5160  
gaatgctggt cgctatactg ctgtcgattc gatactaacg ccgcacatcca gtgtcgaaaa 5220  
  
cgagctcgaa agccaaactcc tttcatatgc tccacacccatgg ccacccaccc acacacacat 5280  
acatacacaacaa acacaaacga tttgtttatt taaatattta tttgtacat tgtcgcatag 5340  
aaaatgcata tttatctgac gttcttcgtt acgtgcctt ttcattgttt aaggatgac 5400  
tcaatttaca ctatccgtca aggtgttaca acaatgtatt agtcaggta tcgcaatttgc 5460  
catggaatat ccatggtattc accaaagaag tttcaatctt aaagtccctt ggaaaaacctt 5520  
tcttactgtg cttgaaaag accttattcg tatttttacc cttcaataaa atgaccgtgg 5580  
tttttttttgc ttatcgat ttttttttttgc ttatcgat ttttttttttgc ttatcgat 5640  
  
cttgtcaacg agaaaaaagg aaacaagtcc aacgttatttgc tagaggtagc cttcatatttgc 5700  
tcaactggaa ctactccaaa ttatatttc aacccctcaaa agttagtttgc ggtttactca 5760  
tgtgtttaat aatggggcga aacgtctgc ttttagtttgc ggaagaagct acttgcgtgg 5820  
tttcggttcc atgcatggac ctcgaggatgc ttttcaactt aatcaaaaaa aagacaagaa 5880  
acctaatttgc tttcggttgc ttttggctt atttttttttgc ttttcaactt aatcaaaaaa aagacaagaa 5940  
cgggcttttgc acaaacttgc acaatgttca aatgtttagt gaaatccctt ggaaaaagtttgc 6000  
gtctgttgc aagtcttgc acccgttcc aactgttgc aaggcttgc agttcccttgc 6060  
  
ttctactgaa tatgttatgt taggtttgg tataagggttgc gttactttca ttagtttca 6120  
agtttatggg ttaggtatct atgctgcacaa agaggatttgc ggtttactca 6180  
ggattcaaaat ttcttttca ctgcgttcat ttttgcac tccagttaaa gtcattcaggat 6240  
gaatttgc aactgttttgc acaacccttgc aacttccaga attcttcaatttgc acaacttatttgc 6300  
ggatgttgc atcaggatgg tcgcacaaat cacaccttgc agaaacacttgc acttcaacat 6360  
tctcaaaatgc ggtcttgc aatccatttgc tggcatccg gatagtaaaaggatgttgc 6420  
taggttgc aatggatttgc aacaatttgc cgttgcatttgc tcaagaaaatgc gttcgttgc 6480  
  
aaagaataac gatttatttgc ttgttgc aacccaaacggat ttttgc aacccatccat 6540  
cgatagaaaaa acaggagaat ccaccacaaat gggacaggat aagagacat tgatcggttgc 6600  
attactcttc agtcaatatttgc taatggacc taaaccgttgc agtccaagca caaaagat 6660

tgtggtatct aaatttagtta cattggctta agacacgtgt caagcttgat atccctgcatt	6720
aatgaatcg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgtct tccgcctcct	6780
cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa	6840
aggcgtaat acgttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa	6900
aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc	6960
tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga	7020
caggactata aagataccag gctttccccc ctggaaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc	7080
cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg ccttctccc ttcggaagc gtggcgttt	7140
ctcatagctc acgtgttagg tatctcagt cggtaggt cgttcgtcc aagctggct	7200
gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccgtaac tatcgtcttg	7260
agtccaaacc ggtaaagacac gacttatacgc cactggcagc agccactggt aacaggatta	7320
gcagagcagag gtatgttaggc ggtgctacag agttcttcaa gtgggtggcct aactacggct	7380
acactagaag aacagtattt ggtatctcg ctctgctgaa gccagttacc ttcgaaaaaa	7440
gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt	7500
gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatccttg atctttcta	7560
cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gatttggc atgagattat	7620
caaaaaggat cttcacctag atcctttaa attaaaaatg aagtttaaa tcaatctaaa	7680
gtatatatga gtaaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagttag gcacccatct	7740
cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta	7800
cgatacggga gggcttacca tctggccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct	7860
caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggccgag cgccagaagtg	7920
gtcctgcaac ttatccgcc tccatccagt ctattaatg ttgcgggaa gctagagtaa	7980
gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtgggt	8040
cacgctcgtc gtttggatg gtttcattca gtcgggttc ccaacgatca aggcgagttt	8100
catgatcccc catgttgc aaaaaagcgg ttagctccctt cggtccctcg atcgttgtca	8160
gaagtaagtt gggccagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattcttta	8220
ctgtcatgcc atccgtaaga tgctttctg tgactggta gtactcaacc aagtcttct	8280
gagaatagt tatgcggcga ccgagttgt cttggccgc gtcaatacgg gataatccg	8340
cgccacatag cagaacttta aaagtgcgtca tcattggaaa acgttctcg gggcgaaaac	8400
tctcaaggat ctaccgctg ttgagatcca gttcgtatgtt acccactcgt gcacccaaact	8460
gatcttcaggc atctttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa	8520

