	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0122849 (43) 공개일자 2016년10월24일
<p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 15/117</i> (2010.01) <i>A61K 39/108</i> (2006.01) <i>A61K 39/245</i> (2006.01) <i>A61K 45/00</i> (2006.01) <i>A61K 47/48</i> (2006.01) <i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>A61K 9/127</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류 <i>C12N 15/117</i> (2013.01) <i>A61K 39/0258</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-7026797</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2015년02월27일 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2016년09월27일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/054131</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2015/128461 국제공개일자 2015년09월03일</p> <p>(30) 우선권주장 61/946,372 2014년02월28일 미국(US)</p>		<p>(71) 출원인 바이엘 애니멀 헬스 게엠베하 독일 51373 레베르쿠센 카이저-빌헬름-알레 10</p> <p>(72) 발명자 아이커 안드레아 독일 41238 뮌헨글라드바흐 루케스 101 벨만 헤르만 독일 42349 부퍼탈 마슈트벡 3아 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 특허법인코리아나</p>
전체 청구항 수 : 총 42 항		
(54) 발명의 명칭 면역자극성 플라스미드		

(57) 요약

본 발명은 면역조절자 조성물 및 이용 방법뿐 아니라 제조 방법에 관한 것이다. 면역조절자 조성물은 수령자 대상체에서 면역 응답성을 유발할 수 있는, 면역자극성 플라스미드 또는 DNA 서열을 포함한다. 나아가, 면역자극성 플라스미드, 또는 DNA 서열은 집단 내 항생제 내성의 수평적 이동 가능성을 감소시키는데 도움이 되도록 항생제 내성 코딩 서열을 포함하지 않는다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/245 (2013.01)

A61K 45/00 (2013.01)

A61K 47/48046 (2013.01)

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 9/1272 (2013.01)

C12N 2320/31 (2013.01)

C12N 2710/16734 (2013.01)

C12N 2710/16771 (2013.01)

(72) 발명자

문네스 마르크

독일 40699 에르크라트-호흐달 암 쉘멜스캠프헨 14

쇼어 로미나

미국 66219 캔자스주 르넥사 스워너 드라이브 9311

아브라함 엘버트

미국 66216 캔자스주 쇼니 웨스트 72번 스트리트
14805

바이쓰 크리스티안

독일 51381 레버쿠젠 임바흐 27

펠트취스 엘리자베트

독일 51465 베르기쉬 글라드바흐 자우어브루히슈트
라체 18

명세서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO: 1 의 서열과 89% 이상의 서열 상동성을 갖는 핵산 분자를 포함하는 면역자극성 DNA 서열 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 핵산 분자가 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 및 99% 로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 SEQ ID NO: 1 의 서열과의 서열 상동성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 면역자극성 DNA 서열 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 핵산 분자가 SEQ ID NO: 1 을 포함하는, 면역자극성 DNA 서열 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는, 면역자극성 DNA 서열 조성물.

청구항 5

SEQ ID NO: 4 의 서열과 84% 이상의 서열 상동성을 갖는 핵산 분자를 포함하는 면역자극성 DNA 서열 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 핵산 분자가 SEQ ID NO: 4 의 서열과 85% 이상의 서열 상동성을 포함하는, 면역자극성 DNA 서열 조성물.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 핵산 분자가 SEQ ID NO: 4 의 서열과 86% 이상의 서열 상동성을 포함하는, 면역자극성 DNA 서열 조성물.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 핵산 분자가 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 및 99% 로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 SEQ ID NO: 4 의 서열과의 서열 상동성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 면역자극성 DNA 서열 조성물.

청구항 9

제 5 항에 있어서, 핵산 분자가 SEQ ID NO: 4 를 포함하는, 면역자극성 DNA 서열 조성물.

청구항 10

제 5 항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는, 면역자극성 DNA 서열 조성물.

청구항 11

하기를 포함하는 면역조절자 조성물:

- a. SEQ ID NO: 1 의 서열과 89% 이상의 서열 상동성을 갖는 핵산 서열; 및
- b. 리포솜 전달 비히클.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 핵산 분자가 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 및 99% 로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 SEQ ID NO: 1 의 서열과의 서열 상동성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 면역조절자 조성물.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 핵산 분자가 SEQ ID NO: 1 을 포함하는, 면역조절자 조성물.

청구항 14

제 11 항에 있어서, 리포솜 전달 비히클이 N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA) 및 콜레스테롤; N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTAP) 및 콜레스테롤; 1-[2-(올레오일옥시)에틸]-2-올레일-3-(2-히드록시에틸)이미다졸리늄 클로라이드 (DOTIM) 및 콜레스테롤; 및 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (DDAB) 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택된 지질 쌍을 포함하는, 면역조절자 조성물.

청구항 15

제 11 항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는, 면역조절자 조성물.

청구항 16

하기를 포함하는 면역조절자 조성물:

- a. SEQ ID NO: 4 의 서열과 84% 이상의 서열 상동성을 갖는 핵산 서열; 및
- b. 리포솜 전달 비히클.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 핵산 분자가 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 및 99% 로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 SEQ ID NO: 4 의 서열과의 서열 상동성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 면역조절자 조성물.

청구항 18

제 16 항에 있어서, 핵산 분자가 SEQ ID NO: 4 를 포함하는, 면역조절자 조성물.

청구항 19

제 16 항에 있어서, 리포솜 전달 비히클이 N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA) 및 콜레스테롤; N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTAP) 및 콜레스테롤; 1-[2-(올레오일옥시)에틸]-2-올레일-3-(2-히드록시에틸)이미다졸리늄 클로라이드 (DOTIM) 및 콜레스테롤; 및 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (DDAB) 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택된 지질 쌍을 포함하는, 면역조절자 조성물.

청구항 20

제 16 항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는, 면역조절자 조성물.

청구항 21

대상체에 면역조절자 조성물을 투여하는 것을 포함하는 대상체에서의 면역 응답성을 자극하는 방법으로서, 상기 면역조절자 조성물이 SEQ ID NO: 1 의 서열과 89% 이상의 서열 상동성을 갖는 핵산 서열 및 리포솜 전달 비히클을 포함하는, 방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 리포솜 전달 비히클이 다층 소포 지질 및 압출된 지질로 이루어진 군으로부터 선택된 지질을 포함하는, 방법.

청구항 23

제 21 항에 있어서, 리포솜 전달 비히클이 N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA) 및 콜레스테롤; N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTAP) 및 콜레스테롤

스테롤; 1-[2-(올레오일옥시)에틸]-2-올레일-3-(2-히드록시에틸)이미다졸리늄 클로라이드 (DOTIM) 및 콜레스테롤; 및 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (DDAB) 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택된 지질 쌍을 포함하는, 방법.

청구항 24

제 21 항에 있어서, 투여가 정맥내, 근육내, 진피내, 복강내, 피하, 분무로써, 에어로졸로써, 난 내, 경구, 안구내, 기관내 및 비강내로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 25

제 21 항에 있어서, 면역조절자 조성물이 생물작용제를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 생물작용제가 면역 증강자 단백질, 면역원, 백신, 항균제 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 27

제 21 항에 있어서, 감염물 (infectious agent) 에 노출 전에 투여되는, 방법.

청구항 28

제 21 항에 있어서, 감염물에 노출 후에 투여되는, 방법.

청구항 29

제 21 항에 있어서, 자극된 면역 응답성이 비(非)항원 특이적 면역 응답성, 항원 특이적 면역 응답성, 선천적 면역 응답성, 후천적 면역 응답성, 체액성 면역 응답성, 세포-매개 면역 응답성 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 30

제 21 항에 있어서, 대상체가 포유동물 종, 양식 종 및 조류 종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 31

제 21 항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 32

대상체에 면역조절자 조성물을 투여하는 것을 포함하는 대상체에서의 면역 응답성 자극 방법으로서, 상기 면역조절자 조성물은 SEQ ID NO: 4 의 서열과 84% 이상의 서열 상동성을 갖는 핵산 서열 및 리포솜 전달 비히클을 포함하는, 방법.

청구항 33

제 32 항에 있어서, 리포솜 전달 비히클이 다층 소포 지질 및 압출된 지질로 이루어진 군으로부터 선택된 지질을 포함하는, 방법.

청구항 34

제 32 항에 있어서, 리포솜 전달 비히클이 N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA) 및 콜레스테롤; N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTAP) 및 콜레스테롤; 1-[2-(올레오일옥시)에틸]-2-올레일-3-(2-히드록시에틸)이미다졸리늄 클로라이드 (DOTIM) 및 콜레스테롤; 및 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (DDAB) 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택된 지질 쌍을 포함하는, 방법.

청구항 35

제 32 항에 있어서, 투여가 정맥내, 근육내, 진피내, 복강내, 피하, 분무로써, 에어로졸로써, 난 내, 경구, 안구내, 기관내 및 비강내로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 36

제 32 항에 있어서, 면역조절자 조성물이 생물작용제를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 37

제 36 항에 있어서, 생물작용제가 면역 증강자 단백질, 면역원, 백신, 항균제 및 이의 임의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 38

제 32 항에 있어서, 감염물에 노출 전에 투여되는, 방법.

청구항 39

제 32 항에 있어서, 감염물에 노출 후에 투여되는, 방법.

청구항 40

제 32 항에 있어서, 자극된 면역 응답성이 비항원 특이적 면역 응답성, 항원 특이적 면역 응답성, 선천적 면역 응답성, 후천적 면역 응답성, 체액성 면역 응답성, 세포-매개 면역 응답성, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 41

제 32 항에 있어서, 대상체가 포유동물 중, 양식 종 및 조류 종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 42

제 32 항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 면역자극성 플라스미드에 관한 것이다. 이 플라스미드는 항생제 내성 유전자를 포함하지 않는다. 이 플라스미드는 항생제 내성 유전자가 아닌 선택가능하거나 선별가능한 마커 유전자 (예, LacZ 유전자) 를 포함할 수 있다. 대안적으로, 플라스미드는 임의의 선택가능하거나 선별가능한 마커 유전자가 없을 수 있다.

배경 기술

[0002] 비(非)메틸화 CpG 모티프는 척추동물 DNA 에서보다 박테리아 DNA 에서 훨씬 더 자주 발생한다. 이들 모티프는 숙주 방어 메커니즘을 활성화시키고 선천적 및 후천적 면역 응답성을 도모한다. CpG 모티프 및 그의 면역자극성 효과는 문헌 [Krieg, *Ann. Rev. Immunol.* 20:709-760 (2002)] 에 검토되어 있다.

[0003] 다수의 CpG 모티프를 함유하는 면역자극성 플라스미드가 앞서 개발되었고, 이는 플라스미드 및 양이온성 리포솜 전달 비히클을 포함하는 면역조절자 조성물에서, 조류 및 소 종에 투여시 면역 응답성 유발에 있어 유효한 것으로 밝혀져 있다. 본원에서 그 전문이 참조 인용되고 있는 문헌 미국 특허 출원 공보 제 2012/0064151 A1 호 (조류 종) 및 2013/0295167 A1 (소 종) 를 참조한다. 이 플라스미드, pMB75.6 는 길이가 4242 bp 이고, 288 개의 CpG 디뉴클레오타이드를 포함한다. pMB75.6 의 맵을 도 1 에 나타내었고, pMB75.6 의 뉴클레오타이드 서열을 SEQ ID NO: 2 로서 제공하였다. 미국 특허 출원 공보 제 2012/0064151 호에 기재된 바와 같이, pMB75.6 를 함유하는 면역조절자 조성물은 난자 내 (*in ovo*) 투여되는 경우 닭으로부터 전염병을 방지하는 비(非)항원-특이적 면역 응답성을 유발하였다. 상기 비항원 특이적 면역 응답성은 하나 이상의 생물작용제 (biological agent), 예컨대 백신의 투여로 추가 강화되었다. 추가적으로, pMB75.6 플라스미드를 함유하는 면역조절자 조성물은 아췌번트 효과를 갖고 백신의 효능 증가를 유발하는 것으로 밝혀졌다. 유사하게, 미국

특허 출원 제 2013/0295167 호에 기재된 바와 같이, pMB75.6 함유 면역조절자 조성물은 소를 전염병으로부터 보호하는 소의 비항원-특이적 면역 응답성을 유발하였다.

[0004] 그러나, 도 1 에 나타난 바와 같이, pMB75.6 플라스미드는 카나마이신-내성 유전자 (Kan^R) 를 함유한다. 항생제-기반 선택 및 제조 시스템은, 항생제 내성 유전자의 환경 내 박테리아로의 수평적 이동에 대한 우려로 인해 점차적으로 냉대되어지고 있다. 항생제 내성 유전자의 잠재적인 수평 이동은 대상체에 직접적으로 투여되는 벡터에 경우 특히 염려되고 있다 (예, 유전자 치료요법 또는 DNA 예방접종에 사용되는 벡터 또는 pMB75.6 와 같은 면역자극성 플라스미드). 따라서, 선행 기술에서는 항생제 내성 유전자를 결여하면서 대상체에 면역 응답성을 유도할 수 있는 면역자극성 플라스미드에 대한 요구가 존재한다.

발명의 내용

[0005] **본 발명의 개요**

[0006] 본 발명은 면역자극성 플라스미드에 관한 것이다. 면역자극성 플라스미드는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, 또는 그의 조합의 서열과 89% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 면역자극성 플라스미드는 SEQ ID NO: 4 의 서열과 84% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 면역자극성 플라스미드는 SEQ ID NO: 1 의 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 면역자극성 플라스미드는 SEQ ID NO: 4 의 서열을 포함할 수 있다.

[0007] 기타 측면에서, 면역자극성 플라스미드는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, 또는 그의 조합의 서열과 89% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열로 이루어질 수 있다. 일부 측면에서, 면역자극성 플라스미드는 SEQ ID NO: 4 의 서열과 84% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산 분자로 이루어질 수 있다. 일부 측면에서, 면역자극성 플라스미드는 SEQ ID NO: 1 의 서열로 이루어질 수 있다. 일부 측면에서, 면역자극성 플라스미드는 SEQ ID NO: 4 의 서열로 이루어질 수 있다.

[0008] 일부 측면에서, 면역자극성 플라스미드는 바람직하게 전장 (full-length) 또는 작용성 선택가능 또는 선별가능 마커를 인코딩하는 (encoding) 핵산 서열을 포함하지 않는다. 다른 측면에서, 면역자극성 플라스미드는 항생제 내성 유전자가 아닌 선택가능 또는 선별가능 마커를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0009] 본 발명은 또한 면역자극성 플라스미드, 또는 DNA 서열 (본원 기재), 및 약학적으로 허용가능한 담체 중 임의의 것을 포함하는 약학적 제형에 관한 것이다.

[0010] 본 발명은 나아가 양이온성 리포솜 전달 비히클, 및 본원에 기재된, 면역자극성 플라스미드 또는 DNA 서열 중 임의의 것을 포함하는 면역조절자 조성물에 관한 것이다.

[0011] 일부 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 면역자극성 플라스미드 또는 DNA 서열을 이용하는 방법에 관한 것이다. 적합한 이용 방법은 대상체로의 치료적 투여를 포함한다. 이러한 치료적 투여는 예방 치료, 집단 예방 (metaphylactic) 치료, 및 대상체 또는 대상체들의 감염후 치료를 포함한다.

[0012] 본 발명은 대상체에서 면역 응답성을 자극 또는 유발시키는 방법에 관한 것이다. 일부 측면에서, 본 방법은 대상체에 본원에 기재된 면역조절자 조성물을 투여함으로써 대상체에서 면역 응답성을 자극하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 본 방법은 대상체에 본원에 기재된, 면역자극성 플라스미드, 또는 DNA 서열을 투여함으로써 대상체에서 면역 응답성을 자극하는 것을 포함한다.

[0013] 기타 목적 및 특징들은 이하 부분적으로 분명해지고 부분적으로 주목될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 하기의 도면은 본 발명의 명세서의 일부를 형성하고, 이는 본 발명의 특정 측면들을 추가로 입증하도록 포함된다. 이들 도면들 중 하나 이상을 본원에 제시된 특정 구현예들의 상세한 설명과 조합하여 참조함으로써 본 발명이 더 양호하게 이해될 것이다.

