



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월26일
(11) 등록번호 10-2785418
(24) 등록일자 2025년03월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7029714
- (22) 출원일자(국제) 2019년03월14일
심사청구일자 2022년03월07일
- (85) 번역문제출일자 2020년10월15일
- (65) 공개번호 10-2020-0135412
- (43) 공개일자 2020년12월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2019/078057
- (87) 국제공개번호 WO 2019/179345
국제공개일자 2019년09월26일
- (30) 우선권주장
PCT/CN2018/079410 2018년03월19일 중국(CN)
- (56) 선행기술조사문헌
CN101444622 A*
VETERINARY MEDICINE, 2016, vol. 63, pages
30-41.*
VETERINARY RESEARCH, 2013, vol. 44:48.*
WO2001036651 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
베링거 잉겔하임 베트메디카 (차이나) 코퍼레이션
리미티드
중국 지양수 225300 타이조우 시양타이 로드 299
번
- (72) 발명자
마 광강
중국 상하이 201203 푸둥 디스트릭트 지알리루 로
드 338 빌딩 7 4/에프
유안 셴
중국 상하이 201203 푸둥 디스트릭트 지알리루 로
드 338 빌딩 7 4/에프
- (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 25 항

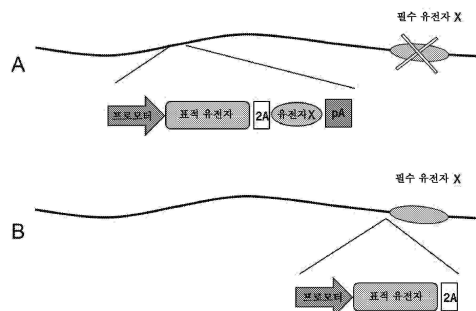
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 표적 단백질을 안정적으로 발현할 수 있는 재조합 바이러스

(57) 요약

본 발명은 표적 단백질을 안정적으로 발현할 수 있는 재조합 바이러스를 생성하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 바이러스는 면역원성 조성물 또는 백신을 제조하기 위해 유용하다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 31/12 (2018.01)

C07K 14/005 (2013.01)

C12N 2710/16722 (2013.01)

C12N 2710/16734 (2013.01)

C12N 2770/32121 (2013.01)

C12N 2770/32122 (2013.01)

C12N 2770/32123 (2013.01)

C12N 2770/32134 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

재조합 바이러스의 게놈 내 발현 카세트를 포함하는 재조합 바이러스로서, 상기 발현 카세트가 적어도 하나의 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드, 및 상기 재조합 바이러스의 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편인 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 제2 폴리뉴클레오타이드에 기능적으로 연결되어 있고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 제2 폴리뉴클레오타이드의 업스트림에 위치하고, 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 상기 재조합 바이러스에서 활성인 상기 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편의 유일한 카피물이고; 상기 재조합 바이러스가 에퀴드 알파헤르페스바이러스 1(Equid Alphaherpesvirus 1)(EHV-1)로부터 유래되고; 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 구제역 바이러스(Foot-and-mouth disease virus: FMDV)의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자를 포함하고; 상기 필수 유전자가 EHV-1 ORF43 유전자 또는 EHV-1 ORF54 유전자이고;

상기 제1 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 동일한 ORF 내에 있는, 재조합 바이러스.

청구항 2

제1항에 있어서,

- (i) 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 상기 재조합 바이러스의 내인성 필수 유전자이거나,
- (ii) 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 외인성이고 상기 재조합 바이러스의 내인성 필수 유전자가 사일런싱되어 있는, 재조합 바이러스.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

- (i) 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 링커를 통해 상기 제2 폴리뉴클레오타이드에 연결되거나,
- (ii) 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 제2 폴리뉴클레오타이드에 직접 연결된, 재조합 바이러스.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 링커가 가요성 링커인, 재조합 바이러스.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 링커가 FMDV의 2A 유전자인, 재조합 바이러스.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 발현 카세트가 조절 요소들을 추가로 포함하는, 재조합 바이러스.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조절 요소가 프로모터 또는 폴리 A인, 재조합 바이러스.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 프로모터가 CMV5 프로모터인, 재조합 바이러스.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 발현 카세트가 서열번호 8에 나타낸 CMV-P1-2A-3C-2A-ORF43-BGH 작제물 또는 서열번호 9에 나타낸 CMV-P1-2A-3C-2A-ORF54-BGH 작제물을 포함하고, 여기서 P1, 2A 및 3C는 각각 FMDV의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자이고, CMV는 CMV 프로모터이고, ORF43 및 ORF54는 각각 EHV-1 ORF43 유전자 및

EHV-1 ORF54 유전자이고, BGH는 소 성장호르몬 폴리 A 신호인, 재조합 바이러스.