atgccgcaaa aaaggaaata agggcgacac ggaaatgtt aatactcata ctcttcctt	8580
---	------

ttcaatatta ttgaaggcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat	8640
gtatttagaa aaataaaacaa ataggggttc cgccacatt tccccgaaaa gtgccacctg	8700
acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc	8760
ccttcgtct cgccgttgc ggtatgtac gtgaaaacct ctgacacatg cagctccgg	8820
agaaagaaag acgttgtct ctacgctatg aacttggta acgcttacgt cgcatctgtt	8880
gctgtttatt catcatacac acagctactt acatcatttgc tcgaagcttc taaatttgg	8940
ggaccatcaa tcattctagc gtacttgcca tacaactcag aaagagacac tccactagaa	9000

gttttaaaag aaaccaaaat tgggtcgaa agtggtaact ggccttata caggttaac	9060
ccttacga aacgcgacga ccaagtttc aaattggact cctctttat caaacaacaa	9120
ctgaaggact ttttagaccc agagaataag ctcactttc tagtcaaaa gtccccagag	9180
cttgcagaa atttgaagca ttccgcctca gatgcgattc aattgaaaca agacagaagg	9240
gctaaagcag cattcgatca actcttagaa ggtctcttg gccctcttc tcacattt	9300
catgcttctg acgggtgcaa tgcagctaat tttagaaaaa gattgggtac aaggcatct	9360
gctagaggc taaaaactat tgtactatca atggaagaca ttgttctaga agagttacca	9420

ggtaagaga atgttgtatt tataacgtca actgctggc aaggtgaatt ccctcaagat	9480
gttaaggcat ttggatgc tctgaagtct tctactgacc tcgatttagc ttctttagt	9540
ttctccgtgt ttggtttagg tgactctgca tactggccac gtaaggaaga cgcccttac	9600
tacaacaaac ccgctaagga ttgttcaag agattagaat tgcttctgg tcaagaacta	9660
gtttcttgg gattgggtga tgaccaggat gccgatggtt atcaaacagg ctatgctgt	9720
tggaaagc	9728

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 2794

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetische Polynukleins?re

&lt;400&gt; 5

cgttaattctg tcttaatca ttaacactga ctgaaggata taattataag acaacacaca	60
gagacttttgc ttgtgtttt agcttacact ttccagctat attgaatagc atatataatgt	120
tccagaagct acaaccacct tgaactacag cccaaactcaa cattgaaagt tactgcctt	180
atatacccttgc atacaccatt tagacctcca attaaccatgt tgccttgctc ataatgagct	240

agagttagcaa ggtatcaaca acagtatgga catcttattt tcaactttct agtacggagg	300
gaagaatccc gaatatgtt aatctgacgc ggggttattt ctaagtcacg ttgcaggccc	360
acgcagaccc gagtttctt cttacaaaag cgtgtacaca cgtaaacgcg ctccgtgcac	420
cgaacggcca gggtcgggt tcattcgta tagagccacg caggttaactt gccaattcca	480
aaaaaaatata aatgacgata ctagtaacca aaggaaagga acagatagat aaaattccga	540
gactgtcaaa ttaggtttt ttctttttt ttggcggag tcagtggcc gaaatatgtt	600
cttggcctag aacttaatct ggtttagtca tgccaaactt tgcctgagtg cccgacttt	660
tgcacccctt ctgccttct gtctatcctt caaaacccac ctgtttcca gccgtatctt	720
cgtcgcatc tacacatact tgccatatac ttgtgtgt tag ccggacgtga ctatgaccaa	780
aaacaaacaa ggagaactgt tcggcattt gtaacactcc tgcattccatc caagtggta	840
tgcgtatgc aatgttaagc taggtcaggc cagaccaggc ccaaggacag caacttgact	900
gtatgcaacc ttaccatct ttgcacagaa catacttgcata gctagctagt tacacttatg	960
gaccgaaaag gcacccaccat atgtctgtcc ggctttagag tacggccgca gaccgctgat	1020
ttgccttgc aagcagtagt cacaatgcat cgcattgagca cacggccacg ggcacggca	1080
caggaccat tggcaaaaat accagataca ctataccgac gtatatcaag cccaagttt	1140
aaattcctaa atttccgcgg ggatcgactc ataaaatagt aacttctaa tgcgtatcta	1200
ttgactacca accatttagt tggttgcaga aggcggattt ctcccttctt cgaattcagc	1260
ttgcttttc atttttattt ttccattttt cagttttgt ttgtgtcgaa tttagccagt	1320
tgtttctcca agatgaaaaa aaccctgcg cagttctgt gctgcaagat cctaattgcac	1380
ttttccaccc cccacaaaag taaatgttct ttgttacat tgcgtgggt agctagctcc	1440
ccgaatcttca aaggactta gggactgcac tacatcagag tggtttgcacc tgggttgcgt	1500
cctggtttga aagaaaagag cagggactc gcgggttccc ggcgaataat catgcgatag	1560
tccttggcc ttccaagtcg catgttagagt agacaacaga cagggaggc aggaaggatc	1620
tttcactgag atcctgtatc ttgttggta agtcggatga aagggaaatc gtatgagatt	1680
ggagaggatg cggaaagaggat aacgcctttt gttaacttgc ttaatttata tggggcaggc	1740
gagagggggaa ggaatgtatg tgggtgaggc gggcgagacg gagccatcca ggccaggttag	1800
aaatagagaa agccgaatgt tagacaatata ggcagcgttag tagagttagt agttaggcaa	1860
gtactgctag caaagaggag aaggtaagc tcaactttcg cattccacac cgtagtgc	1920
tcaagttgaa caaaaaaaca atcatcatac caattgtatgg actgtggact ggctttgga	1980