도 1 은 pMB75.6 플라스미드의 맵을 나타낸다;

도 2 는 pGCMB75.6 플라스미드의 맵을 나타낸다;

도 3 은 pLacZ75.6 플라스미드의 맵을 나타낸다; 및

도 4 는 본원에 기재된 면역조절자 조성물이 병원성 바이러스로 챌린지된 수령자 대상체의 생존가능성을 증가시

킨다는 점을 그래프로 설명한다 (도 4A 및 도 4B).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명에 따르면, 수령자 대상체에 면역 응답성을 유발할 수 있는 조성물뿐 아니라 사용 방법이 발견된 바 있다. 특히, 본 발명은 신규한 핵산 조성물, 또는 면역조절자 조성물 및 그의 용도에 관한 것이다. 이러한 면역조절자 조성물은 항생제 내성 유전자 또는 코팅 서열을 포함하지 않고 번식되고 증강된 GC 함량, CpG 모티프를 갖는 본원에 기재된 DNA 서열을 포함할 수 있다는 점을 발견했다. 본 발명의 핵산 서열은 대상체에 면역 응답성을 자극 또는 증강시켜, 당업계에 공지된 다른 예방 및 치료 방법 보다 안전성을 유의미하게 강화시키면서 전염병을 예방 또는 치료하는데 이용될 수 있다. 본 발명은 미생물, 예컨대 제한 없이, 바이러스, 박테리아, 곰팡이, 진균, 효모, 기생충 및 기타 당업계에 공지된 미생물에 의해 야기된 전염병 치료 및 예방에 특히 유용하다. 본 조성물 및 면역조절자 조성물을 이용하는 방법은 하기에 더 자세히 논의한다.

[0016] I. 조성물

[0017] 본 발명에서 유용한 조성물, 예컨대 본원에 기재된 것은 일반적으로 전염병의 예방 요법, 집단예방 요법, 또는 치료 요법으로서 이용될 수 있다. 이러한 조성물은 본원에서 면역조절자 조성물로 지칭된다. 면역조절자 조성물은 수령자 대상체에 면역 응답성을 유발할 수 있는, 하나 이상의 면역자극성 플라스미드 또는 면역자극성 DNA 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 면역조절자 조성물은 또한 리포솜 전달 비히클을 포함할 수도 있다.

[0018] A. 핵산

[0019] 일부 측면에서, 본 발명은 전염병 유발물의 치료 또는 예방에 유용한 핵산 분자에 관한 것이다. 본원에 기재된 핵산 분자는 면역자극성 플라스미드 내에 선형의 이중 가닥 또는 단일 가닥 DNA, 아미노산 서열, 리보핵산 (RNA) 또는 그 조합물로서 포함될 수 있다. 일부 측면에서, 본 발명은 핵산 분자, 벡터 및 숙주 세포 (시험관 내, 생체 내, 또는 생체 외) 에 관한 것으로서, 이는 면역자극성 플라스미드 또는 면역자극성 DNA 서열을 함유한다.

[0020] 일부 측면에서, 본 발명은 항생제 내성 유전자를 포함하지 않는, 면역자극성 플라스미드, 또는 DNA 서열에 관한 것이다. 플라스미드는 임의의 선택가능 또는 선별가능 마커 유전자가 없을 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 pGCMB75.6 플라스미드는 임의의 전장 또는 작용적 선택가능 또는 선별가능 마커 유전자를 포함하지 않는다. pGCMB75.6 의 서열을 SEQ ID NO: 1 에 제시한다.

[0021] 일부 측면에서, 본원에 기재된 면역자극성 플라스미드는 전장 또는 작용적 선택가능 또는 선별가능 마커를 코딩하는 핵산 서열을 바람직하게도 포함하지 않는다. 일부 측면에서, 면역자극성 플라스미드는 항생제 내성 유전자를 포함하지 않는다. 예를 들어, 플라스미드는 카나마이신 내성 유전자를 포함하지 않는다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 플라스미드는 바람직하게 면역원을 인코딩하지 않는다.

[0022] 일부 측면에서, 면역자극성 플라스미드는 항생제 내성 유전자가 아닌 선택가능 또는 선별가능 마커 유전자를 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 pLacZMB75.6 플라스미드는 선별가능 마커로서 LacZ 유전자를 포함한다. pLacZMB75.6 의 맵은 도 3 에 제공하고, pLacZMB75.6 의 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 4 로서 제공한다. 도 3 에 나타내는 바와 같이, pLacZMB75.6 는 pGCMB75.6 와 유사하나, LacZ 선별가능 마커를 함유한다.

[0023] pGCMB75.6 또는 pLacZMB75.6 플라스미드의 뉴클레오티드 서열은 유의미하게 그의 면역자극성 특성에 악영향을 끼치지 않으면서 어느 정도까지 다르게 할 수 있다는 점이 이해될 것이다. 일부 측면에서, 본 발명은 pGCMB75.6 의 서열 (SEQ ID NO: 1) 과 89% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 면역자극성 플라스미드에 관한 것이다. 면역자극성 플라스미드는 바람직하게 pGCMB75.6 의 서열 (SEQ ID NO: 1) 과 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 면역자극성 플라스미드는 더욱 바람직하게 pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1) 의 서열을 포함한다.

[0024] 일부 측면에서, 본 발명은 pLacZMB75.6 의 서열 (SEQ ID NO: 4) 과 84% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을

포함하는 면역자극성 플라스미드에 관한 것이다. 면역자극성 플라스미드는 바람직하게 pLacZMB75.6 의 서열 (SEQ ID NO: 4) 과 85% 이상, 86% 이상, 87% 이상, 88% 이상, 89% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 면역자극성 플라스미드는 더욱 바람직하게 pLacZMB75.6 의 서열 (SEQ ID NO: 4) 을 포함한다.

[0025] 일부 측면에서, 본 발명은 pGCMB75.6 의 서열 (SEQ ID NO: 1) 과 89% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열로 이루어진 면역자극성 플라스미드에 관한 것이다. 면역자극성 플라스미드는 바람직하게 pGCMB75.6 의 서열 (SEQ ID NO: 1) 과 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열로 이루어진다. 일부 측면에서, 면역자극성 플라스미드는 더욱 바람직하게 pGCMB75.6 의 서열 (SEQ ID NO: 1) 로 이루어진다.

[0026] 일부 측면에서, 본 발명은 pLacZMB75.6 의 서열 (SEQ ID NO: 4) 과 84% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열로 이루어진 면역자극성 플라스미드에 관한 것이다. 면역자극성 플라스미드는 바람직하게 pLacZMB75.6 의 서열 (SEQ ID NO: 4) 과 85% 이상, 86% 이상, 87% 이상, 88% 이상, 89% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열로 이루어진다. 일부 측면에서, 면역자극성 플라스미드는 더욱 바람직하게 pLacZMB75.6 의 서열 (SEQ ID NO: 4) 로 이루어진다.

[0027] 본 발명의 또 다른 중요한 측면은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 4 에 고 엄격성 조건 하에 하이브리드화하는 핵산 서열을 포함하는 면역 응답성을 자극 가능한 면역자극성 DNA 서열 또는 면역자극성 플라스미드를 제공한다. 적합한 핵산 서열은 본 발명의 핵산과 상동성인, 실질적으로 유사 또는 동일한 것을 포함한다. 일부 측면에서, 상동성 핵산 서열은 SEQ ID NO: 1 와, 또는 각 상보 서열과 적어도 약 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 의 서열 유사성을 가질 것이다. 기타 측면에서, 상동성 핵산 서열은 SEQ ID NO: 4 또는 각 상보 서열과 적어도 약 84%, 85%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 의 서열 유사성을 가질 것이다. 서열 유사성은 당업계에 공지된 많은 알고리즘, 예컨대 문헌 [Altschul, S. F., et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990] 에 기재된 BLAST 를 이용하여 산출될 수 있다. 핵산은 유전적 코드의 축퇴로 인해 상술된 핵산과 서열이 상이할 수 있다. 일반적으로, 참조 서열은 18 개의 뉴클레오타이드, 더욱 통상적으로 30 개 이상의 뉴클레오타이드일 수 있고, 비교 목적을 위해 조성물의 전체 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0028] SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 4 에 하이브리드화될 수 있는 뉴클레오타이드 서열이 본원에 고려된다. 엄격한 하이브리드화 조건은 50°C 이상 및 0.1X SSC (15 mM 염화나트륨/1.5 mM 나트륨 시트레이트) 에서의 하이브리드화와 같은 조건을 포함한다. 또 다른 예는 42°C 에서, 50% 포름아미드, 5X SSC (150 mM NaCl, 15 mM 트리나트륨 시트레이트), 50 mM 나트륨 포스페이트 (pH 7.6), 5X Denhardt 용액, 10% 텍스트란 술페이트, 및 20 µg/ml 변성, 전단된 연어 정자 DNA 의 용액 중 하룻밤 인큐베이션 후, 약 65°C 에서 0.1X SSC 중 세정이다. 예의 엄격한 하이브리드화 조건은, 상기 특이적 조건 만큼 적어도 약 80%, 85%, 90%, 또는 95% 정도 엄격한 하이브리드화 조건이다. 기타 엄격한 하이브리드화 조건은 당업계에 공지되어 있고 또한 본 발명의 핵산의 상동체를 동정하는데 이용될 수 있다 (Current Protocols in Molecular Biology, Unit 6, pub. John Wiley & Sons, N.Y. 1989).

[0029] 본원에 기재된 DNA 분자의 돌연변이 뉴클레오타이드는, 본원에 기재된 바와 같은 면역 응답성을 자극할 능력을 유지하는 핵산 서열을 포함하는 한, 이용될 수 있다. 이러한 돌연변이의 DNA 서열은 통상 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열이 상이할 것이다. 서열 변경은 치환, 삽입, 결실 또는 그의 조합일 수 있다. 클로닝된 유전자의 돌연변이유발 기술은 당업계에 공지되어 있다. 부위 특이적 돌연변이유발 방법은 문헌 [Gustin et al., Biotechniques 14:22, 1993; Barany, Gene 37:111-23, 1985; Colicelli et al., Mol. Gen. Genet. 199:537-9, 1985; 및 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press 1989, pp. 15.3-15.108] 에서 찾을 수 있으며 모두 본원에 참조로서 삽입되어 있다. 요약하면, 본 발명은 대상체 및 그의 변이체 또는 돌연변이체에서 면역 응답성을 자극할 수 있는 핵산 서열에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 기재된 핵산 서열에 의해 인코딩된 중재 RNA 뿐 아니라 임의의 그에 따른 인코딩된 아미노산 서열을 포함한다.

[0030] 면역자극성 플라스미드의 뉴클레오타이드 서열이 SEQ ID NOs. 1 및 4 에 제공된 서열과 다른 경우, 플라스미드 내 CpG 디뉴클레오타이드가 온전히 보존되는 것이 바람직하다. 대안적으로, 플라스미드의 뉴클레오타이드 서열이

CpG 디뉴클레오타이드가 제거되도록 변경되면, 플라스미드의 서열은 플라스미드 내 CpG 디뉴클레오타이드의 총 개수가 동일하게 남도록 또 다른 위치에서 변경될 수 있다. pGCMB75.6 또는 pLacZMB75.6 의 뉴클레오타이드 서열에 이미 존재하는 것에 부가적으로 추가의 CpG 디뉴클레오타이드가 또한 플라스미드에 도입될 수 있다. 따라서, 예를 들어 본원에 기재된 면역자극성 플라스미드는 바람직하게 약 200 개 이상, 약 220 개 이상, 약 240 개 이상, 약 260 개 이상, 약 270 개 이상, 약 275 개 이상, 약 280 개 이상, 약 283 개 이상, 약 285 개 이상, 또는 약 288 개 이상의 CpG 디뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어 면역자극성 플라스미드는 283 개의 CpG 디뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0031] 특히, 본 발명은 본원에 기재된 DNA 서열 또는 면역자극성 플라스미드 중 임의의 것 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 제형물에 관한 것이다.

[0032] B. 면역조절자

[0033] 본원에 기재된 면역성 플라스미드를 사용하기에 적합한 면역조절자 조성물은, 그 전문 내용이 참조로 본원에 인용되는 U.S. 특허 출원 공보 제 2012/0064151 호 A1 (조류 중) 및 제 2013/0295167 호 A1 (소 중) 에 기재되어 있다.

[0034] 면역조절자 조성물은 리포솜 전달 비히클, 및 본원에 기재된, 면역자극성 플라스미드 또는 DNA 서열 중 하나 이상을 포함한다.

[0035] 적합한 리포솜 전달 비히클은 치료된 대상체의 조직에 핵산 분자를 전달할 수 있는 지질 조성물을 포함한다. 리포솜 전달 비히클은 바람직하게 충분한 시간 동안 대상체에서 안정적으로 잔존할 수 있어 핵산 분자 및/또는 생물작용제를 전달할 수 있다. 예를 들어, 리포솜 전달 비히클은 약 5 분 이상, 약 1 시간 이상 또는 약 24 시간 이상 동안 수령자 대상체에서 안정적이다.

[0036] 본 발명의 리포솜 전달 비히클은 세포의 형질막과 융합해 세포 내로 핵산 분자를 전달할 수 있는 지질 조성물을 포함한다. 핵산 분자가 하나 이상의 단백질을 인코딩하는 경우, 핵산:리포솜 복합체는 바람직하게 전달된 핵산 마이크로그램 (μg) 당 총 조직 단백질 밀리그램 (mg) 당 발현된 단백질 약 1 피코그램 (pg) 이상의 트랜스펙션 (transfection) 효율을 가진다. 예를 들어, 핵산:리포솜 복합체의 트랜스펙션 효율은 전달된 핵산 μg 당 전체 조직 단백질 mg 당 발현된 약 10 pg 이상의 단백질; 또는 전달된 핵산 μg 당 전체 조직 단백질 mg 당 발현된 약 50 pg 이상의 단백질일 수 있다. 복합체의 트랜스펙션 효율은 전달된 핵산 μg 당 전체 조직 단백질 mg 당 발현된 단백질 1 펩토그램 (fg) 만큼 낮을 수 있으며, 이때 상기 양은 보다 바람직하다.

[0037] 본 발명의 바람직한 리포솜 전달 비히클은 직경 약 100 내지 500 나노미터 (nm) 이다. 예를 들어, 리포솜 전달 비히클은 직경 약 150 내지 450 nm, 또는 약 200 내지 400 nm 일 수 있다.

[0038] 적합한 리포솜은 임의의 리포솜, 예컨대 예를 들어 당업자에게 공지된 유전자 전달 방법에서 통상 사용되는 것을 포함한다. 바람직한 리포솜 전달 비히클은 다층 소포 (multilamellar vesicle; MLV) 지질 및 압출된 지질을 포함한다. MLV 의 제조 방법은 당업계에 익히 공지되어 있다. 더욱 바람직한 리포솜 전달 비히클은 다중양이온성 지질 조성을 갖는 리포솜 (즉, 양이온성 리포솜) 및/또는 폴리에틸렌 글리콜에 컨쥬게이션된 콜레스테롤 백본을 갖는 리포솜을 포함한다. 예의 양이온성 리포솜 조성물은 이에 제한되는 것은 아니나 하기를 포함한다: N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA) 및 콜레스테롤, N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTAP) 및 콜레스테롤, 1-[2-(올레오일옥시)에틸]-2-올레일-3-(2-히드록시에틸)-이미다졸리늄 클로라이드 (DOTIM) 및 콜레스테롤, 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (DDAB) 및 콜레스테롤, 및 그 조합물. 전달 비히클로서 사용하기 위한 가장 바람직한 리포솜 조성물은 DOTIM 및 콜레스테롤을 포함한다.

[0039] 적합한 핵산 분자는 본원에 기재된 면역자극성 플라스미드 중 임의의 것을 포함한다. 코딩 핵산 서열은 적어도 단백질 또는 펩티드의 일부를 인코딩하나, 비(非)코딩 서열은 단백질 또는 펩티드의 임의의 일부를 인코딩하지 않는다. 본 발명에 따르면, "비코딩"핵산은 전사 단위의 조절 영역, 예컨대 프로모터 영역을 포함할 수 있다. 용어 "빈 (empty) 벡터"는 용어 "비코딩"과 상호교환적으로 사용될 수 있고, 특히 유전자 삽입 없는 플라스미드 벡터와 같이 단백질 코딩 부분의 부재 하 핵산 서열을 지칭한다. 본원에 기재된 플라스미드에 의해 인코딩된 단백질의 발현은 비항원-특이적 면역 응답성의 유발에 요구되지 않는다; 그러므로, 플라스미드는 전사 제어 서열에 작동적으로 연결된 임의의 코딩 서열을 포함할 필요는 없다. 그러나, 추가적인 장점이 면역원 및/또는 사이토카인을 인코딩하는 핵산 서열 (DNA 또는 RNA) 를 조성물에 포함시킴으로써 수득될 수

있다 (즉, 항원-특이적 및 증강된 면역성). 면역원 및/또는 사이토카인을 인코딩하는 이러한 핵산 서열은 본원에 기재된 면역자극성 플라스미드에 포함될 수 있거나, 또는 조성물 내 별도의 핵산에 (예, 별도의 플라스미드) 포함될 수 있다.