청구항 10

재조합 바이러스의 게놈 내 발현 카세트를 작제함을 포함하는, 재조합 바이러스 내에서 목적하는 폴리펩타이드의 발현 안정성을 증가시키기 위한 방법으로서, 상기 발현 카세트가 적어도 하나의 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드, 및 상기 재조합 바이러스의 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편인 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 제2 폴리뉴클레오타이드에 기능적으로 연결되어 있고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 제2 폴리뉴클레오타이드의 업스트림에 위치하고, 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 상기 재조합 바이러스에서 활성인 상기 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편의 유일한 카피물이고;

상기 재조합 바이러스가 에퀴드 알파헤르페스바이러스 1(Equid Alphaherpesvirus 1)(EHV-1)로부터 유래되고; 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 구제역 바이러스(Foot-and-mouth disease virus: FMDV)의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자를 포함하고; 상기 필수 유전자가 EHV-1 ORF43 유전자 또는 EHV-1 ORF54 유전자이고;

상기 제1 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 동일한 ORF 내에 있는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

- (i) 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 상기 재조합 바이러스의 게놈 내 천연적으로 존재하는 필수 유전자이거나,
- (ii) 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 외인성이고, 상기 재조합 바이러스의 게놈 내 천연적으로 존재하는 필수 유전자가 사일런싱되어 있는, 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서,

- (i) 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 링커를 통해 상기 제2 폴리뉴클레오타이드에 연결되거나,
- (ii) 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 제2 폴리뉴클레오타이드에 직접 연결된, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 링커가 가요성 링커인, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 링커가 FMDV의 2A 유전자인, 방법.

청구항 15

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 발현 카세트가 조절 요소들을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 조절 요소가 프로모터 또는 폴리 A인, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 프로모터가 CMV5 프로모터인, 방법.

청구항 18

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 발현 카세트가 서열번호 8에 나타낸 CMV-P1-2A-3C-2A-ORF43-BGH 작제물 또는 서열번호 9에 나타낸 CMV-P1-2A-3C-2A-ORF54-BGH 작제물을 포함하고, 여기서 P1, 2A 및 3C는 각각 FMDV의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자이고, CMV는 CMV 프로모터이고, ORF43 및 ORF54는 각각 EHV-1 ORF43 유전자 및 EHV-1 ORF54 유전자이고, BGH는 소 성장호르몬 폴리 A 신호인, 방법.

청구항 19

제1항 또는 제2항의 재조합 바이러스를 포함하는 숙주 세포.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 숙주 세포가 진핵 숙주 세포주, 포유동물 세포주 또는 곤충 세포주인, 숙주 세포.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 숙주 세포가 RK13 세포주, MDBK 세포주, ST 세포주, AI-ST 세포주, VERO 세포주, Sf9 세포주, Sf21, MDCK 세포주, 및/또는 이의 유도체인, 숙주 세포.

청구항 22

동물에서 병원체에 의한 감염으로 야기된 임상 증상 또는 질환을 감소시키거나 예방하는 방법에 사용하기 위한, 또는 동물에서 병원체에 의한 감염을 치료하거나 예방하는 방법에 사용하기 위한, 면역원성, 약제학적 또는 백신 조성물로서,

- a. 제1항 또는 제2항의 재조합 바이러스, 및/또는
 - b. 제1항 또는 제2항의 재조합 바이러스에 의해 발현되는 목적하는 폴리펩타이드, 및
 - c. 약제학적으로 또는 수의과적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하고,
- 상기 병원체가 구제역 바이러스(FMDV)인, 면역원성, 약제학적 또는 백신 조성물.

청구항 23

동물에서 병원체와 관련된 질환에 대하여 동물을 백신접종하고/하거나, 동물에서 병원체와 관련되거나 병원체에 의해 유발된 하나 이상의 임상 증상의 발생률 또는 중증도를 감소시키기 위한 키트로서,