acggctttc ggactgcgat tattcgttaga gaatcaaggt aggaatttgg tcataattac 2040

ggacaacagt ggggtgattcc catatggagt aggaaaacga gatcatggta tcctcagata 2100  
 tggcgaa ttctgttac cgcaaagtgc agggtgctct ggtgggttgc ggttggctt 2160  
 tgcttgcctt ctcccttgc ttgcgttataataagcct agcctgtgag ccgaaactta 2220  
 gggtaggctt agtggtagaa cgtacatgtgatc acgttggttt accaggcgac 2280  
 ctggtagcca gccataccca cacacgtttt ttgtatcttca agtatagttg tgaaaagtgt 2340  
 agcggaaatt tgggtccga gcaacagcgctt cttttcttagt tagtgcggtc ggttacttgg 2400  
 ttgacattgg tatttggact ttgttgcctt accatttactt acgttgcgatc gagttgtgaag 2460

ggtagatgtt ctatgttgcgat acaccttagt ttacgtatgtt ttttatttc tggtttactt 2520  
 gagatttgcgat ttggaaaaaa ggtatataat agctcgatc aatgtgagaa cagagagagg 2580  
 atgttcttcc ctaactcgaa aggtatataatgc ggctgtgtt tcttaggaga attatttttc 2640  
 ttttggatgtt tggcgcttgc agtggaaaaaa ggtgaagaga caaaagctgg aattgtgagc 2700  
 ggataacaag ctcaacactt gaaattttagg aaagagcaga atttggcaaa aaaaataaaaa 2760  
 aaaaataaaa cacacataactt catcgagaag ctgt 2794

<210> 6

<211> 2329

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Synthetische Polynukleinsäure

<400> 6

cgttaattctgttctttaatca ttaacactgatc ctgaaggata taattataag acaacacaca 60  
 gagacttttgcgttgcgtttt agcttacact ttccagctat attgaatagc atatataatgt 120  
 tccagaagctt acaaccaccc tgaactacag cccaaatcaa cattgaaatgt tactgccttt 180  
 atatacccttgc atacaccattt tagacctcca attaaccgtt tgcctgttc ataatgagct 240  
 agagtagcaaa ggtatcaaca acagttatggatc catcttatttgc tcaacttgc agtacggagg 300  
 gaagaatccc gaatatgttataatctgacgc gcgggtatttgc tcaagtgcacg ttgcaggccc 360

acgcagaccc gagtttctttt cttacaaaag cgtgtacaca cgtaaacgcgc ctcgggtgcac 420  
 cgaacggccca gggtcgggtt tcattcggtt tagagccacg caggttaactt gccaattcca 480  
 aaaaaatataatgcgatcataatgcataatgcataatgcataatgcataatgcataatgcataatgc 540  
 gactgtcaaa ttaggtttttt ttctttttt ttggcggttgc tcaagtggcc gaaatatgtt 600  
 ctggccttag aacttaatctt ggtttgtatca tgccaaatctt tgcctgatgtt cccgactttt 660

tgcccaccc	cttgccttct	gtctatcctt	caaaacccac	ctgtttcca	gccgtatct	720
cgctcgcatc	tacacatact	gtgccatatac	tttgtgttag	ccggacgtga	ctatgaccaa	780
aaacaaacaa ggagaactgt tcgcccattt gtaacactcc tgcatccatc caagtggta						840
tgcgtatgc	aatgttaagc	taggtcagg	cagaccagg	ccaaggacag	caacttgact	900
gtatgcaacc	tttaccatct	ttgcacagaa	catacttgc	gctagctagt	tacacttatg	960
gaccgaaaag	gcacccccc	atgtctgtcc	ggctttagag	tacggccgca	gaccgctgat	1020
ttgccttgc	aagcagtagt	cacaatgcat	cgcattgagca	cacgggcacg	ggcacggca	1080
caggaccat	tggcaaaaat	accagataca	ctataccgac	gtatatcaag	cccaagttt	1140
aaattcctaa	atttccgcgg	ggatcgactc	ataaaatagt	aaccttctaa	tgcgtatcta	1200
ttgactacca accatttagt						1260
tggttgcaga	aggcggatt	cgtcgacgaa	cttgtttaat			
tattatgggg	caggcgagag	ggggaggaat	gtatgtgt	gaggcggcgc	agacggagcc	1320
atccaggcca	ggttagaaata	gagaaagccg	aatgttagac	aatatggcag	cgtagtagag	1380
tagtaggtt	ggcaagtact	gctagcaag	aggagaaggg	taagctact	cttcgcattc	1440
cacaccgtt	gtgtgtcagt	ttgaacaaaa	aaacaatcat	cataccaatt	gatggactgt	1500
ggactggctt	ttggaacggc	tttgcgact	gcgattattc	gtgaggaatc	aaggtaggaa	1560
tttggtcata	tttacggaca	acagtgggt	attcccatat	ggagtaggaa	aacgagatca	1620
tggtatcc						1680
agatatgtt	cggaattctg	ttcaccc	agttcagggt	gctctgg	ttgttg	
gtttcggtt	gtcttgc	tgcttccc	ttgtttgc	tgttaataat	agcctagct	1740
gtgagccgaa	acttaggta	ggcttagt	tggAACgtac	atatgtatca	cgttgact	1800
gtttaaccag	gacgttgt	agccagccat	acccacacac	gtttttgt	tcttcagtt	1860
agttgtaaa	agtgtacgg	aaatttgtt	tccgagcaac	agcgtttt	tcttagtagt	1920
cggtcggta	cttggttgac	attggtattt	ggactttgtt	gctacaccat	tcactactt	1980
aagtgcagt	tgaagggtat	gatttctagt	ggtgaacacc	tttagttacg	taatgtttc	2040
attgctgtt tacttgagat						2100
ttcgatttag	aaaaaggat	ttaatagctc	gaatcaatgt			
gagaacagag	agaggatgtt	cttccta	tggaaaggta	tatgagg	gtgtttctt	2160
ggagaattat	tattttttt	ttatgttgc	cttgcgtt	gaaaaggta	agagacaaa	2220
gctggaaat	tgagcgata	acaagctcaa	cactgaaat	ttaggaaaga	gcagaattt	2280
gcaaaaaaaaaa	taaaaaaaaaa	ataaacacac	atactcatcg	agaagctgt		2329
<210> 7						
<211> 1638						
<212> DNA						