[0040] 본원에 기재된 면역자극성 플라스미드로 리포솜을 복합화하는 것 (complexing) 은 당업계의 표준 방법을 이용하거나 또는 U.S. 특허 제 6,693,086 호 (본원에 이들의 내용은 참조로서 그 전문이 통합되어 있음) 에 기재된 대로 달성될 수 있다. 리포솜에 추가되는 플라스미드의 적당한 농도는 전신 면역 응답이 유발되도록 대상체에 충분한 플라스미드를 전달하기에 유효한 농도를 포함한다. 예를 들어, 약 0.1 μg 내지 약 10 μg 의 플라스미드가 약 8 nmol 리포솜과 조합될 수 있거나, 약 0.5 μg 내지 약 5 μg 의 플라스미드가 약 8 nmol 리포솜과 조합될 수 있거나, 또는 약 1.0 μg 의 플라스미드가 약 8 nmol 리포솜과 조합될 수 있다. 조성물 내 플라스미드 대 지질 비 (μg 플라스미드:nmol 지질) 는 중량에 대해 적어도 약 1:1 플라스미드:지질일 수 있다 (예, 1 μg 플라스미드:1 nmol 지질). 예를 들어, 플라스미드 대 지질의 비는 적어도 약 1:5, 적어도 약 1:10, 또는 적어도 약 1:20 일 수 있다. 본원에서 표시된 비는 조성물 내 양이온성 지질의 양을 기반으로 하고, 조성물 내 지질의 총량을 기반으로 하지 않는다. 본 발명의 조성물 내 플라스미드 대 지질의 비는 적합하게 약 1:1 내지 약 1:80 플라스미드:지질 (중량 기준); 약 1:2 내지 약 1:40 플라스미드:지질 (중량 기준); 약 1:3 내지 약 1:30 플라스미드: 지질 (중량 기준); 또는 약 1:6 내지 약 1:15 플라스미드:지질 (중량 기준) 이다.

[0041] C. 생물작용제

[0042] 본원에 기재된 면역조절자 조성물 중 임의의 것은 본원에 기재된 플라스미드 중 하나 이상 및 리포솜 전달 비히클에 추가적으로 하나 이상의 생물작용제를 추가로 포함할 수 있다.

[0043] 적합한 생물작용제는 조류 또는 소의 질병의 예방 또는 치료에 유효한 작용제이다. 이러한 생물작용제는 면역 증강자 단백질, 면역원, 백신, 항균제 또는 이의 임의의 조합물을 포함한다. 적합한 면역 증강자 단백질은 면역성을 증강시키는 것으로 공지된 단백질이다. 비제한적인 예로, 사이토카인 (단백질 패밀리에 포함) 이 공지된 면역성 증강 단백질 패밀리에 포함된다. 적합한 면역원은 체액 및/또는 세포성 면역 응답성을 유발하는 단백질로, 이 면역원을 대상체에 투여하면 대상체의 조직 내 맞닥뜨리는 동일 또는 유사 단백질에 대항하는 면역원-특이적 면역 응답성이 증가된다. 면역원은 박테리아, 바이러스, 기생충 또는 진균에 의해 발현된 병원성 항원을 포함할 수 있다. 바람직한 항원은 대상체에 전염병을 야기하는 유기체로부터 유래된 항원을 포함한다. 본 발명에 따르면, 면역원은 체액 및/또는 세포 면역 응답성을 유발하는 천연 발생 또는 합성적으로 유래된 임의의 단백질 일부일 수 있다. 이와 같이, 항원 또는 면역원의 크기는 그 사이의 임의의 크기를 비롯해, 전장 단백질과 같이 크고 약 5-12 아미노산과 같이 작을 수 있다. 항원은 멀티머 단백질 또는 융합 단백질일 수 있다. 항원은 정제된 항원일 수 있다. 대안적으로, 면역 증강자 단백질 또는 면역원은 면역자극성 플라스미드 또는 면역조절자 조성물에 포함된 또 다른 핵산에 의해 인코딩될 수 있다. 면역 증강자 단백질 또는 면역원이 면역조절자 조성물 내 핵산 분자에 의해 인코딩되는 경우, 면역 증강자 단백질 또는 면역원을 인코딩하는 핵산 서열은, 면역원이 대상체의 조직 내에서 발현되어 대상체에게 비특이적 면역 응답성에 더해 면역원-특이적 면역 응답성을 유발하도록 전사 제어 서열에 작동적으로 연결된다. 면역원성에 대한 선별 기술, 예컨대 병원체 항원 면역원성 또는 사이토카인 활성은 당업자에게 공지되어 있으며, 이는 각종 시험관 내 및 생체 내 어세이를 포함한다.

[0044] 생물작용제가 백신인 경우, 백신은 살아 있는, 전염성, 바이러스, 박테리아 또는 기생충 백신, 또는 사멸된, 비활성화, 바이러스, 박테리아 또는 기생충 백신을 포함할 수 있다. 하나 이상의 백신, 살아있거나 사멸된 바이러스 백신이 본 발명의 면역조절자 조성물과 조합되어 사용될 수 있다. 적합한 백신은 조류 또는 소 종에 대해 당업계에 공지된 것을 포함한다.

[0045] 조류 종에 대한 예의 백신에는 이에 제한되는 것은 아니나 마렉 질병 바이러스 (MDV), 뉴캐슬병 바이러스 (NDV), 닭 빈혈 바이러스 (CAV), 전염성 점액낭염 바이러스 (IBDV), 감염성 기관지염 바이러스 (IBV), 칠면조 헤르페스바이러스 (HVT), 전염성 후두기관염 바이러스 (ILTV), 조류 뇌척수염 바이러스 (AEV), 계두 바이러스 (FPV), 가금 콜레라, 조류 인플루엔자 바이러스 (AIV), 레오바이러스, 조류 백혈증 바이러스 (ALV), 망상내피증 바이러스 (REV), 조류 아데노바이러스 및 출혈 창자염 바이러스 (HEV), 구충류, 및 당업계에 공지된 기타 질병에 대항해 보호하기 위한 당업계에 이용되는 것을 포함한다. 또 다른 실시예에서, 백신은 U.S. 특허 제 5,427,791 호, 제 6,048,535 호, 및 제 6,406,702 호에 의해 기재된 바와 같은 백신일 수 있다. 예를 들어, 마렉 질병에 대항해 보호하기 위한 백신은 본 발명의 면역조절자 조성물과 조합되어 사용될 수 있다.

- [0046] 소 종을 위한 예의 백신에는 비제한적으로 전염성 소 비기관염 바이러스 (IBR) (유형 1 소 헤르페스 바이러스 (BHV1)), 파라인플루엔자 바이러스 유형 3 (PI3), 소 호흡기 세포융합 바이러스 (BRSV), 소 바이러스성 설사 바이러스 (BVDV 유형 1 및 2), 히스토필루스 숨니 (*Histophilus somni*), 마이코플라즈마 보비스 (*Mycoplasma bovis*), 및 당업계에서 공지된 기타 질병에 대해 보호하기 위해 당업계에서 이용되는 것이 포함된다.
- [0047] 생물작용제는 항균제일 수 있다. 적합한 항균제에는 하기가 포함된다: 퀴놀론, 바람직하게 플루오로퀴놀론, β -락탐, 및 마크로라이드-린코사마이드-스트렙토그라민 (MLS) 항생제.
- [0048] 적합한 퀴놀론에는 베노플록사신 (benofloxacin), 빈플록사신 (binfloxacin), 시녹사신 (cinoxacin), 시프로플록사신 (ciprofloxacin), 클리나플록사신 (clinafloxacin), 다노플록사신 (danofloxacin), 디플록사신 (difloxacin), 에녹사신 (enoxacin), 엔로플록사신 (enrofloxacin), 플레록사신 (fleroxacin), 게미플록사신 (gemifloxacin), 이바플록사신 (ibafloxacin), 레보플록사신 (levofloxacin), 로메플록사신 (lomefloxacin), 마르보플록사신 (marbofloxacin), 모시플록사신 (moxifloxacin), 노르플록사신 (norfloxacin), ofloxacin (오픈플록사신), 오르비플록사신 (orbifloxacin), 파주플록사신 (pazufloxacin), 프라도플록사신 (pradofloxacin), 퍼플록사신 (perfloxacin), 사라플록사신 (sarafloxacin), 스파르플록사신 (sparfloxacin), 테마플록사신 (temafloxacin), 및 토수플록사신 (tosufloxacin) 이 포함된다. 바람직한 플루오로퀴놀론에는 시프로플록사신, 다노플록사신, 엔로플록사신, 모시플록사신, 및 프라도플록사신이 포함된다. 적합한 나프티리돈에는 날리딕스산이 포함된다.
- [0049] 적합한 β -락탐에는 페니실린 (예, 아목시실린, 암피실린, 아즈로실린, 벤자틴 페니실린, 벤질페니실린, 카르베니실린, 클록사실린, 코-아목시클라브 [즉 아목시실린/클라불란산], 디클록사실린, 플루클록사실린, 메티실린, 메즐로실린, 나프실린, 옥사실린, 페녹시메틸페니실린, 피페라실린, 프로카인 페니실린, 테모실린, 및 티카르실린); 세팔로스포린 (예, 세파클로르, 세파로늄, 세파만돌, 세파프리린, 세파졸린, 세페픽, 세픽심, 세포탁심, 세록시틴, 세프피름, 세프도독심, 세프퀴눔, 세프트지딘, 세프티오푸르, 세프트리아존, 세푸록심, 세팔렉신, 세팔로틴, 및 데포테탄); 카르바페넴 및 페넴 (예, 도리페넴, 에르타페넴, 파로페넴, 이미페넴 및 메로페넴); 모노박탐 (예, 아즈트레오남, 노카르디신 A, 타브록시딘- β -락탐 및 티게모남); 및 β -락타마마제 저해제 (예, 클라불란산, 술포탐 및 타조박탐) 이 포함된다. 바람직한 β -락탐에는 세팔로스포린, 특히 세파졸린이 포함된다.
- [0050] 적합한 MLS 항생제에는 클린다마이신, 린코마이신, 피르리마이신 및 임의의 마크로라이드 항생제가 포함된다. 바람직한 린코사마이드 항생제는 피르리마이신이다.
- [0051] 기타 항균제에는 아미노글리코시드, 클로피돌, 디메트리다졸, 에리트로마이신, 프라미세틴, 푸라졸리돈, 할로푸기논, 2-피리돈, 로베니딘, 술포나미드, 테트라사이클린, 트리메토프림, 각종 플레우로뮤틸린 (예, 티아몰린 및 발네몰린) 및 각종 스트렙토마이신 (예, 모넨신, 나라신 및 살리노마이신) 이 포함된다.
- [0052] **II. 방법**
- [0053] 본 발명의 주제는 면역조절자 조성물, 면역자극성 플라스미드 (또는 DNA 서열), 및 미감염된 대상체에 방어 면역성을, 감염된 대상체에 방어 면역성을, 미감염된 대상체에 증강된 면역성을, 감염된 대상체에 증강된 면역성을, 감염된 대상체에 치료적 면역성을 또는 이들의 조합을 유발하는 방법을 제공하는 것이다. 이와 같이, 본 발명의 조성물은 대상체를 예방적으로 면역화하는데 사용될 수 있거나, 또는 대상체를 치료하는데 사용될 수 있다. 본원에 기술된 방법은 본원에 기재된, 면역자극성 플라스미드, 또는 DNA 서열을 대상체에 투여하는 것을 포함한다.
- [0054] **A. 면역 자극 방법**
- [0055] 본 발명은 수령자 대상체에서 면역 응답성을 유발하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 대상체에 유효량의 면역조절자 조성물을 투여하여 면역 응답성을 유발하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 면역조절자 조성물은 단독으로 유효한 비항원 특이적 면역 응답성을 유발한다. 일부 측면에서, 면역조절자 조성물은 백신과 같은 하나 이상의 생물작용제의 작용을, 이러한 백신에 앞서 투여시, 백신과 동시에 투여시, 예방접종 후 투여시 또는 백신과 혼합시 증강시킨다. 일부 측면에서, 이 방법은 전염병으로부터 수령자 대상체를 보호하기 위한 및 전염병이 있는 인구를 치료하기 위한 새로운 치료 전략을 제공한다. 일부 측면에서 이 방법은 면역

조절자 조성물 부재 하에 백신을 이용하는 것과 비교시, 면역조절자를 백신과 병용하는 경우에 질병에 대항해 보다 빠르고, 오래 양호하게 보호한다.

[0056] 면역 응답성은 본원에 기재된 임의의 리포솜 전달 비히클, 본원에 기재된 임의의 면역자극성 플라스미드 (DNA 서열), 및 본원에 기재된 임의의 생물작용제를 포함하는 면역조절자 조성물 유효량을 투여함으로써 수령자 대상체에서 유발될 수 있다. 생물작용제는 면역조절자와 혼합될 수 있거나 함께 투여될 수 있거나 또는 그들 독립적으로 투여될 수 있다는 점이 고려된다. 독립적인 투여는 면역조절자 투여 이전 또는 이후일 수 있다.

또한, 1 회 초과 면역조절자 또는 생물작용제 투여가 증강된 면역성을 연장시키는데 이용될 수 있다는 점도 또한 고려된다. 나아가, 하나 초과 생물작용제는 면역조절자와 함께 투여될 수 있거나, 면역조절자에 앞서 투여될 수 있거나, 면역조절자 투여 이후에 투여될 수 있거나, 또는 면역조절자와 동시에 투여될 수 있다.

[0057] 유효량의 임의의 본원에 기재된 면역조절자 조성물은 대상체에 투여될 수 있다. 유효량은 수령자 대상체에서 면역 응답성을 유발하기에 충분하다. 이러한 유효량은 수령자 대상체에서 면역 응답성을 야기하는 임의의 양이다. 면역 응답성의 측정 방법은 당업계에 익히 공지되어 있다. 또한, 당업자는 유효량이 연령, 체중, 감염 단계뿐 아니라 당업계에 공지된 기타 인자에 좌우될 것이라는 점을 인지할 것이다. 적합한 유효량은 대상체 당 약 0.1 μg 내지 1,000 μg 범위일 것이다. 일부 측면에서, 유효량은 약 0.1 μg 내지 약 10 μg , 약 0.1 μg 내지 약 5 μg , 약 0.5 μg 내지 약 5 μg , 약 0.25 μg 내지 약 5 μg , 약 0.05 μg 내지 약 10 μg , 약 5 μg 내지 약 15 μg , 약 10 μg 내지 약 15 μg , 약 10 μg 내지 약 20 μg , 약 20 μg 내지 약 30 μg , 약 30 μg 내지 약 40 μg , 약 40 μg 내지 약 50 μg , 약 50 μg 내지 약 70 μg , 약 70 μg 내지 약 90 μg , 약 50 μg 내지 약 100 μg , 약 100 μg 내지 약 150 μg , 약 150 μg 내지 약 200 μg , 약 200 μg 내지 약 250 μg , 약 250 μg 내지 약 300 μg , 약 300 μg 내지 약 350 μg , 약 350 μg 내지 약 400 μg , 약 400 μg 내지 약 450 μg , 약 450 μg 내지 약 500 μg , 약 500 μg 내지 약 550 μg , 약 550 μg 내지 약 600 μg , 약 600 μg 내지 약 650 μg , 약 650 μg 내지 약 700 μg , 약 700 μg 내지 약 750 μg , 약 750 μg 내지 약 800 μg , 약 800 μg 내지 약 850 μg , 약 850 μg 내지 약 900 μg , 약 900 μg 내지 약 950 μg , 약 950 μg 내지 약 1000 μg 범위일 수 있다. 바람직하게, 일부 측면에서, 유효량은 약 0.5 μg 내지 약 10 μg 범위이다. 그러나, 바람직하게 기타 측면에서, 유효량은 약 50 μg 내지 약 100 μg 범위이다. 그리고, 바람직하게 다른 측면에서, 유효량은 약 40 μg 내지 약 70 μg 범위이다.