&lt;213&gt; Artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetische Polynukleinsäure

&lt;400&gt; 7

gcggggatcg actcataaaa tagtaaccc ttaatgcgt a tctattgact accaaccatt 60

agtgtggttg cagaaggcgg aattctccct tcttcgaatt cagcttgc ttccat ttttt  
 tattttccat tttcagttt ttgtttgtt cgaat tagc cagttgc ttc aagatga  
 aaaaaacccc tgccgatcc ttgtgctgca agatccat c gactttcc accccccaca  
 aaagtaatg ttctttgtt acattcgctt gggtagctt cttccgaat cttcaaagga  
 cttagggact gca t a c a t c a g a g t g t g t c a c c t g t t g c t g t t g t t g a a a a g a a a a  
 agagcaggga actcgcgggt tcccgccaa taatcatgca atagtcctt ggccttccaa  
 gtcgcatgta gatgacaa cagacaggga gggcaggaa gatcttcac tgagatctg 480

tatcttggttg ggttaagtccg atgaaaggaa aatcgatga gattggagag gatgcggaaag 540  
 aggttaacgcc ttttgttaac ttgttttaattt attatgggc aggcgagagg gggaggaatg 600  
 tatgtgtgtt aggcggcga gacggagcc tccaggccag gtagaaatag agaaagccga 660  
 atgttagaca atatggcagc gtagtagatg aggttaggtt gcaagtactg ctagcaaaga 720  
 ggagaagggtt aagtcactc ttgcatttcc acaccgttag tttgtcagt tttttttttt 780  
 aacaatcatc ataccaattt atggactgtt gactggctt tggaaacggct tttcgactg 840  
 cgattattcg tggaaatca aggttagaaat ttggcataat ttacggacaa cagttgggtga 900

ttcccatatg gagtaggaaa acgagatcat ggtatccca gatatgttgc ggaattctgt 960  
 tcaccgcaaa gttcagggtt ctctggggg tttcggttgg tctttgc ttttgcctt gtttccct 1020  
 tgttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 1080  
 ggaacgtaca tatgtatcac gttgacttgg tttaaccagg cgacctggta gccagccata 1140  
 cccacacacg tttttgtat cttcgtata gttgtgaaaa gtgtacggaa aatttgcgtt 1200  
 ccgagcaaca gcgctttt ctagtagtgc ggtcggttac ttgggttaca ttgggttac 1260  
 gactttgtt ctacaccatt cactacttga agtcgagttt gaaaggatgtt atttcttagt 1320

gtgaacaccc ttgttacgt aatgtttca ttgtgtttt acttgagatt tcgattgaga 1380  
 aaaaggatt taatagctg aatcaatgtt agaacagaga gaggatgtt tttccctaaact 1440  
 cggaaaggat atgaggctt gtttcttag gagaatttattt attttttgtt tatgttgc 1500  
 ttgttagttgg aaaagggtt gggatgtt gggatgtt gggatgtt gggatgtt gggatgtt 1560  
 acttggaaattt taggaaagag cagaatttgg caaaaaaaaaaa taaacacaca 1620  
 tactcatcga gaagctgt 1638

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1081

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetische Polynukleins?re

&lt;400&gt; 8

aactgttta attattatgg ggcaggcgag agggggagga atgtatgtgt	60
cgagacggag ccatccaggc caggtagaaa tagagaaagc cgaatgttag acaatatggc	120
agcgttagtag agtaggttagg taggcaagta ctgctagcaa agaggagaag ggttaagctca	180
ctcttcgcat tccacaccgt tagtgtgtca gtttgaacaa aaaaacaatc atcataccaa	240
ttgatggact gtggactggc ttttggaaacg gctttcgga ctgcgattat tcgtgaggaa	300
tcaaggttagg aatttggtca tatttacgga caacagtggg tgattcccat atggagtagg	360
aaaacgagat catggtatcc tcagatatgt tgcggaattc tgttcacccgc aaagttcagg	420
gtgcctcggt gggtttcggt tggctttgc tttgcttc cttgtcttgc catgttaata	480
atagcctagc ctgtgagccg aaacttaggg taggcttagt gttgaaacgt acatatgtat	540
cacgttgact tggtaacc aggcgacctg gtagccagcc atacccacac acgtttttg	600
tatcttcagt atagttgtga aaagtgttagc ggaaatttgt ggtccgagca acagcgtctt	660
tttcttagtag tgcggtcggt tacttggttg acattggat ttggactttg ttgctacacc	720
attcactact tgaagtcgag tgtgaagggt atgattctta gtgtgaaca cctttagtta	780
cgtaatgttt tcattgctgt tttacttgag atttcgattt agaaaaaggat atttaatagc	840
tcgaatcaat gtgagaacag agagaggatg ttctcccta actcgaaagg tatatgaggc	900
ttgtgtttct taggagaatt attattctt tggatgttg cgctttagt tgaaaaggat	960
gaagagacaa aagctggaaat tgtgagcgga taacaagctc aacacttggaa atttaggaaa	1020
gagcagaatt tggcaaaaaa aataaaaaaa aaataaacac acatactcat cgagaagctg	1080
t	1081

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 9

gagccccacca cctgctcctg	20
<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 10	
ctgatgtatt gcgccttta ctaac	25
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artifizielle Sequenz	
<220><223> Primer	
<400> 11	
cccgatgatgcg aagttaagt	20
<210> 12	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artifizielle Sequenz	
<220><223> Primer	
<400> 12	
tacaacagat cacgtatct tttttaag	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> Synthetic Polynucleotide	

&lt;400&gt; 14

ttctcccttc ttcaattca gcttgcttt tcattttta tttccattt ttcagtttt	60
gtttgtgtcg aatttagcca gttgcttctc caagatgaaa aaaaccctg cgcaagttct	120

gtgctgcaag atcctaattcg actttccac cccccacaaa agtaaatgtt ctttgttac	180
attcgcgtgg gtagcttagct ccccgaaatct tcaaaggact tagggactgc actacatcag	240
agtgtgttca cctgggttgc tgcctggttt gaaagaaaag agcagggAAC tcgcgggttc	300
ccggcgaata atcatgcgtat agtcctttgg ccttccaaatg cgcatgtaga gtagacaaca	360
gacagggagg gcaggaagga tcttcaactg agatcctgtt tcttgttgg taagtccgtat	420
gaaagggaaat tcgtatgaga ttggagagga tgccgaagag gtaacccctt ttgtt	475

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 52

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 15

tatagggcga attggagctc cgccggcggaa agaggttaacg cttttgtta ac	52
--	----

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 16

ctaaacggaa ctcgcattta aatctcggtt tcgacactgg atgg	44
--	----

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 55

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 17

gcgagttccg tttagacgctt tttaacttg tttaattatt atggggcagg cgaga	55
--	----

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Primer

<400> 18

cggggaaatgc gctgttttc gacactggat ggcggcgta 40

<210> 19

<211> 43

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Primer

<400> 19

gcagcgcatt ccccggtac cgctctcgac taggtgatta gcg 43

<210> 20

<211> 51

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Primer

<400> 20

aaaagctggg taccgggccc actagtcgag agttaaccgt gactacagct a 51

<210> 21

<211> 11582

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220><223> Synthetische Polynukleins?re

<400> 21

ggacgcgccc ttagcggcg cattaagcgc ggccgggtgt gtggttacgc gcagcgtgac 60

cgctacactt gccagcgcgcc tagcgccgc tccttcgct ttcttcctt ccttctcg 120

cacgttcgccc ggcttcccc gtcagctct aaatcggggg ctccctttag gttccgatt 180

tagtgctta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatgggt cacgtatgg 240

gccatcgccc ttagacacgg ttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tcttaatag 300

tggactcttgc ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggcttatt ctttgattt 360

ataaggatt ttgccgattt cggcctattt gttaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 420

taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgtt tacaatttcg cggcattcgc cattcaggct 480