[0058] 일부 측면에서, 면역 응답성은 본원에 기재된 면역조절자 조성물 중 임의의 것을 유효량 조류 종 멤버에 투여함으로써 조류 종 멤버에서 유발될 수 있다. 유효량은 조류 종 멤버에서 면역 응답성을 유발하기에 충분하다.

예를 들어 조류 종을 위한 면역조절자의 유효량은 약 0.05 μg 내지 약 10 μg , 약 0.1 μg 내지 약 5 μg , 약 0.5 μg 내지 약 1.5 μg , 또는 약 1.0 μg 내지 약 10 μg 일 수 있다. 예로, 조류 종의 대상체에 대한 적합한 유효량은 약 0.1 μg , 0.2 μg , 0.3 μg , 0.4 μg , 0.5 μg , 0.6 μg , 0.7 μg , 0.8 μg , 0.9 μg , 1.0 μg , 1.2 μg , 1.4 μg , 1.6 μg , 1.8 μg , 2.0 μg , 2.5 μg , 3.0 μg , 3.5 μg , 4.0 μg , 4.5 μg , 5.0 μg , 5.5 μg , 6.0 μg , 6.5 μg , 7.0 μg , 7.5 μg , 8.0 μg , 8.5 μg , 9.0 μg , 9.5 μg , 10.0 μg , 9.5 μg , 10.0 μg , 10.5 μg , 11.0 μg , 12 μg , 13 μg , 14 μg , 또는 15 μg 일 수 있다.

[0059] 일부 측면에서, 면역 응답성은 본원에 기재된 면역조절자 조성물 중 임의의 것을 유효량 소 종 멤버에 투여함으로써 소 종 멤버에서 유발될 수 있다. 유효량은 소 종 멤버에서 면역 응답성을 유발하기에 충분하다.

예를 들어 소 종을 위한 면역조절자의 유효량은 동물 당 약 1 μg 내지 약 1000 μg , 동물 당 약 5 μg 내지 약 500 μg , 동물 당 약 10 μg 내지 약 100 μg , 동물 당 약 10 μg 내지 약 50 μg , 또는 동물 당 약 40 μg 내지 약 60 μg 일 수 있다. 예로, 소 종의 대상체를 위한 적합한 유효량은 약 30 μg , 35 μg , 40 μg , 45 μg , 50 μg , 55 μg , 60 μg , 65 μg , 70 μg , 75 μg , 80 μg , 85 μg , 90 μg , 95 μg , 100 μg , 110 μg , 120 μg , 130 μg , 140 μg , 150 μg , 160 μg , 170 μg , 180 μg , 190 μg , 200 μg 또는 500 μg 이하, 또는 1000 μg 이하일 수 있다.

[0060] B.사용 조건

[0061] 본 발명의 방법은 면역 응답성을 흔쾌히 유발시키는 질병으로부터 대상체를 보호하도록 대상체에서 면역 응답성을 유발시킨다. 본원에서 이용되는 바와 같이, 문구 "질병으로부터 보호"란, 질병의 증상을 감소시키는 것; 질병 발병을 감소시키는 것; 질병의 임상적 또는 병적 중증도를 감소시키는 것; 또는 질병을 야기하는 병원체의 발산 (shedding) 을 감소시키는 것을 지칭한다. 대상체를 보호하는 것은 본 발명의 치료적 조성물이 대상체에 투여시, 질병의 발병을 막고/막거나, 질병 증상, 임상적 징후, 병리 또는 유발원을 완화 또는 감소시키는 이의 능력을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 제한 없이, 소 호흡기 질환 (BRD) 의 임상적 징후에는 폐 병변, 증

가된 온도, 우울증 (예, 식욕부진, 외부 자극에 대한 감소된 반응성, 축 늘어진 귀), 비루, 및 호흡기 특성 (예, 호흡 속도, 호흡 노력) 이 포함된다. 본원에 기재된 면역조절자 조성물은 BRD 에 노출된 것으로 의심되는 소에 투여되어 BRD 의 상기 기재된 임상적 징후의 증증을 예방 또는 감소할 수 있다. 추가의 예로서, 제한 없이, 조류 대상체에서의 마택 질병의 임상적 징후에는 감소된 부화력 및 새 (bird) 생존 가능성이 포함된다. 본원에 기재된 면역조절자 조성물은 마택 질병 바이러스에 노출된 것으로 의심되는 조류 대상체에 투여되어 마택 질병의 상기 기재된 임상적 징후의 증증을 예방 또는 감소시킬 수 있다.

[0062] 이와 같이, 대상체를 질병으로부터 보호하는 것은, 질병 발병을 예방하고 (예방적 치료) 질병이 있는 대상체를 치료하는 것 (치료적 치료) 모두를 포함한다. 특히, 대상체를 질병으로부터 보호하는 것은 일부 경우 과민성 또는 해로운 면역 응답성을 추가적으로 억제, 감소, 저해 또는 차단할 수 있는 유익하거나 보호적 면역 응답성을 유도함으로써 대상체에서 면역 응답성을 유발하는 것을 동반한다. 용어 "질병"은 정상적인 건강 상태에서 벗어난 대상체의 임의의 건강 상태를 지칭하며, 질병이 존재하는 상태뿐 아니라 이탈 (예, 감염, 유전자 돌연변이, 유전적 결점, 등) 이 발생되었으나 증상이 아직 드러나지 않은 병태도 포함한다.

[0063] 본 발명의 방법은 질병 방지, 질병에 대항하는 효과기 세포 면역성의 자극, 질병 제거, 질병 완화 및 1 차 질병의 발병으로부터 야기된 2 차 질병의 방지에 사용될 수 있다.

[0064] 일부 측면에서, 본원에 기재된 방법은 백신이 공동 투여될 때 대 백신이 단독 투여될 때 대상체의 획득 면역 응답성의 개선에 사용될 수 있다. 일반적으로, 백신이 일단 투여되면 획득 면역성을 자극하는데 시간이 소요되므로 대상체를 즉시 보호하지는 않는다. 용어 "개선"이란, 본 발명에서, 백신이 백신에 의해 주어진 획득 면역성을 통해 대상체를 보호하고/하거나 보호 기간을 연장하기 시작할 때까지 대상체에서 선천적 면역 응답성을 유발하는 것을 지칭한다.

[0065] 일부 측면에서, 본 발명의 방법은 각종 병원체의 감염에 대항해 보호하도록 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 투여된 조성물은 특정 응답성을 유발하도록 특이적 항원을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 본 발명의 방법은 비제한적으로 바이러스, 박테리아, 진균, 및 기생충을 비롯한 전염성 미생물 물질로부터 야기된 질병으로부터 수령자 대상체를 보호할 것으로 고려된다. 당업자는 본원에 기재된 바와 같은 면역조절자 조성물이 열거하기에 너무 많은 수많은 전염성 물질에 대항해 효과적이라고 인지 및 이해할 것이다. 본원에서 제공된 전염성 물질은 예의 목적을 위해 제공되고 사용 범위의 제한 없이 제공된다.

[0066] 조류 중에서 예의 바이러스성 전염병의 예는 비제한적으로 닭 전염성 빈혈 바이러스 (CIAV), 마택 질병 바이러스 (MDV), 닭 헤르페스바이러스 (HCV), 칠면조 헤르페스바이러스 (HTV), 전염성 점액낭병 바이러스 (IBDV), 뉴캐슬병 바이러스 (NDV), 감염성 기관지염 바이러스 (IBV), 전염성 후두기관염 바이러스 (ILTV), 파라믹소바이러스 유형 3, 조류 뇌척수염 (AEV), 계두 바이러스 (FPV), 가금 콜레라, 조류 인플루엔자 바이러스 (AIV), 레오바이러스, 조류 백혈증 바이러스 (ALV), 망상내피증 바이러스 (REV), 조류 아데노바이러스, 출혈 창자염 바이러스 (HEV), 페럼바이러스, 구두 바이러스, 그 재조합체, 및 당업계에 공지된 기타 바이러스로 감염이 야기된 것을 포함한다.

[0067] 조류 중에서의 예의 박테리아 감염에는 비제한적으로, 그람 양성 박테리아, 그람 음성 박테리아 또는 진균류, 예컨대 보르데텔라 종 (*Bordetella spp.*), 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*), 클로스트리듐 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*), 클로스트리듐 콜리눔 (*Clostridium colinum*), 클로스트리듐 퍼프린겐 (*Clostridium perfringens*), 에리시펠로트릭스 인시디오사 (*Erysipelothrix insidiosa*), 대장균 (*Escherichia coli*), 헤모필루스 갈리나룸 (*Hemophilus gallinarum*), 마이코플라즈마 갈리셉티쿰 (*Mycoplasma gallisepticum*), 마이코플라즈마 멜레아그리디스 (*Mycoplasma meleagridis*), 마이코플라즈마 시노비에 (*Mycoplasma synoviae*), 파스테우렐라 물토시다 (*Pasteurella multocida*), 리메렐라 아나티페스티퍼 (*Riemerella anatipestifer*), 살모넬라 종 (*Salmonella spp.*), 살모넬라 엔테리티디스 (*Salmonella enteritidis*), 살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella gallinarum*), 살모넬라 풀로룸 (*Salmonella pullorum*), 및 당업계에 공지된 기타 박테리아로의 감염으로 야기된 것이 포함된다.

[0068] 조류 중에서 예의 진균류 또는 곰팡이 감염에는 비제한적으로 아스페르길루스 플라부스 (*Aspergillus flavus*) 아스페르길루스 푸미게이트 (*Aspergillus fumigates*), 칸디다 알비칸 (*Candida albicans*), 및 당업계에 공지된 기타 전염성 진균류 또는 곰팡이로 감염이 야기된 것이 포함된다. 예의 질병 병태에는 비제한적으로, 그람 양성 박테리아, 그람 음성 박테리아 또는 진균류로부터의 독소, 예컨대 클로스트리듐 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*) 독소, 클로스트리듐 퍼프린겐 (*Clostridium perfringens*) 독소, 대장균 (*Escherichia coli*) 장독소, 푸사리움 (*Fusarium*) 진균독, 파스테우렐라 (*Pasteurella*) 류코톡신, 스태필로코커스 (*Staphylococcus*) 독

소 및 기타 당업계에 공지된 기타 독소로부터 야기된 것이 포함된다.

[0069] 조류 중에서 예의 기생충에는 비제한적으로 아스카리디아 갈리 (*Ascaridia galli*), 카필라리아 아눌라타 (*Capillaria annulata*), 카필라리아 콘토르타 (*Capillaria contorta*), 카필라리아 옵시그나타 (*Capillaria obsignata*), 구충류 중 (*coccidia spp.*), 에이메리아 멜레아그리디스 (*Eimeria meleagridis*), 헤테라키스 갈리 내 (*Heterakis gallinae*), 신가무스 트라체아 (*Syngamus trachea*), 및 당업계에 공지된 기타 기생충이 포함된다.

[0070] 예의 소 종에서의 바이러스 전염병은 비제한적으로, 청설 바이러스, 소 아데노바이러스, 소 칼리시바이러스, 소 코로나바이러스 (BCV), 소 엔테로바이러스, 소 헤르페스바이러스 유형 1 (BHV1), 소 헤르페스바이러스 유형 4 (BHV4), 소 백혈병 바이러스, 소 파르보바이러스, 소 레오바이러스, 소 호흡기 세포융합 바이러스 (BRSV), 소 리노바이러스, 소 바이러스성 설사 바이러스 유형 1 (BVDV1), 소 바이러스성 설사 바이러스 유형 2 (BVDV2), 전염성 소 비기관염 바이러스 (IBR), 악성 카타르열 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스 유형 3 (PIV3), 광견병 바이러스, 물질 구내염 바이러스 (VSV), 그 재조합체, 및 당업계에 공지된 기타 바이러스로의 감염으로부터 야기된 것이 포함된다.

[0071] 소 중에서 예의 박테리아 감염에는 비제한적으로, 그람 양성 박테리아, 그람 음성 박테리아 또는 미코박테리아, 예컨대 아르카노박테리움 피로젠 (*Arcanobacterium pyogenes*), 바실러스 안트라시스 (*Bacillus anthracis*), 바실러스 안트라크스 (*Bacillus anthrax*), 브루셀라 아보르투스 (*Brucella abortus*), 캄필로박터 페투스 (*Campylobacter fetus*), 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*), 클로스트리듐 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*), 클로스트리듐 카우베오이 (*Clostridium chauveoi*), 클로스트리듐 콜리눔 (*Clostridium colinum*), 클로스트리듐 헤몰리티쿰 (*Clostridium hemolyticum*), 클로스트리듐 노비 (*Clostridium novyi*), 클로스트리듐 페르프린젠스 (*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 섉티쿰 (*ostridium septicum*), 클로스트리듐 테타니 (*Clostridium tetani*), 코르네박티쿰 (*Corynebacterium*), 대장균 (*Escherichia coli*), 푸소박티쿰 네크로포룸 (*Fusobacterium necrophorum*), 푸소박티쿰 종 (*Fusobacterium spp.*), 히스토필루스 숨니 (*Histophilus somni*), 히스토필루스 종 (*Histophilus spp.*), 랩토스피라 종 (*Leptospira spp.*), 만하이미아 헤몰리티카 (*Mannheimia haemolytica*), 모락셀라 종 (*Moraxella spp.*), 뮐엘러리우스 종 (*Muellerius spp.*), 미코박테리움 파라튜버쿨로시스 (*Mycobacterium paratuberculosis*), 미코박티쿰 종 (*Mycobacterium spp.*), 미코플라즈마 보비리니스 (*Mycoplasma bovirhinis*), 마이코플라즈마 보비스 (*Mycoplasma bovis*), 마이코플라즈마 디스파르 (*Mycoplasma dispar*), 마이코플라즈마 종 (*Mycoplasma spp.*), 파스테우렐라 톨토시다 (*Pasteurella multocida*), 살모넬라 종 (*Salmonella spp.*), 트레포네마 종 (*Treponema spp.*), 우레아플라즈마 디베르sum (*Ureaplasma diversum*), 및 당업계에 공지된 기타 박테리아로의 감염으로부터 야기된 것이 포함된다.

[0072] 소 중에서 예의 진균류 또는 곰팡이 감염에는 비제한적으로, 악티노박테리움 종 (*Actinobacterim spp.*), 아스퍼길루스 종 (*Aspergillus spp.*), 및 히스토모나스 종 (*Histomonas spp.*), 및 기타 당업계에 공지된 전염성 진균류 또는 곰팡이로 감염으로 야기된 것이 포함된다.

[0073] 소 중에서 예의 기생충에는 비제한적으로 하기가 포함된다: 아나플라즈마 종 (*Anaplasma spp.*), 아나플라즈마 마르기네일 (*Anaplasma marginale*), 바베시아 종 (*Babesia spp.*), 코리옵테스 종 (*Chorioptes spp.*), 쿠퍼리아 (*Cooperia*), 시스티체르쿠스 종 (*Cysticercus spp.*), 다말리니아 보비스 (*Damalinia bovis*), 데르마토펠루스 종 (*Dermatophilus spp.*), 디틸로카울루스 종 (*Dictylocaulus spp.*), 에이머리아 종 (*Eimeria spp.*), 에페리트로존 종 (*Eperythrozoon spp.*), 파시오로이데스 종 (*Fascioloides spp.*), 해몬추스 종 (*Haemonchus spp.*), 멜로파구스 종 (*Melophagus spp.*), 뮐엘러리우스 종 (*Muellerius spp.*), 네마토디루스 종 (*Nematodirus spp.*), 네오스포라 종 (*Neospora spp.*), 오에스트루스 종 (*Oestrus spp.*), 오스테르타기아 종 (*Ostertagia spp.*), 프소롭테스 종 (*Psoroptes spp.*), 사르코프테스 종 (*Sarcoptes spp.*), 세르펜스 종 (*Serpens spp.*), 스트롱길로이데스 종 (*Strongyloides spp.*), 톡소플라즈마 종 (*Toxoplasma spp.*), 트리초피톤 종 (*Trichophyton spp.*), 트리초스트로강릴루스 (*Trichostrongylus*), 트리추리스 종 (*Trichuris spp.*), 및 트리트리초모나스 종 (*Tritrichomonas spp.*), 및 당업계에 공지된 기타 기생충.