tgctatcggt ttagacccaa aaatggttgc cacttgtac tctagtgata gaccaagagt	2400
ctataccatc actgctgccg atgactatca atttcctcc caatatcaac ctggtggtgt	2460
cactatcacc ttgttctctg ccaacatcga cgctataaca tctttgtccg tcggtggtga	2520
attggtattc caaacctcg tccatggttt agtattgggt gccaccatct atttgattgg	2580
tttcgacggt acaaccgtca ttactagacg cgttgtgcc aacaatggtt taaccactgg	2640
tactgacaac ttgatgccat tcaacttggt aatccctacc aacgaaatca cacaaccaat	2700
cacatccatc aaattggaaa ttgtcacctc caaatccggt ggtcaagccg gtgaccaaat	2760
gtcatggagt gctagaggtt cattagccgt aaccatccac ggtggtaact atccctgggc	2820
cttgagacct gtcactttag tcgcctatga aagagtgtc actggttccg tcgttactgt	2880
tgccgggttt tcaaacttcg aattgatccc aaacccagaa ttggccaaaa acttggttac	2940
cgaatatggt agattcgacc ctgggtctat gaactataca aaattgatct tatccgaaag	3000
agacagattt ggtatcaaaa ctgtctggcc tactagagaa tataccgact ttagagaata	3060
tttcatggaa gtcgcccact taaattcccc attgaaaatc gccgggtgc ttgggtttaa	3120
ggacatcatt agagccatta gaagaatagc cgtctgagcg gccgcctcga ctcagtaact	3180
acaataaaaa gattcttggtt ttcaagaact tgtcatttgt atagttttt tatattgttag	3240
ttgttctatt ttaatcaaat gtttagcgtga tttatattt tttcgcctc gacatcatct	3300
gcccagatgc gaagtttaagt ggcgcagaaag taatatcatg cgtcaatcgt atgtgaatgc	3360
tggtcgctat actgctgtcg attcgatact aacgcgcaca tccagtgctg aaaacgagat	3420
ttaaatgcga gttccgttta gacgcgttta aactgttta attattatgg ggcaggcgag	3480
agggggagga atgtatgtgt gtgaggcgagg cgagacggag ccatccaggc caggtagaaa	3540
tagagaaagc cgaatgttag acaatatggc agcgtatgt agtaggttagg taggcaagta	3600
ctgctagcaa agaggagaag ggtaaagctca ctcttcgcatt tccacaccgt tagtgtgtca	3660
gtttgaacaa aaaaacaatc atcataccaa ttgtatggact gtggactggc ttttggaaacg	3720
gctttcgga ctggcattat tcgtgaggaa tcaaggtagg aatttggtca tattttacggaa	3780
caacagtggg tgattccat atggagtagg aaaacgagat catggtatcc tcagatatgt	3840
tgcggaaattc tggcaccgc aaagttcagg gtgtctgtt gggtttcggg tggctttgc	3900
tttgcttc ccttgtcttg catgttaata atagccttagc ctgtgagccg aaacttaggg	3960
taggcttagt gtggaaacgt acatatgtat cacgttgcgt tggtttaacc agggacactg	4020
gtagccagcc atacccacac acgttttttgc tatcttcagt atagttgtga aaagtgtacg	4080

gaaaatttgt ggtccgagca acagcgtctt tttctagtag tgccgtcggt tacttggttg	4140
acatggat ttggactttg ttgctacacc attcactact tgaagtcgag tgtgaagggt	4200
atgatttcta gtggtaaca ccttagtta cgtaatgtt tcattgtgt tttacttgag	4260
attcgattg agaaaaaggt attaatagc tcgaatcaat gtgagaacag agagaagatg	4320
ttctcccta actcgaaagg tatatgagc ttgtgttct taggagaatt attattctt	4380
tgttatgttgcgcttgcgtgt tgaaaaaggt gaagagacaa aagctggaat tgtgagcgg	4440
taacaagctc aacacttgaa atttaggaaa gagcagaatt tgccaaaaaa aataaaaaaa	4500
aaataaacac acatactcat cgagaagctg taccgtcgac ggcgcgccga tgtccaaactt	4560
acaagaccaa acccaacaaa tcgtccctt tatcagatcc ttatataatgc ctactaccgg	4620
tcctgcttctt attcctgatg acacccgttggaaaacacacc ttgagatccg aaacttcaac	4680
ctataacttg actgtcggtg acactggttc tggttaatc gtttcttcc ctgggttcc	4740
tggtaatttgcgtgtcc actatacctt acaaggtaac ggtaactata agttcgatca	4800
aatgttgttgcgtgtcc actatacctt acaaggtaac ggtaactata agttcgatca	4860
atcttaacc gtcagatcat ccactttgcc ttgtgtgtc tatgcttga acggtaaat	4920
caacgctgtc acatttcaag gttccttgcc cgaattgacc gatgtctcct ataacggttt	4980
aatgtccgct actgccaata tcaatgacaa aattggtaac gtcttagtcg gtgaagggt	5040
tactgttttgcgtgtcc actatacctt acaaggtaac ggtaactata agttcgatca	5100
tcctgctatc gtttagacc caaaaatgtt tgccacttgt gactctagtg atagaccaag	5160
agtctataacc atcactgctg ccgtatgacta tcaattctcc tcccaatatac aacctgg	5220
tgtcactatc acctgttct ctgccaacat cgacgctata acatcttgtt ccgtcggtgg	5280
tgaattggta ttccaaacct ccgtccatgg tttagtattg ggtgccacca tctatttgat	5340
tggtttcgac ggtacaaccg tcattactag agccgttgct gccaacaatg gtttaaccac	5400
tggtaactgac aacttgatgc cattcaactt ggtaatccct accaacgaaa tcacacaacc	5460
aatcacatcc atcaaattgg aaattgtcac ctccaaatcc ggtggtaag ccgggtgacca	5520
aatgtcatgg agtgctagag gttcattagc cgtaaccatc cacgggtgtt actatctgg	5580
tgccttgaga cctgtcactt tagtcgcata tgaaagagtt gctactgggtt ccgtcggttac	5640
tgttgccggt gtttcaaact tcgaattgtt cccaaaccca gaattggcca aaaacttggt	5700
taccgaatatttgcgtgtcc accctggtgc tatgaaactat acaaaattga tcttataccgaa	5760
aagagacaga ttgggtatca aaactgtctg gcctactaga gaatataccg acttttagaga	5820