[0074] 소 중에서 예의 전염병 물질은 또한 소 종이 걸리기 쉬운 유방염, 자궁근염, 와포자충증, 및 소 종에서의 임의 기타 전염병을 야기하는 물질이 포함된다.

[0075] C.투여

- [0076] 각종 투여 경로가 이용가능하다. 선택된 특정 양태는 물론 특성의 선택된 생물작용제, 대상체의 연령 및 일반적인 건강 상태, 치료될 특정 병태 및 치료학적 효능에 요구되는 투여량에 따라 좌우될 것이다. 본 발명의 방법은 임상적으로 허용불가한 부작용을 야기하지 않으면서 유효 수준의 면역 응답성을 초래하는 임의의 투여 양태를 이용하여 실시될 수 있다. 조성물은 단위 투약 형태로 편리하게 제시될 수 있고 당업계에 익히 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0077] 면역조절자 조성물은 정맥내, 근육내, 진피내, 복강내, 피하, 분무로써, 깃털여포법에 의한 난 내 (in ovo), 경구, 안구내, 기관내, 비강내, 또는 당업계에 공지된 기타 방법으로써 투여될 수 있다. 한 측면에서, 면역조절자는 피하 투여된다. 또 다른 측면에서, 면역조절자는 근육내 투여될 수 있다. 또 다른 측면에서, 면역조절자는 분무로써 투여된다. 또 다른 측면에서, 면역조절자는 경구내 투여될 수 있다.
- [0078] 한 관점에서, 면역조절자는 챌린지 (또는 감염) 전에 대상체에 단독으로 투여될 수 있다. 또 다른 측면에서, 면역조절자는 챌린지 (또는 감염) 후 대상체에 단독으로 투여될 수 있다. 또 다른 측면에서, 면역조절자는 챌린지 (또는 감염)과 동시에 대상체에 단독으로 투여될 수 있다.
- [0079] 일부 측면에서, 면역조절자 조성물은 챌린지 이전 예방접종과 동시에 공동-투여될 수 있다. 일부 측면에서, 면역조절자 조성물은 챌린지 (또는 감염) 과 동시에 예방 접종과 동시에 공동-투여될 수 있다. 일부 측면에서, 공동-투여는 백신 및 면역조절자를, 대상체의 동일한 일반적인 위치에서 서로 옆의 두 상이한 부위에 (즉, 대상체의 목에서 나란히 주사), 동일한 일반적인 위치에서 대상체의 반대편에 (즉, 목의 각 측면 위에 하나씩) 또는 동일 대상체의 상이한 위치에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 면역조절자 조성물은 예방접종 및 챌린지 이전에 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 면역조절자 조성물은 예방접종 후, 그러나 챌린지 이전에 투여될 수 있다. 면역조절자 조성물은 챌린지 (또는 감염) 전 예방접종된 대상체에 챌린지 후에 투여될 수 있다.
- [0080] 당업자는 투여 경로가 대상체 및 대상체의 건강 또는 상태에 따라 달라질 수 있음을 인지할 것이다. 조류 및 소 종에 제공된 투여 경로는 예의 목적을 위한 것으로 비제한적으로 제공된다.
- [0081] 조류 종의 예방접종은 임의의 연령에서 수행될 수 있다. 예방접종은 살아있는 미생물에 대해서 18일령 배아 (난 내) 및 그 이상의 배아에 투여될 수 있고, 불활성화된 미생물 또는 기타 유형의 백신에 대해서는 3 주령 이상의 것에 투여될 수 있다. 난 내 예방 접종을 위해, 예방접종은 발달의 마지막 사분기에 투여될 수 있다. 백신은 피하, 깃털여포법에 의해, 분무로써, 경구, 안구내, 기관내, 비강내, 난 내, 또는 당업계에 공지된 기타 방법에 의해 투여될 수 있다. 경구 백신은 음료수에 투여될 수 있다. 추가로, 본 발명의 방법은 일상적인 예방접종 스케줄에 기초하여 이용될 수 있음이 고려된다.
- [0082] 면역조절자 조성물은 또한 조류 종에 피하, 깃털여포법에 의해, 분무로써, 안구내, 기관내, 비강내, 난 내, 또는 당업계에 공지된 기타 방법에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 면역조절자 조성물은 난 내 투여될 수 있다. 대안적으로, 면역조절자 조성물은 분무로써 투여될 수 있다.
- [0083] 면역조절자 조성물은 조류 배아에 그의 발달의 마지막 사분기에 난 내 투여될 수 있다. 예를 들어, 면역조절자 조성물은 18 일령 또는 19 일령 배아에 난 내 투여될 수 있다. 알로의 투여는 챌린지 (또는 감염) 이전 또는 챌린지 후일 수 있다.
- [0084] 면역조절자는 조류 또는 소 종의 동물에, 챌린지 전 약 1 내지 약 14 일 전, 또는 챌린지 후 약 1 내지 약 14 일 후에 투여될 수 있다. 예를 들어, 면역조절자는 챌린지 전 약 1 내지 약 7 일 전에 투여될 수 있거나, 또는 챌린지 후 약 1 내지 약 7 일 후에 투여될 수 있다. 면역조절자는 적합하게 챌린지 전 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 일 전, 또는 챌린지 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 일 후에 투여된다.
- [0085] 소 종의 예방접종은 임의의 연령에서 수행될 수 있다. 백신은 정맥내, 근육내, 진피내, 복강내, 피하, 분무로써, 경구, 안구내, 기관내, 비강내, 또는 당업계에 공지된 기타 방법에 의해 투여될 수 있다. 나아가, 본원에 기재된 방법은 일상의 예방접종 스케줄에 기반하여 이용될 수 있다는 점이 고려된다.
- [0086] 다른 전달 시스템은 서방형 (time-release), 지연형 (delayed release) 또는 지속형 (sustained release) 전달 시스템을 포함할 수 있다. 이러한 시스템은 반복적인 조성물 투여를 피해 편의를 증가시킬 수 있다. 많은 종류의 방출 전달 시스템이 이용가능하고 당업자에게 공지되어 있다. 이에는 중합체 기반 시스템, 예컨대 폴리(락티드-글리콜리드), 코폴리옥살레이트, 폴리카프로락톤, 폴리에스테르아미드, 폴리오르토에스테르, 폴리히드록시부티르산 및 폴리안히드리드가 포함된다. 앞서의 중합체 함유 약물의 마이크로캡슐은 예를 들어

미국 특허 제 5,075,109 호에 기재되어 있다.

[0087] 전달 시스템은 또한 스테롤 포함 지질, 예컨대 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르 및 지방산 또는 중성 지방, 예컨대 모노-, 디- 및 트리-글리세리드; 히드로겔 방출 시스템; 실라스틱 시스템; 펩티드 기반 시스템; 왁스 코팅; 통상의 결합제 및 부형제를 이용한 압축된 정제; 부분 융합된 임플란트; 등인 비(非)중합체 시스템을 포함한다. 구체예에는 이에 제한되지 않지만, 본 발명의 제제가 U.S. 특허 제 4,452,775 호, 제 4,675,189 호, 및 제 5,736,152 호에 기재된 것과 같은 매트릭스 내 형태로 함유된 침식 시스템, 및 활성 성분이 제어된 속도로 U.S. 특허 제 3, 854,480 호, 제 5,133,974 호, 및 제 5,407,686 호에 기재된 바와 같은 중합체로부터 침투하는 확산 시스템이 포함된다. 추가적으로, 펌프-기반 하드웨어 전달 시스템이 이용될 수 있고, 이들 중 일부는 이식에 적합하다.

[0088] 본 발명의 영역에서 벗어나지 않으면서 상기 조성물, 생성물 및 방법에 각종 변경이 가해질 수 있는 바, 상기 기술 및 하기에 주어진 실시예에 포함된 모든 물질은 예시적인 것이며 제한되는 의미로서 해석되어서는 안된다는 것이 의도된다.

[0089] 정의

[0090] 용어 "유효량"은 원하는 생물학적 효과를 실현하는데 필수적이거나 충분한 양을 지칭한다. 예를 들어, 전염병 치료 또는 예방을 위한 면역조절자의 유효량은 미생물에 노출시 면역 응답성의 발달을 야기하여, 대상체 내 미생물의 양 감소를 도모하고, 바람직하게는 미생물의 박멸을 도모하는 데 필수적인 양이다. 임의의 특정 적용을 위한 유효량은 치료되는 질병 또는 병태, 대상체의 크기 또는 질병 또는 병태의 중증도와 같은 인자에 따라 다를 수 있다. 당업자는 과도한 실험을 필요하게 만들지 않으면서 면역조절자 유효량을 경험적으로 결정할 수 있다.

[0091] 용어 "사이토카인"은 면역 증강 단백질 패밀리를 지칭한다. 사이토카인 패밀리에는 조혈 성장 인자, 인터류킨, 인터페론, 면역글로불린 슈퍼패밀리 분자, 종양 괴사 인자 패밀리 분자 및 케모카인 (즉, 세포, 특히 포식 세포의 이동 및 활성화를 조절하는 단백질) 이 포함된다. 예의 사이토카인에는 제한 없이 인터류킨-2 (IL-2), 인터류킨-12 (IL-12), 인터류킨-15 (IL-15), 인터류킨-18 (IL-18), 인터페론- α (IFN α), 및 인터페론- γ (IFN γ) 이 포함된다.

[0092] 용어 "유발하다"는, 활성화하다, 자극시키다, 생성하다 또는 상향조절하다라는 용어와 상호교환해서 사용될 수 있다.

[0093] 대상체에서 용어 "면역 응답성을 유발하다"란 면역 응답성의 활성을 특이적으로 제어하거나 이에 영향을 끼치는 것을 지칭하고, 이에 는 면역 응답성 활성화, 면역 응답성 상향조절, 면역 응답성 증강 및/또는 면역 응답성 변경 (예컨대, 해가 되거나 효과적이지 못한 것으로부터 유익하거나 보호적인 것으로 대상체 내 우세한 유형의 면역 응답성을 결국 변경시키는 면역 응답성의 유형을 유발시킴으로써) 을 포함할 수 있다.

[0094] 용어 "작동적으로 연결된"이란, 트랜스펙션 될 때 (즉, 형질전환, 형질도입, 또는 트랜스펙션시), 분자가 숙주 세포 내로 발현될 수 있도록 하는 방식으로 전사 제어 서열에 핵산 분자를 연결하는 것을 지칭한다. 전사 제어 서열은 전사의 개시, 신장 및 종료를 제어하는 서열이다. 특히 중요한 전사 제어 서열은 프로모터, 인핸서, 작동자 및 억제자 서열과 같이 전사 개시를 제어하는 것이다. 각종 이러한 전사 제어 서열이 당업자에게 공지되어 있다. 바람직한 전사 제어 서열에는 조류, 어류, 포유류, 박테리아, 바이러스, 식물 및 곤충 세포에서 기능하는 것이 포함된다. 임의의 전사 제어 서열이 본 발명에 이용되지만, 이 서열은 면역원 또는 면역 자극 단백질을 인코딩하는 서열과 자연적으로 연합된 천연 발생 전사 제어 서열을 포함할 수 있다.

[0095] 용어 "핵산 분자" 및 "핵산 서열"은 상호 교환해서 사용될 수 있으며, 이에 는 DNA, RNA, 또는 DNA 또는 RNA 의 유도체가 포함될 수 있다. 이 용어는 또한 올리고뉴클레오타이드 및 더 큰 서열, 예컨대 플라스미드, 본원에 기재된 면역자극성 플라스미드를 포함하고, 단백질 또는 그 단편을 인코딩하는 핵산 분자와 조절 영역, 인트론 또는 기타 비코딩 DNA 또는 RNA 를 포함하는 핵산 분자 양자 모두를 포함한다. 전형적으로, 올리고뉴클레오타이드는 약 1 내지 약 500 뉴클레오타이드의 핵산 서열을 갖고, 더욱 전형적으로는 길이가 약 5 뉴클레오타이드 이상이다. 핵산 분자는 포유류, 어류, 박테리아, 곤충, 박테리아, 식물, 합성 공급원 또는 그 조합물을 비롯해 임의의 공급원으로부터 유래될 수 있다. 핵산 분자는 재조합 DNA 기술 (예, 폴리머라아제 사슬 반응 (PCR), 증폭, 클로닝) 또는 화학적 합성과 같은 당업계에 통상 공지되어 있는 방법에 의해 제조될 수 있다. 핵산 분자는 천연 핵산 분자 및 그의 상동체를 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 방법에서 유용한 면

역 응답성을 유발하는 핵산 분자의 능력을 개질이 실질적으로 방해하지 않도록 하는 방식으로 뉴클레오티드가 삽입, 결실, 치환 또는 도치되어져 개질된 핵산 분자 및 천연 대립유전자 변이체를 포함한다. 핵산 상동체는 당업계에 공지된 다수의 방법을 이용하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 본원에 참조로 통합되어 있는 문헌 [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989]) 참조).

[0096] 용어 "선택가능 마커" 및 "선택가능 마커 유전자"는 유기체를 보호하는 생성물을 인코딩하는 유전자를 지칭하며, 여기서 상기 유전자는 유기체를 통상적으로 사멸하거나 그의 성장을 저해하는 조건 또는 선택적 제제 (예, 항생제)로부터 발현된다. 선택적 마커 유전자는 가장 흔한 항생제 내성 유전자 (예, 카나마이신 내성 유전자, 암피실린 내성 유전자, 클로르암페니콜 내성 유전자, 테트라사이클린 내성 유전자, 등) 이다. 따라서, 예를 들어 *E. coli* 세포를, 카나마이신 내성 유전자를 인코딩하는 플라스미드를 도입하는 형질전환 절차에 적용시킨 다음, 카나마이신 함유 배지상 또는 그 안에서 성장시키는 경우, 성공적으로 플라스미드를 취해 카나마이신 내성 유전자를 발현시킨 *E. coli* 만이 살아 남을 것이다. 용어 "선택적 마커" 및 "선택적 마커 유전자"는 또한 유기체의 성장에 필수적인 화합물 합성에 관여된 효소를 코딩하는 유전자를 포함한다. 필수 화합물을 합성할 수 없는 영양요구성 유기체에 도입되는 경우, 이러한 유전자는 그 유기체를 필수 화합물이 보충된 배지에서 성장 가능하게 허용한다. 예를 들어, 리신 생합성에 관여된 효소 내 돌연변이 또는 이의 부재로 인해 아미노산 리신에 대해 영양요구성인 박테리아 세포는 통상적으로 리신이 보충되어지지 않은 배지 상에서 성장할 수 없다. 이러한 박테리아가 리신 생합성에 관여된 효소를 인코딩하는 플라스미드를 도입하는 형질전환 절차에 적용되는 경우, 성공적으로 플라스미드를 취해 효소를 발현시킨 박테리아는 리신이 보충되지 않은 배지에서 성장시 생존할 것이다. 용어 "선택가능 마커" 및 "선택가능 마커 유전자"는 독/해독제 선택을 허용하는 유전자를 추가로 포함한다. 예를 들어, *ccdB* 유전자는 세포 분할에 필수 효소인 DNA 자이라아제에 결합하는 단백질을 인코딩한다. DNA 자이라아제에 결합되자마자, *ccdB* 유전자 생성물은 유전자 복제를 손상시키고 세포사를 유도한다. 즉, *ccdB* 유전자 생성물을 발현하는 박테리아는 살아남을 수 없다. *ccdA* 유전자는 *ccdB* 유전자 생성물의 천연 저해제로서 작용하는 단백질 ("해독제") 를 인코딩한다. 따라서, 박테리아 계통에서 *ccdB* 유전자를 갖는 박테리아를 *ccdA* 유전자 생성물을 인코딩하는 플라스미드를 도입하는 형질전환 절차에 적용시키는 경우, 성공적으로 플라스미드를 취해 *ccdA* 유전자를 발현하는 세포만이 살아 남을 것이다.