atatttcatg gaagtcgccc acttaaattc cccattgaaa atcgccgtg ccttggttt	5880
taaggacatc attagagcca ttagaagaat agccgtctga gcggccgcct cgactcgat	5940
ctgacaataa aaagattctt gtttcaaga acttgcatt tgtatagttt tttatattg	6000
tagttgtct atittaatca aatgttagcg tgatttatat tttttcgc ctcgacatca	6060
tctgcccaga tgcaagttt agtgccaga aagtaatatc atgcgtcaat cgtatgtgaa	6120
tgctggtcgc tatactgctg tcgattcgat actaacgccc ccatccagtg tcgaaaagca	6180
gcccattccc cgggtaccgc tctcgactag gtgattagcg gggggagatg aaaagtgtta	6240
caacgtttgt ctgcaccct gtaaccttat actattgaac aaaccaacta aaacaaaaaa	6300
aaaaactact atcaacaaaa cttcgagctt taaccaagt tatcaattgt taaaatgac	6360
tctaaatttc taataccctt attcttcta ttcttcttct tcttttaac tatactact	6420
tatattctat taatatcac attacgttt gtattacatg actactcttgc tcaaccagga	6480
cgttagtggtt ccataacctc aggttcagcc ggctcatgtt ctccgaatc gtacattatt	6540
catcgctcggtt acctctccat tccgttattt tatccactct ttgttctct caattcaaga	6600
attattcact ttaaccactt caacgaaatc aaataaaact ccgtcaatc agtacagtca	6660
ggaatcacca ccctggacac tcccttccat tgtgtttgtg tttgtgttg tactttcatt	6720
cattgtccct tttgacaat ataaaggtaa aacagagagc tatagtatat cttggacaa	6780
ttgtgattta gtcactttga aagtgttattt atttgatcca gtgtacacaa tatctcgca	6840
ggacggcacc atggcttgcc ttattccgttga gaatttaagg aacccaaaaa aggtcacga	6900
aaatagattt cctacttaggg cttactacta tgatcaggat attttcaat ctctcaatgg	6960
gccttggctt ttgcgttgtt ttgtatgcacc tcttgacgctt ccggatgcta agaattttaga	7020
ctggaaacg gcaaagaaat ggagcaccat ttctgtgcac tcccatggg aacttcagga	7080
agactggaag tacggtaaac caatttacac gaacgtacag taccctatcc caatcgacat	7140
cccaaatcct cccactgtaa atcctactgg tgtttatgtc agaacttttg aatttagattc	7200
gaaatcgattt gagtgcgttcg agcacagattt gagatttgcg ggtgtggaca attttacga	7260
gctttatgtt aatggtcaat atgtgggtttt caataagggg tcccgtaacg gggctgaattt	7320
tgatatccaa aagtacgtttt ctgagggcga aaacttagtg gtcgtcaagg ttttcaatgt	7380
gtccgatcc acttatatcg aggaccaaga tcaatgggg ctctctggta tttacagaga	7440
cgtttctta ctaaaattgc ctaagaaggc ccatattgaa gacgttaggg tcactacaac	7500
ttttgtggac tctcgtatc aggtgcaga gctttctgtg aaagttgtatc tccagggttc	7560
ttctttagat cacaatcaattt tcaacttta cgaacctgaa gatggatcta aagtttacga	7620
tgcaagctctt ttgttgaacg aggagaatgg gaacacgact tttcaacta aagaatttat	7680