[0097] 용어 "선별가능 마커" 및 "선별가능 마커 유전자"는 선별가능 마커 유전자를 발현하는 세포와 선별가능 마커 유전자를 발현하지 않는 세포를 관찰자가 구별 가능하게 하는 생성물을 인코딩하는 유전자를 지칭한다. 선별가능 마커 유전자 시스템은 당업계에 익히 공지되어 있고, 이는 예를 들어 *lacZ* 유전자 및 녹색 형광 단백질 (GFP), 황색 형광 단백질 (YFP), 적색 형광 단백질 (RFP), 청색 형광 단백질 (BFP) 또는 시안색 형광 단백질 (CFP) 과 같은 형광 단백질을 인코딩하는 유전자를 포함한다.

[0098] 본원에서 이용되는 바와 같이, 용어 "대상체"는 중추신경계를 갖는 생 유기체를 지칭한다. 특히, 대상체에는 이에 제한되는 것은 아니나, 인간 대상체 또는 환자 및 반려동물이 포함된다. 예의 반려동물에는 가축 포유동물 (예, 개, 고양이, 말), 유의미한 상업 가치를 갖는 포유동물 (예, 조류 종, 소 종, 젖소, 육우, 스포츠 동물), 유의미한 과학적 가치가 있는 포유동물 (예, 멸종 위기에 처한 종의 포획 또는 자유 견본), 또는 그 밖의 가치를 갖는 포유동물이 포함될 수 있다. 적합함 대상체는 또한 하기를 포함한다: 마우스, 래트, 개, 고양이, 유제류, 예컨대 소, 돼지, 양, 말 및 염소, 토끼목, 예컨대 토끼 (rabbit, hare), 기타 설치류 및 영장류, 예컨대 원숭이, 침팬지 및 유인원. 대상체는 가축이거나 야생이든 간에 조류 종의 임의 일원일 수 있고, 사육, 고기 또는 알 생산을 위해 시중에서 길러질 수 있다. 예의 조류 종은 제한 없이 닭, 칠면조, 거위, 오리, 꿩, 메추라기, 비둘기, 타조, 새장에 갇힌 새, 동물학상 수집 조류장 내 새 등이 포함된다. 대상체는 가축이거나 야생이든 간에 소 종의 임의 일원일 수 있고, 사육, 고기 또는 우유 생산을 위해 시중에서 길러질 수 있다. 예의 소 종에는 제한 없이 앤텔로프, 버팔로, 야크, 소, 들소, 등이 포함된다. 소의 종에는 제한 없이, 암소 (cows), 황소 (bulls), 수송아지, 암송아지, 황소 (ox), 육우 (beef cattle), 젖소 등이 포함된다. 대상체는 양식 종의 임의 일원일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니나, 이에 물고기, 갑각류, 연체동물, 담수 또는 염수에의 생물의 임의 종이 포함된다. 일부 측면에서, 대상체는 전염병이 있다고 진단되어질 수 있거나, 전염병의 위험에 처할 수 있거나 또는 전염병을 경험할 수 있다. 대상체는 자궁 내, 막 태어나거나, 청소년기, 성인기, 중간 연령 또는 노년기를 비롯한 임의 연령대일 수 있다.

[0099] 실시예

[0100] 하기의 비제한적인 실시예는 본 발명을 추가로 설명하도록 제공된다.

[0101] 실시예 1: pGCMB75.6 플라스미드의 제조

[0102] pGCMB75.6 의 맵은 도 2 에 나타내었다. pGCMB75.6 에서, pMB75.6 의 카나마이신-내성 유전자 (도 1 참조) 는 *E. coli* K-12 로부터의 비(非)코딩 서열로써 대체하였다. pGCMB75.6 플라스미드를 제조하기 위해, AscI 단일 절단 (cutter) 제한 부위를, pMB75.6 에 카나마이신 내성 유전자의 5' 부위에서 도입하여 pMB75.6_AscI (SEQ ID NO: 3) 를 제조하였다. AscI 제한 부위를 도입하기 위해, pGCMB75.6 의 서열 내 존재하는 아데닌을 구아닌으로 돌연변이시켜, pGCMB75.6 플라스미드 내 서열 AGCGCGCC 를 GCGCGGCC 로 변경시켰다. 이러한 개질은 증폭 동안 결찰에 의한 돌연변이유발-기반 접근법을 이용하여 수행했다. 그 중간에 AscI 제한 부위를 갖는 단일의 프라이머를 이용하였다.

[0103] 1779 nt 길이 AscI (GCGCGGCC) / XhoI (CTCGAG) 단편을 Life Technologies GmbH (Darmstadt, Germany) 로써 합성하였다. 상기 단편은 *E. coli* K-12 로부터의 비코딩 서열을 포함하는 다섯 영역 (도 2 에서, 교환물 1-5, 약어로서 exc. 1", "exc. 2," 등), F1 복제 기점, 및 끝이 절단된 (truncated) lacZ 유전자를 함유하였다 (도 2 참조). 교환물 4 의 경우, *E. coli* 서열을 여러 위치에서 수동으로 변경해 플라스미드의 GC-함량을 증가시켰다. 나아가, 교환물 2 에서, 단일의 뉴클레오티드를 플라스미드 내 단일의 DraI 부위만이 존재하도록 변경해 DraI 제한 부위를 결실시켰다.

[0104] 도 2 에서와 같이, pGCMB75.6 는 몇가지 조절 요소 (F1 복제 기점, CMV 프로모터 및 pUC 복제 기점) 및 다수의 클로닝 부위를 함유한다. pGCMB75.6 는 또한 끝이 절단된 lacZ 유전자를 함유한다. 그러나, pGCMB75.6 는 어떠한 전장 또는 작용적 선택가능 또는 선별가능 마커 유전자도 포함하지 않는다. pGCMB75.6 는 4242 bp 길이로, 283 개의 CpG 디뉴클레오티드를 포함한다.

[0105] 새로히 도입된 AscI 부위를 갖는 하나의 양성 클론 (pMB75.6_AscI) 을, AscI (GCGCGGCC) / XhoI (CTCGAG) 로 분해시켜 (digestion) CMV 프로모터, 다중의 클론 부위 및 pUC 복제 기점을 함유하는 2463 단편을 제조하였다 (도 2 참조). 1779 nt AscI (GCGCGGCC) / XhoI (CTCGAG) 합성된 단편을 AscI / XhoI 로 또한 분해하였다.

[0106] 양 단편 (2463 nt 벡터 단편 및 1779 nt 삽입 단편) 을, Qiagen 사의 QIAquick Gel Extraction Kit 를 이용하여으로써 1% 아가로오스 겔로부터 겔 용리하였다. 결찰을 하룻밤 16°C 에서 20 μ l 의 총 부피로 600 ng 의 1779 nt 단편 및 400 ng 의 2463 nt pMB75.6_AscI 벡터 단편을 이용하여 수행했다. 이어서, 20 μ l 을 2 시간 동안 얼음 위 20 ml H₂O 에 대해 투석한 다음, 5 μ l 전기-적격 DH5 α *E. coli* 세포 및 40 μ l H₂O (Invitrogen F-f80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) gal- phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1; Lot no. 1376481, Part no. 44-0097) 와 혼합하였다. 형질전환 및 SOC 배지에서 1 h 재생 후, 세포를 10⁻⁴ 희석에서 카나마이신 없이 LB 플레이트 상 플레이트팅하였다. 이 희석은 개별 클론 단리를 허용하였다.

[0107] 콜로니 PCR 을 표 1 에 열거한 하기의 프라이머를 이용하여 각 클론 상에서 수행했다.

[0108] 표 1. PCR 프라이머

AH-13 rev	GTGCGCGGAACCCCTATTTG (SEQ ID NO: 5)
AH-22 for	GCGTACCCGCCGTTCTCATC (SEQ ID NO: 6)

[0109]

[0110] 프라이머에 있어서 AH-13 rev 및 AH-22 의 위치를 도 2 에 나타낸다. Taq 폴리머라아제를 함유하는 프리믹스 (premix) 를 이용했다. PCR 반응물을 에티뮴 브로마이드를 함유하는 1% 아가로오스 겔 상에 로딩했다. 올바른 플라스미드 (pGCMB75.6) 를 갖는 양성 클론들은 606 bp 의 생성물을 나타냈다.

[0111] 총 10,000 개 초과 클론을 선별해 3 개의 양성 클론을 동정하였다. 3 개의 양성 클론을 즉시 새 LB 플레이트에 옮기고 3 개의 Research Cell Banks (RCB; Sys 3733, Sys 3734 및 Sys 3735) 를 제조하는데 이용했다.

[0112] 동시에, 배지에 상기 3 개의 클론을 접종하고, 플라스미드 DNA 를 제조했다. 세 서브클론들 각각의 완전한 서열 증명을 표 2 에 열거된 하기 프라이머를 이용해 행했다.

표 2. 서열 증명을 위한 PCR

AH-12 for	GTCTGACGCTCAGTGGAACG (SEQ ID NO: 7)
AH-13 rev	GTGCGCGGAACCCCTATTTG (SEQ ID NO: 5)
AH-15	GTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTC (SEQ ID NO: 8)
AH-16	GGCAATTAGCCATATTAGTC (SEQ ID NO: 9)
AH-17	GCAGAGCTCGTTTGTAGTAACCG (SEQ ID NO: 10)
AH-18	GATCATAATCAGCCATACCAC (SEQ ID NO: 11)
AH-19	CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC (SEQ ID NO: 12)
AH-20	CCACAGGTGTCCACTCCCAGGTTC (SEQ ID NO: 13)
AH-21 rev	CTAGTCAAGGCACTATACATC (SEQ ID NO: 14)
AH-22 for	GCGTACCCGCCGTTCTCATC (SEQ ID NO: 6)
AH-23	TCCACAGAATCAGGGGATAACG (SEQ ID NO: 15)

실시예 2: pLacZMB75.6 플라스미드의 제조

pLacZMB75.6 플라스미드 (도 3; SEQ ID NO: 4) 를 제조하기 위해, 1307 nt XhoI (CTCGAG) / DraI (TTTAAA) 단편을 Life Technologies GmbH (Darmstadt, Germany) 에 의해 합성했다. 상기 1307 nt 단편은 lacZ 유전자 (265 nt) 의 일부를 함유했다. 따라서, pGCMB75.6 로 결합시, 이 단편은 XhoI 제한 부위의 업스트림에 위치된 끝이 절단된 LacZ 유전자를 신장시키고, 이 LacZ 유전자가 발현되게 한다 (도 2 와 도 3 비교). 나아가, 91 nt 의 다중 클로닝 부위를 E.coli 비코딩 서열과 교환시켜, 새롭게 도입된 LacZ 유전자 영역과의 서열 상동성을 제거하고 재조합을 막았다. 나아가, 플라스미드 pGCMB75.6 과 동일한 크기의 플라스미드를 제조하도록, CMV 프로모터의 5' 영역을 결실시켰다 (265 nt).

pGCMB75.6 및 1311 nt 합성 단편을 XhoI 및 DraI 로 모두 분해했다. 양 단편을 Qiagen 의 QIAquick Gel Extraction Kit 를 이용하여 1% 아가로오스 겔로부터 겔 용리했다.

240 ng 의 1311 nt 단편 및 240 ng 의 벡터 단편 (총 부피: 20 μ l) 를 이용해 하룻밤 16°C 에서 결합을 행했다. 3 μ l 를, 10 μ l 전기-적격 DH5 α E. coli 세포 (Invitrogen F-f80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) gal- phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1; Lot no. 1376481, Part no. 44-0097) 및 40 μ l 10% 글리세린 용액과 혼합했다. 형질전환 및 SOC 배지에서 1 시간 재생 후, 세포를 10⁻² 및 10⁻⁴ 희석에서 카나마이신 부재의 LB X-Gal/IPTG 플레이트 상에서 플레이팅하였다. 상기 희석은 각 클론의 단리를 허용하였다.

플라스미드를 갖는 콜로니의 동정을, 청/백 선택을 통해 행하고, 콜로니 PCR 을 하기 표 3 에 열거된 프라이머를 이용하여 행해 확인했다.

표 3. 콜로니 확인을 위한 PCR 프라이머

AH-15	GTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTC (SEQ ID NO: 8)
AH-39	GCTCACTCATTAGGCACCCCAGG (SEQ ID NO: 16)

AH-15 및 AH-39 프라이머의 위치를 도 3 에 나타낸다. Taq 폴리머라아제를 함유하는 프리믹스를 이용했다.

PCR 반응물을 에티듐 브로마이드를 함유하는 1% 아가로오스 겔 상에 로딩하였다. 올바른 플라스미드 (pLacZMB75.6) 를 갖는 양성 클론은 777 bp 의 생성물을 나타냈다.

4 개의 양성 클론을 동정하고 즉시 새 LB 플레이트로 옮겨 Research Cell Banks (RCB; Sys 3736, Sys 3737, Sys 3738 및 Sys 3739) 를 만드는데 이용했다.

[0124] 동시에, 배지에 이들 4 개의 클론을 접종하고, 플라스미드 DNA 를 만들었다. 네 서브클론 각각의 완전한 서열 증명을 pGCMB75.6 에 대한 동일 프라이머를 이용하여 행했으나, 프라이머 AH-16 (SEQ ID NO: 10) 를 이용하는 것 대신 프라이머 AH-24 를 이용했다 (표 4 참조).

[0125] 표 4. AH-24 에 대한 PCR 프라이머

AH-24	CGCGTAATACGACTCACTATAG (SEQ ID NO. 17)
-------	--

[0126]

[0127] 실시예 3: 면역조절자 조성물

[0128] 면역조절자는 본원에 기재된 비코딩 DNA 서열 및 양이온성 지질을 포함하는 조성물이다. 합성 면역조절자 지질 성분 [1-[2-[9-(Z)-옥타데세노일옥시]]-2-[8](Z)-헵타데세닐]-3-[히드록시에틸]이미다졸리늄 클로라이드 (DOTIM) 및 합성의 중성 지질 콜레스테롤을 제형화해 직경이 약 200 nm 인 리포솜을 제조한다 (U.S. 특허 6,693,086 참조). DNA 성분은 pGCMB75.6 또는 pLacZMB75.6 이다. 음 하전시, 플라스미드 DNA 는 양-하전된 (양이온성) 리포솜과 연합된다 (U.S. 특허 6,693,086 참조).

[0129] 실시예 4: 포유동물 모델로의 면역조절자 조성물 투여는 바이러스 챌린지에서 생존가능성을 증가시켰다.

[0130] 본원에 기술된 면역조절자 조성물의 효능을, 병원체로 챌린지된 포유동물 모델에서 평가했다. 마우스에 복강내 주사를 통해 pGCMB75.6 DNA 및 양이온성 리포솜을 함유하는 면역조절자 조성물을 투여하였다. 0.01 μ g, 0.02 μ g, 0.04 μ g, 및 1.00 μ g 농도로 면역조절자 조성물을 투여하였다. 대조군 마우스에, 복강내 주사를 통해 0.9% NaCl 용액을 투여했다. 면역조절자 투여 후 24 시간 후, 모든 동물을 복강내 주사를 통해 바이러스 적용으로 챌린지시켰다 (0.2 ml $10^{3.4}$ KID₅₀/ml). 챌린지 바이러스는 거짓광견병 (PR) 이었다. 생존률을 도 4 에 나타낸다. 본원에 기재된 면역조절자 조성물을 수여받은 마우스는 대조군 마우스보다 더 높은 용량 의존적 생존률을 지녔다.

[0131] 실시예 5: 조류 모델에 면역조절자 조성물 투여는 병원체 챌린지에서 부화력 및 생존가능성을 증가시켰다.

[0132] 본원에 기재된 면역조절자 조성물의 효능을, E19 일 (embryonic day 19; 배아 제 19 일) 에 분무로써 병원체로 챌린지된 조류 모델에서 평가했다. 달걀에 pGCMB75.6 DNA 및 양이온성 리포솜을 함유하는 면역조절자 조성물을 E 18 일에 (배아 제 18 일) 에 난 내 투여를 통해 투여했다. 대조군 알은 플라세보 대조군 희석제 (D5W) (난 내) 를 수여받았다. BHI 브로쓰 (분무) 를 모의 챌린지 (T1) 로서 이용했다. 연구 치료군의 상세를 하기 표 5 에 제공하였다.

[0133] 표 5. 조류 면역조절자 조성물 치료 기재 사항

치료군	E18 ¹ 에서 연구시 알 개수	난 내 투여 (E18 일)	젤린지 기재 분무 (E19 일)	평지 개수 ²	부화 트레이/서브트레이 개수 ³	우리 개수 ⁴
T1	896	플라세보 대조군 희석제 (D5W)	BHI 브로쓰 (모의)	56	7/14	14
T2	896	플라세보 대조군 희석제 (D5W)	APEC ⁵	56	7/14	14
T3	896	1.0 mcg JV-77/알	APEC ⁵	56	7/14	14
T4	896	0.1 mcg JV-77/ 알	APEC ⁵	56	7/14	14
T5	896	1.0 mcg Lot X5872/ 알	APEC ⁵	56	7/14	14
T6	896	0.1 mcg Lot X5972/ 알	APEC ⁵	56	7/14	14
T7	896	1.0 mcg Lot X5928/ 알	APEC ⁵	56	7/14	14
T8	896	0.1 mcg Lot X5928/ 알	APEC ⁵	56	7/14	14

[0134]

[0135] ¹ 알 인큐베이션 제 18 일; ² 평지 (flat) 당 16 개의 알; ³ (트레이 당 두 군에 공간을 제공하도록 분할된) 서브-트레이 당 64 개의 알 ; ⁴ 트레이의 각 섹션에서 부화된 닭을 한 우리로 옮겼다; ⁵ 조류 병원성 대장균 (APEC).

[0136] 면역조절자 조성물의 DNA 성분은 pGCMB75.6 DNA 의 단리된 세 클론 중 하나를 포함한다 (즉, Jv77, X5872, 또는 X5928). 하기 표 6 에 요약된 결과로부터 관찰될 수 있는 바와 같이, 평균 부화력 및 평균 생존가능성 양자 모두가, 본원에 기재된 면역조절자 조성물이 투여되는 경우에 있어서, 대조군 치료를 받은 닭과 비교할 때 개선되었다.

표 6. 조류 부화력 및 생존률 *

치료군	N	부화시 사망률 (평균)	부화시 사망률 (대조군- 챌린지 차)	부화후 사망률 (평균)	부화후 사망률 (대조군- 챌린지 차)	전체 사망률 (평균)	전체 사망률 (대조군- 챌린지 차)
01-대조군 챌린지 부재	14	12.5%		0.7%		13.2%	
02-대조군 챌린지 (Chall)	14	22.5%		27.8%		43.5%	
03-Jv77: 1.0 µg Chall	14	20.2%	-2.3%	26.5%	-1.3%	40.6%	-2.9%
04-Jv77: 0.1 µg Chall	14	20.8%	-1.7%	22.4%	-5.4%	38.6% (p=0.0368)	-4.9%
05-X5872: 1.0 µg Chall	14	17.6% (p=0.0110)	-4.9%	22.1%	-5.7%	36.3% (p=0.0023)	-7.2%
06-X5872: 0.1 µg Chall	14	23.0%	0.5%	24.6%	-3.2%	42.0%	-1.5%
07-X5928: 1.0 µg Chall	14	15.5% (p=0.0003)	-7.0%	22.3%	-5.5%	33.9% (p<0.0001)	-9.6%
08-X5928: 0.1 µg Chall	14	21.2%	-1.3%	27.7%	-0.1%	43.0%	-0.5%

* 모든 확인 테스트는 통과했다 (두 대조군 사이의 비교). 대조군 Chall 군으로 비교되는 유의미한 차.

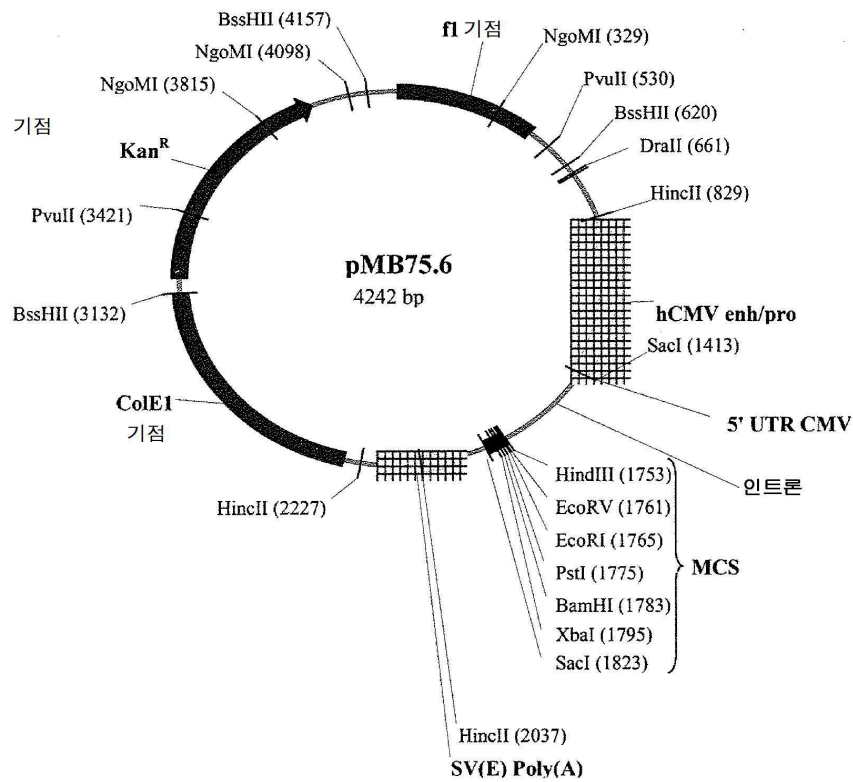
본 발명의 요소 또는 그의 바람직한 구현(들)을 도입하는 경우, 관사 "하나", "한" 및 "상기"는 상기 요소 중 하나 이상이 존재한다는 것을 의미하는 것으로 사용된다. 용어 "포함", "포함하는" 및 "갖는" 은 포괄적인 의미이고, 열거된 요소 이외에 추가적인 요소가 존재할 수 있음을 의미한다.

상기 관점에서, 본 발명의 몇몇의 목적이 달성되고 기타 이로온 결과가 이루어짐을 알 수 있을 것이다.

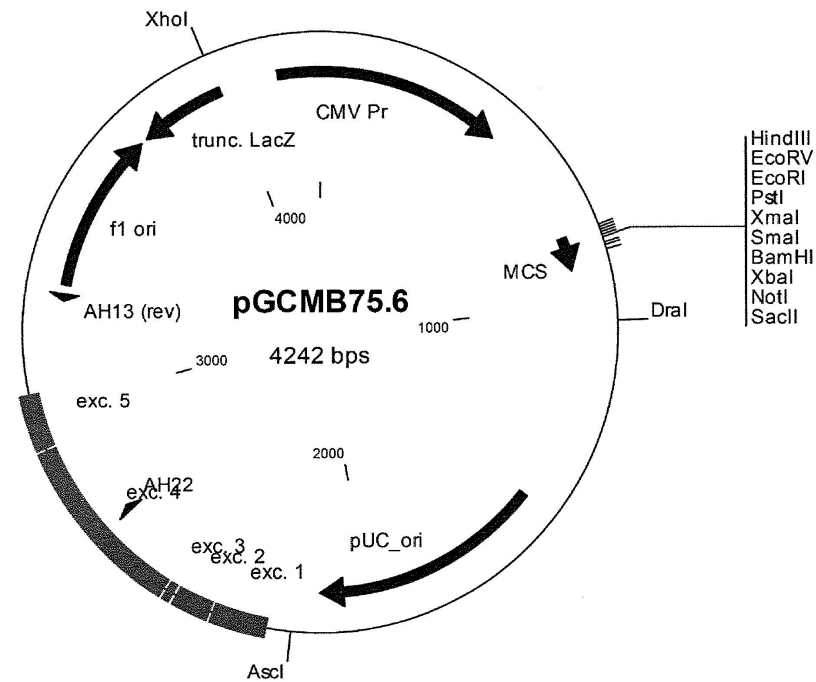
각종 변경을 상기 생성물, 조성물 및 방법에 본 발명의 영역에서 벗어나지 않게 행할 수 있으므로, 상기 상세한 설명에 포함되고 수반된 도면에 나타난 모든 것은 예시로서 해석해야 하며 제한의 의미를 두지 말아야 한다.

도면

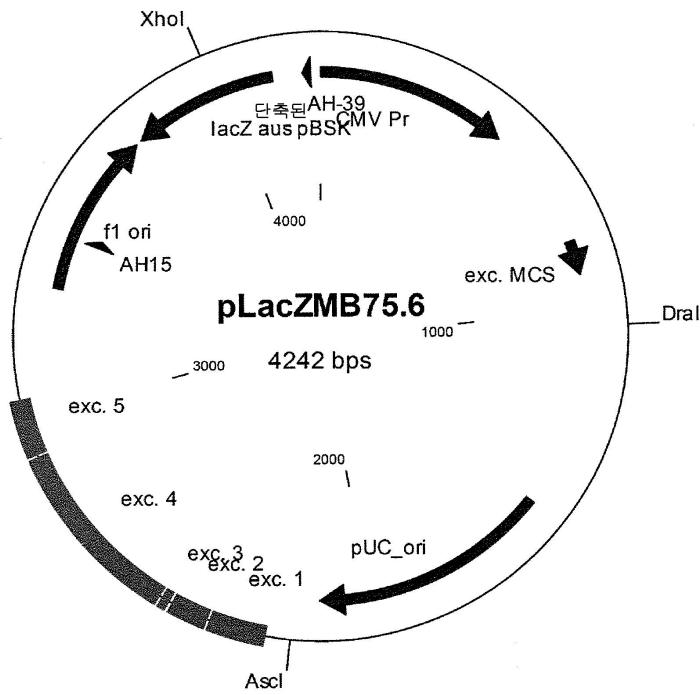
도면1



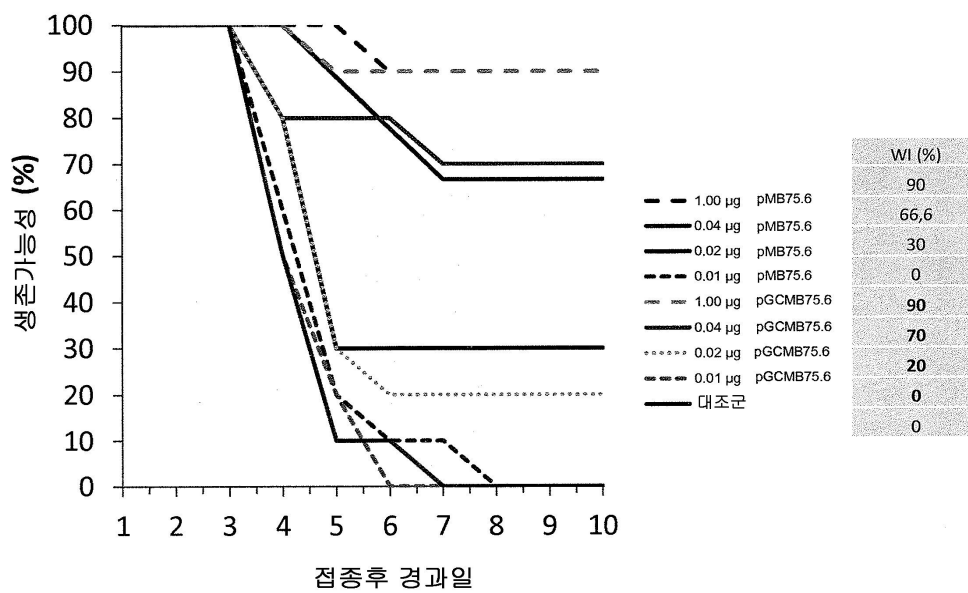
도면2



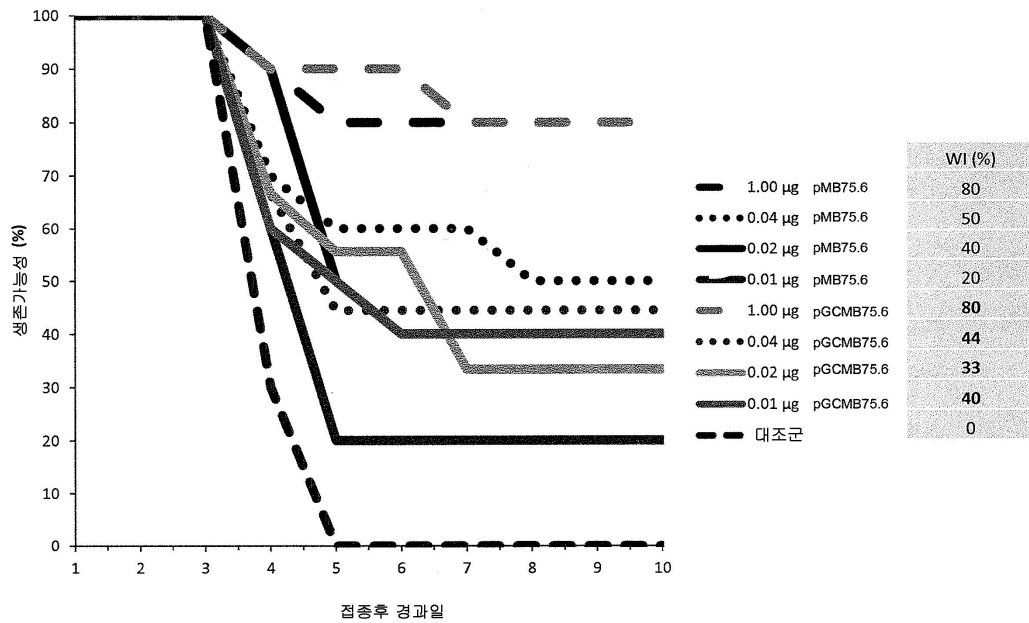
도면3



도면4a



도면4b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Eicker, Andrea

<120> Immunostimulatory plasmids

<130> BAYR 6436.PRO

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4242

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleotide sequence of plasmid pGCMB75.6