ttccttctcc accaaaaaga acgaagaaac agcttcaag atcaacgtca aggccccaga	7740
acatggacc gcagaaaatc ctacttgcata caagtaccag ttggatttaa ttggatctga	7800
tggcagtgtg attcaatcta ttaagcacca tggatgttcc agacaagtgg agttgaagga	7860
cggtaacatt acigttaatg gcaaagacat tctctttaga ggtgtcaaca gacatgtca	7920
ccatccaagg ttcggtagag ctgtgccatt agatttgtt gtagggact tgattctaat	7980
gaagaagttt aacatcaatg ctgttcgtaa ctcgcattat ccaaccatc ctaaggtgt	8040
tgacctttc gataagctgg gttctgggt cattgacgag gcagatctt aaactcatgg	8100
tgttcaagag ccatttaatc gtcatacgaa ctggaggctt gaatatccag atactaaaaa	8160
taaactctac gaigttaatg cccattactt atcagataat ccagagtacg aggtcgcgt	8220
cttagacaga gttcccaac ttgtcctaag agatgtcaat catccttcga ttattatctg	8280
gtccttgggt aacgaagctt gttatggcag aaaccacaaa gccatgtaca agtttaattaa	8340
acaattggat cctaccagac ttgtgcatta tgagggtgac ttgaacgc ttgatgcaga	8400
tatcttagt ttcatgtacc caacattga aattatggaa agtggagga agaaccacac	8460
tgtatggaaat ggttaagttt gaaaggctt gatcttgtt ggttacggcc atgcaatgg	8520
taacggctt ggctcttga aagaatatca agatgttca tacaaggaga agtttacca	8580
aggtggctt atctggaaat gggcaatca cggatttttca ttcaagatgtt tagtactgc	8640
agatggtaag ttgcataaag cttatgcata ttgtgggtac tttaaggaag aggttcatga	8700
cggagtgtt atcatggatg gtttggtaa cagtggatc aatcctactc cggccctgt	8760
agagtataag aaggttattt aaccgttca tattaaaatt ggcacggat ctgttacaaat	8820
cacaataag cacgacttca ttacgacaga ccacttattt tttatcgaca aggacacggg	8880
aaagacaatc gacgttccat cttaaagcc agaagaatct gttactattt cttctgtata	8940
aacttatgtt gttggcggtt taaaatgtt tgctgggttt ctaaaggcag gtcataat	9000
tgcctggggc caagctgaac ttccatttttttttggatcag agacacggc	9060
aaaagctgca aagatcaacg acggtaaacg ttatgtctca gttgaatcca gtggattgca	9120
ttttatctt gacaaattttt tgggtttttt taaaatgtt taaaatgtt taaaatgtt	9180
ttccagcaag ttgggggtt cttcaatcac ttctggaga cttccaaacga ataatgtga	9240
accttagggac tttaagaact ggaagaagta caatattgtt taaatgttcaaaaatcca	9300
tggatgtgtt gtcggaaaat gttctatgg ttctctgtt gtttttttttggatcag	9360
actatgtggc cggtaacca gttttgttcc ctttttttttggatcag agacacggc	9420
gtttatgtt gacaaattttt tgggtttttt taaaatgtt taaaatgtt taaaatgtt	9480
catacgagcc ggaaggatcaa agtgttcaacg ctgggggttcc taaaatgtt taaaatgtt	9540

attaattgcg ttgcgctcac tgcccgctt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca	9600
ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggttgcgt attggcgct cttccgcttc	9660
ctcgctact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgccc cgagcggat cagctcactc	9720
aaaggcggta atacggttat ccacagaatc agggataac gcaggaaaga acatgtgagc	9780
aaaaggccag caaaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgccc ttgctggcgt tttccatag	9840
gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc	9900
gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaaac tccctcggtc gctctccgt	9960
tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgccttctc cttcggaa gcgtggcgt	10020
ttctcatagc tcacgctgta ggtatcttag ttccgggttag gtcgttcgt ccaagctggg	10080
ctgtgtgcac gaaccccccgttccagccgaa ccgtcgcc ttatccggta actatcgct	10140
tgagtccaaac ccggtaaagac acgacttatac gccactggca gcagccactg gtaacaggat	10200
tagcagagcg aggtatgttag gcccgtctac agagtcttg aagtgggtgc ctaactacgg	10260
ctacactaga aggacagttat ttggatctg cgctctgctg aagccagttt cttcggaaa	10320
aagagtttgtt agctttgttccggccaaaca aaccaccgtt ggttagccgtt gttttttgtt	10380
ttgcaaggcag cagattacgc gcagaaaaaaa aggtatctcaa gaagatcctt tgatctttc	10440
tacgggtct gacgctcagt ggaacgaaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt	10500
atcaaaaagg atcttcacctt agatccctttt aaattaaaaa tgaagttta aatcaatcta	10560
aagtatataat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggccatct	10620
ctcagcgtatc tgcattttc gttcatccat agttgcctga ctcccgctg tgcataac	10680
taacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgtgcata gataaccgc gagacccacg	10740
ctcacccggctt ccagattttt cagcaataaa ccagccagcc ggaaggcccg agcgcagaag	10800
tggcctgca actttatccg cttccatcca gtctattaaat ttttgcggg aagcttagat	10860
aagtagttcg ccagttataa gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtgg	10920
gtcacgctcg tggttggta tggcttcattt cagctccgggt tcccaacgtt caagggcgtt	10980
tacatgatcc cccatgttgtt gcaaaaaagg gtttagctcc ttccggcttc cgtatgtt	11040
cagaagtaag ttggcccgag tggatctactt catggttatg gcagcactgc ataattctt	11100
tactgtcatg ccatccgtaa gatgctttc tgcgtactggt ggtactcaa ccaagtcatt	11160
ctgagaatag tggatcgccgacccggatgg ctctggccc ggtcaataac gggataatac	11220
cgcgccacat agcagaactt taaaagtgtt catcattggaa aacgttctt cggggcgaaa	11280

actctcaagg atttaccgc tggtgagatc cagttcgatg taacccactc gtgcacccaa 11340  
 ctgatcttca gcatcttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca 11400  
 aaatgccca aaaaaggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactttct 11460  
 ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttatgtctc atgagcggat acatattga 11520  
 atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttcccgaa aagtgccacc  
 tg 11582

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 22

gacatcaactg tctttcccc ttaatgatc 29

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 23

tcagcaagca tcaataatcc ctttggttc 29

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 24

gaaagaaaga cgttggtctc tacgcttg 28

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 25

agattataag ttccctggggc tttaacccac

29