<400> 1

```

tgaccgcca acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg      60
ccaataggga ctttcattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg      120
gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt cgcgcccta ttgacgtcaa tgacgtaaa      180

tggccgcct ggcattatgc ccagtacatg accttacggg actttctac ttggcagtac      240
atctacgtat tagtcacgcg tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg      300
cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg      360
    
```

agttttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac ttccaaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc 420
 ttgacgcaaa tggcggttag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta 480
 gtgaaccgtc agatgcctg gagacgcat ccacgtgtt ttgacctca tagaagacac 540
 cgggaccgat ccagcctccc ctggaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc 600

 cgattaagct acagaagtg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga 660
 caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact ctgctgttc 720
 tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac 780
 tcccaggttc aattacagct cttaagcagc cgcaagcttg atatgaatt cctgcagccc 840
 gggggatcca ctagttctag agcggccgcc accgcggtgg agctcgaatt atcagatcga 900
 ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttactttttt aatttgtaaa ggggttaata 960
 aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgta 1020

 gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaatg 1080
 aatgcaattg ttgttgtaa cttgtttatt gcagcttata atggttaca ataaagcaat 1140
 agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagtgtg tggtttgtcc 1200
 aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcatcagat ctgccggtct ccctatagt 1260
 agtcgtatta atttcgataa gccaggttaa cctgcattaa tgaatcggc aacgcgcggg 1320
 gagaggcggg ttgcgtattg ggcgtcttc cgcttctctg ctactgact cgctgcgctc 1380
 ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatatcagc tcaactaaag gcgtaatac ggttatccac 1440

 agaatcagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 1500
 ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca 1560
 caaaaatcga cgtcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc 1620
 gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg acctgccgc ttaccggata 1680
 cctgtccgcc ttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta 1740
 tctcagttcg gtgtaggctg ttctgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgtca 1800
 gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga 1860

 cttatcgcca ctggcagcag cacttggtta caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg 1920
 tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg 1980
 tatctgcgt ctgtgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttgtagct cttgatccgg 2040
 caaacaacc accgctggta gcggtggttt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag 2100
 aaaaaaggga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctgacg ctcatggaa 2160
 cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcat gggcgcgcct aggcttttgc aaagatcgat 2220

caagagacag gatgaggatc gtttcgcagc ttttcattct gactgcaacg ggcaataagt 2280

ctctgtgtgg attaaaaaaa gagtgtctga tagcagcttc tgaactggtt acctgccgtg 2340

agtaaatata aattttattg acttaggtca ctaaggcgcc ttgcgctgag gttgcgtcgt 2400

gatatcatca gggcagaccg gttacatccc cctaacaagc tgtataaaga gaaatactat 2460

ctcattggcg ttgcccgcac ctgacagtgc gacgttgggc tgcgtccgtc gaccaacggt 2520

accgaggtaa cagcccaatc tatecatgat ctggccagg ccgggtcggc cgttatgcag 2580

cccggctcgg gtatgaagcc attaaaggagc cgaccagcg cgaccggcg gccggtcacg 2640

ctgcctctgc tgaagcctgc ctgtcactcc ctgcgcggcg taccgccgt tctcatcgag 2700

taggctccgg atcgcgaccc cggacgggccc ctgggccag gagcggccta tgacaaatgc 2760

cgggtagcga tccggcattc agcattgact gcgcacggat ccagtccttg caggagcctt 2820

atgccgaccg tagcaaaaaa tgagcccag ccgatcgga gtttgtatcc ggtcccgcg 2880

attgccggtc gcgatgacgg tectgtgtaa gcgttatcgt taccaattgt ttaagaagta 2940

tatacgtac gaggtacttg ataacttctg cgtagcatac atgaggtttt gtataaaat 3000

ggcggcgcat atcaacgcag tgtcagaaat ccgaaacagt ctgcgggact ctggggttcg 3060

aatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga tttcgattcc accgccgct 3120

tctatgaaag gttgggcttc ggaatcggtt tccgggacgc cggctggatg atcctccagc 3180

gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata 3240

tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttcgc gcacatttcc ccgaaaagtg 3300

ccacctaaat tgtaagcgtt aatatattgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca 3360

gctcatTTTT taaccaatag gccgaaatcg gaaaaatccc ttataaatca aaagaataga 3420

ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg 3480

actccaacgt caaaggcgca aaaaccgtct atcaggcgga tggcccacta cgtgaacat 3540

caccctaate aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag 3600

ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga 3660

agaaagcgaa aggagcgggc gctaggcgcc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa 3720

ccaccacacc cggcgctt aatgcgccgc tacaggcgcc gtccatttcg ccattcaggc 3780

tgcgcaactg ttgggaaggc cgatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga 3840

aagggggatg tgctgaagg cgattaaagt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac 3900

gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgctt aatagactc actatagggc gaattgggta 3960

ccgggcccc cctcgagcag gatctataca ttgaatcaat attggcaatt agccatatta 4020
gtcattgggtt atatagcata aatcaatatt ggctattggc cattgcatac gttgtatcta 4080
tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaatat gaccgccatg ttgacattga 4140
ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat tagttcatag cccatatatg 4200
gagttccgcg ttacataact tacggtaaatt ggccccgctg gc 4242

<210> 2

<211> 4242

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleotide sequence of plasmid pMB75.6

<400> 2

ctaaattgta agcgtaata ttttgtaaa attcggtta aatttttgtt aaatcagctc 60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
gatagggttg agtgttggtc cagtttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240
ctaatcaagt tttttgggtt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc cttaaaggag 300
ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa 360
agcgaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac 420

cacaccgcc gcgttaatg cgccgtaca gggcgctcc cattgccat tcaggctgcg 480
caactgttgg gaagggcgat cggtgctggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 540
gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggtt aacgccaggg tttcccagt cagcagttg 600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg 660
gccccccctc gagcaggatc tatacattga atcaatatg gcaattagcc atattagtca 720
ttggttatat agcataaatc aatatggctt attggccatt gcatacgtt tatctatc 780
ataatatgta catttatatt ggctcatgtc caatatgacc gccatgttga cattgattat 840

tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt 900
tccgcttac ataacttac gtaaatggcc cgcttgctg accgccaac gacccccgcc 960
cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac 1020
gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata 1080
tgccaagtc gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc 1140
agtacatgac cttacgggac tttctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta 1200

ttacatggt gatcggttt tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg ttgactcac	1260
ggggatttcc aagtcctcac ccatttgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc	1320
aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact cgcgccatt gacgcaaag ggcggtaggc	1380
gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ctcttttagt gaaccgtcag atcgcttga	1440
gacgccatcc acgtgtttt gacctccata gaagacaccg ggaccgatcc agcctccct	1500
cgaagccgat ctgataacgg taccgataag ctggcgcccg attaagctac agaagtgggt	1560
cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga gaccaataga	1620
aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct attggtctta	1680
ctgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtccactc ccaggttcaa ttacagctct	1740
taagcagccg caagcttgat atcgaattcc tgcagcccg ggatccact agttctagag	1800
cggccgccac cgcggtggag ctgcaattat cagatcgatt aataactatg ctcaaaaatt	1860
gtgtaccttt agctttttta tttgtaaagg ggttaataag gaatatttga tgtatagtgc	1920
cttgactaga gatcataatc agccatacca cttttgtaga ggttttactt gctttaaaaa	1980
acctcccaca cctcccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattgtt gttgttaact	2040
tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaat ttcacaaata	2100
aagcatTTTT ttactgcat tctagtgtg gtttgtcaa actcatcaat gtatcttacc	2160
atgtctggat catcagatct gccgtctcc ctatagttag tcttattaat ttcgataagc	2220
caggtaacc tgcattaatg aatcgcccaa cgcgcgggga gagcggttt gcgtattggg	2280
cgctcttccg ctctctcgt cactgactcg ctgcgtcgg tcttccggt gcggcgagcg	2340
gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga	2400
aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg	2460
gcgtttttcc ataggtccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag	2520
aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc	2580
gtgcgtctc ctgttccgac cctgccgtt accggatacc tgtccgctt tctcccttcg	2640
ggaagcgtgg cgttttctca tagctcacgc ttaggtatc tcagttcgggt gtaggtcgtt	2700
cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgtg cgccttatcc	2760
ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc	2820
actggtaaca ggattagcag agcgagggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg	2880
tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgtct gctgaagcca	2940

gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc 3000
 ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat 3060
 cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt 3120
 ttggtcatga gcgcgcctag gcttttgcaa agatcgatca agagacagga tgaggatcgt 3180
 ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc 3240
 tattcggcta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc 3300
 tgtcagcgca ggggcgcccc gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg 3360

aactgcaaga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ctttgcgcag 3420
 ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg 3480
 ggcaggatct cctgtcatct caccitgtct ctgccagaa agtatccatc atggctgatg 3540
 caatcgccgc gctgcatacg cttgatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaac 3600
 atcgcatcga gcgagcacgt actcgatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg 3660
 acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgagcatgc 3720
 ccgacggcga ggalctcgtc gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg 3780

aaaatggccg cttttctgga ttcatcgact gtggccggct ggggtgtggc gaccgctatc 3840
 aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc 3900
 gtttctcgt gctttacggg atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc 3960
 ttcttgacga gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc 4020
 caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgcgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg 4080
 aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt 4140
 cttcgccac ctaggcgcg ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 4200

aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc ac 4242

<210> 3
 <211> 4242
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Nucleotide sequence of plasmid pMB75.6_AscI
 <400> 3

tgaccgcca acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttc catagtaacg 60
 ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg 120
 gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa 180

tgccccgcct ggcattatgc ccagtiacatg accttacggg actttcctac ttggcagtac	240
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg	300
cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg	360
agttttgtttt ggcacaaaa tcaacgggac ttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc	420
ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta	480
gtgaaccgtc agatgcctg gagacgcat ccacgtgtt ttgacctca tagaagacac	540
cgggaccgat ccagcctccc ctggaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc	600
cgattaagct acagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga	660
caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact ctgctgttc	720
tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac	780
tcccaggttc aattacagct cttaagcagc cgcaagcttg atatcgaatt cctgcagccc	840
gggggatcca ctagtcttag agcgccgcc accgcggtgg agctcgaatt atcagatcga	900
ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa ggggttaata	960
aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgta	1020
gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaatg	1080
aatgcaattg ttgttgtaa cttgtttatt gcagcttata atggttaca ataaagcaat	1140
agcatcaca atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagtgt tggtttgtcc	1200
aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcatcagat ctgccggtct ccctatagt	1260
agtcgtatta atttcgataa gccaggttaa cctgcattaa tgaatcgcc aacgcgagg	1320
gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttctctg ctactgact cgctgcgctc	1380
ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc tcaactaaag gcggtaatat ggttatccac	1440
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca	1560
caaaaatcga cgtcaagtc agaggtggcg aaaccgaca ggactataaa gataaccaggc	1620
gtttccccc ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaccggata	1680
cctgtccgcc tttctcctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta	1740
tctcagttcg gtgtaggctg ttgcctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca	1800
gcccagccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga	1860
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg	1920

tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg	1980
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg	2040
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag	2100
aaaaaaagga tcicaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg ctcagtggaa	2160
cgaaaactca cgtaaggga ttttggcat gggcgcgcct aggccttttc aaagatcgat	2220
caagagacag gatgaggatc gtttcgcatg attgaacaag atggattgca cgcaggttct	2280
ccggccgctt ggggtgagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggtctgc	2340
tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt tgtcaagacc	2400
gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcaa gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc	2460
acgacgggcg ttccttgcgc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aagggactgg	2520
ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat ctcaccttgc tctgtccgag	2580
aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggtgcata cgcttgatcc ggctacctgc	2640
ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt	2700
cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc	2760
gccaggctca aggcgagcat gcccgcggc gaggatctcg tcgtgacca tggcgatgcc	2820
tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg	2880
ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat tgctgaagag	2940
cttggcggcg aatgggctga ccgcttctc gtgctttacg gtatcgccgc tcccattcg	3000
cagcgcatcg ctttctatcg ctttcttgac gatttcttct gagcgggact ctggggttcg	3060
aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga tttcgattcc accgccgcct	3120
tctatgaaag gttgggcttc ggaatcggtt tccgggacgc cggctggatg atcctccagc	3180
gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata	3240
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg	3300
ccacctaata tgtaagcgtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca	3360
gtcatTTTT taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga	3420
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg	3480
actccaactg caaaggcgca aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaacct	3540
caccctaate aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaag	3600
ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga	3660
agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa	3720
ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gtccattcg ccattcaggc	3780

tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcgggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga	3840
aaggggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac	3900
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actatagggc gaattgggta	3960
ccggggccccc cctcgagcag gatctataca ttgaatcaat attggcaatt agccatatta	4020
gtcattgggtt atatagcata aatcaatatt ggctattggc cattgcatac gttgtatcta	4080
tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaatat gaccgccatg ttgacattga	4140
ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat tagttcatag cccatatatg	4200
gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggccccctg gc	4242
<210> 4	
<211> 4242	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Nucleotide sequence of plasmid pLacZMB75.6	
<400> 4	
tgaccgcca acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg	60
ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg	120
gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacgtaaa	180
tggccccctt ggcattatgc ccagtiacatg accttacggg actttctac ttggcagtac	240
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg	300
cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc acccattga cgtcaatggg	360
agttttgttt ggcacaaaa tcaacgggac ttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc	420
ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta	480
gtgaaccgtc agatcgcttg gagacgcat ccacgtgtt ttgacctca tagaagacac	540
cgggaccgat ccagcctccc ctggaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc	600
cgattaagct acagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga	660
caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc	720
tgataggcac ctatttgtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac	780
tcccagggtc aattacagct cttaagcagc cgccaaaaca aaattcctca aaaatcatca	840
tcgaatgaat ggtgaaataa ttccctgaa taactgtagt gttttcaggc gcgcgcataa	900
taattaacta tgcataaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaa ggggttaata	960
aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgta	1020

gaggtttttac ttgcttttaa aaacctccca cacctccccc tgaacctgaa acataaaatg 1080
aatgcaattg ttgttgtaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat 1140
agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attttagttg tggtttgtec 1200
aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcatcagat ctgccgtctt ccctatagtg 1260
agtcgtatta atttcgataa gccagggtta cctgcattaa tgaatcgcc aacgcgcggg 1320

gagagcggtt ttgcgtattg ggcgtcttc cgttctctcg ctactgact cgctgcgctc 1380
ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc tcaactaaag gcgtaatac ggttatccac 1440
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca 1560
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc 1620
gtttccccc ggaagctccc tctgcgctc tctgttccg acctgccgc ttaccggata 1680
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgttttct catagctcac gctgtaggta 1740

tctcagttcg gtgtaggctg ttcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca 1800
gcccgcacgc tgcgccttat ccgtaacta tctcttgag tccaaccgg taagacacga 1860
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg 1920
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg 1980
tatctgcgt ctgtgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct ctgatccgg 2040
caaacaacc accgctggta gcgttggtt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag 2100
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg ctcaagtggaa 2160

cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcat ggcgcgcct aggcctttgc aaagatcgat 2220
caagagacag gatgaggatc gtttcgcagc ttttattct gactgcaacg ggcaataagt 2280
ctctgtgtgg attaaaaaa gagtgtctga tagcagcttc tgaactggtt acctgccgtg 2340
agtaaatcaa aattttattg acttaggtca ctaaggcgcc ttgcgtgag gttgcgtcgt 2400
gatatcatca ggcagacgg gttacatccc ctaacaagc tgtataaaga gaaatactat 2460
ctcattggcg ttgccgcac ctgacagtgc gacgttgggc tgcgtccgtc gaccaacggt 2520
accgaggtaa cagcccaatc tatccatgat ctggccagg ccgggtcggc cgttatgcag 2580

cccggctcgg gtaigaagcc attaaggagc cgaccagcg cgaccggcg gccggtcacg 2640
ctgcctctgc tgaagcctgc ctgtcactcc ctgcggcg taccgcccgt tctcatcgag 2700
taggctccgg atcgcgaccc cggacgggcc ctgggccag gagcgcccta tgacaaatgc 2760
cgggtagcga tccggcattc agcattgact gcgcacggat ccagtccttg caggagcctt 2820
atgccgaccg tagcaaaaaa tgagcccag ccgatcgca gttgtgatcc ggtcccgcg 2880

attgccggtc gcgatgacgg tcctgtgtaa gcgttatcgt taccaattgt ttaagaagta 2940
tatacgtac gaggtacttg ataacttctg cgtagcatatc atgagggttt gtataaaaat 3000

ggcgggcat atcaacgcag tgtcagaaat ccgaaacagt ctgcgggact ctggggttcg 3060
aatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga tttcgattcc accgcccct 3120
tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg atcctccagc 3180
gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata 3240
tttgaatgta tttagaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg 3300
ccacctaaat tgtaagcgtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca 3360
gtcatTTTT taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga 3420

ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg 3480
actccaacgt caaaggcgca aaaaccgtct atcaggcgca tggcccacta cgtgaaccat 3540
caccctaate aagttttttg gggctcagggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag 3600
ggagccccc atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga 3660
agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa 3720
ccaccacacc cgccgcgtt aatgcgccgc tacagggcgc gtccattcgc ccattcaggc 3780
tgcgcaactg ttgggaaggc cgatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga 3840

aagggggatg tgctgcaagg cgattaaagt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac 3900
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatagactc actatagggc gaattgggta 3960
ccgggcccc cctcgaggtc gacgttatcg ataagcttga tatcgaattc ctgcagcccc 4020
ggggatccac tagttctaga gcggccgcca ccgcggtgga gctccagctt ttgttcctt 4080
tagtgagggt taattgcgcg cttggcgtaa tcatggatcat agctgtttcc tgtgtgaaat 4140
tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagt taaagcctgg 4200
ggtgcctaata gattgagcta actcacatta attgcgttgc gc 4242

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 5

gtgcgcggaa ccctatttg 20

<210> 6

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 6
 gcgtaccgcg cgttctcatc 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 7
 gtctgacgct cagtggaacg 20

 <210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 8
 gttccagttt ggaacaagag tc 22
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 9
 ggcaattagc catattagtc 20
 <210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 10

gcagagctcg tttagtgaac cg	22
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 11	
gatcataatc agccatacca c	21
<210> 12	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 12	
cgtcttgagt ccaacccggt aagacac	27
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 13	
ccacaggtgt cactcccag gttc	24
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 14	
ctagtcaagg cactatacat c	21
<210> 15	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	

<220><223> Primer

<400> 15

tccacagaat caggggataa cg

22

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 16

gctcactcat taggcacccc agg

23

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 17

cgcgtaatac gactcactat ag

22