- a. 제1항 또는 제2항의 재조합 바이러스 또는 제22항의 면역원성, 약제학적 또는 백신 조성물을 상기 동물에게 투여할 수 있는 분배기;
 - b. 제1항 또는 제2항의 재조합 바이러스 또는 제22항의 면역원성, 약제학적 또는 백신 조성물, 및
 - c. 지침 전단지
- 를 포함하고,
- 상기 병원체가 구제역 바이러스(FMDV)인, 키트.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 동물이 식품 생산 동물(food producing animal)인, 키트.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 식품 생산 동물이 돼지 또는 소인, 키트.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 분자 생물학 분야, 및 특히 표적 단백질을 안정적으로 발현할 수 있는 재조합 바이러스 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 구제역 바이러스 (FMDV)는 피코나비리대(Picornaviridae) 과의 아프토바이러스 (Aphthovirus) 속에 속하는 리보핵산 (RNA) 바이러스이다(문헌참조: Cooper et al., Intervirology, 1978, 10, 165-180). 직경이 약 25nm인 나출된 정20면체 바이러스로서, FMDV는 양성 극성을 갖는, 약 8500개 뉴클레오타이드로 이루어진 단일 가닥 RNA 분자를 함유한다. 상기 RNA 분자는 특히 또한 단백질 P1으로서 공지된 캡시드 전구체를 함유하는 단일 폴리단백질을 암호화하는 단일 개방 관독 프레임 (ORF)을 포함한다. 단백질 P1은 이의 아미노 말단이 미리스틸화되어 있다. 성숙화 과정 동안에, 단백질 P1은 프로테아제 3C에 의해 VP0, VP1 및 VP3으로서 공지된 3개의 단백질로 절단된다(문헌참조: Belsham G. J., Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1993, 60, 241- 261). 비리온에서, 단백질 VP0은 이어서 2개의 단백질, VP4 및 VP2로 절단된다. 단백질 VP0의 VP4 및 VP2로의 전환을 위한 기전 및 성숙한 비리온의 형성을 위한 기전은 공지되어 있지 않다. 단백질 VP1, VP2 및 VP3은 약 26,000 Da의 분자량을 갖고, 단백질 VP4는 약 8,000 Da로 보다 작다.

[0003] FMD-유행병 영역에서, 백신 접종은 효과적이고 질환을 제어하기 위한 주요 수단이다. FMDV에 대해 현재 시판중인 백신은 주로 전체 불활성화된 FMDV 백신이다. 이러한 백신을 생산하려면 고 격납 시설에서 대량의 독성 FMDV를 증식시켜야하는데, 이는 유지 비용이 많이 들고 생존 FMDV를 방출할 잠재적 위험을 갖는다. 추가로 일부 야생 종은 현탁액 BHK 세포에 적응하여 고역가를 달성하기가 어렵다. 전체 불활성화된 백신의 또 다른 문제는 이것이 때로는 특히 돼지에서 효과적으로 면역 반응을 자극할 수 없어서 이것은 정기적으로 부스터 주사를 필요로 한다.

[0004] 신규한 FMD 백신 중 하나는 바이러스-유사 입자 (VLP)-기반 백신이다. 전구체 단백질 P1-2A로부터 유래된 VLP는 온전한 바이러스 상에 존재하는 전체 면역원성 부위의 레퍼토리를 함유하고 동물에서 비리온 만큼 면역원성이다. VLP는 핵산이 부재이고 감염성이 아니어서 VLP-기반 백신은 동물에서 제조 및 용도와 관련하여 높은 안전성 프로필을 갖는다. FMDV VLP는 상이한 발현 시스템 및 벡터를 사용하여 발현될 수 있고 서브유닛 백신으로서 전달될 수 있다(문헌참조: Luis L. Rodriguez and Marvin J. Grubman, Foot and mouth disease virus vaccines, Vaccine 27 (2009) D90-D94). 안전성 및 제조의 용이함에도 불구하고, VLP-기반 서브유닛 백신은 때로는 질환에 대해 오래 지속적인 면역력을 성공적으로 유도할 수 없다. 생존 백신은 1회 또는 2회 용량으로 면역력을 부여할 수 있는 반면 VLP-기반 서브유닛 백신은 특정 시기에 걸쳐 반복적으로 투여될 필요가 있다.

[0005] VLP-기반 생존 벡터화된 백신은 FMDV의 제어를 위해 전망있는 백신 후보물로서 예상된다. FMDV VLP-기반 생존 벡터화된 백신을 개발하기 위해, VLP-암호화 유전자를 함유하는 재조합 바이러스가 작제되어야만 한다. VLP-암호화 유전자는 P1-2A 전구체 유전자 및 3C 프로테아제 유전자로 구성되어 VLP는 재조합 바이러스의 복제 동안에 자동적으로 발현되고 어셈블리될 수 있어야만 한다. 불행하게도, P1-2A 유전자는 재조합 바이러스, 예를 들어, 아데노바이러스의 연속 계대 동안에 안정적으로 유지될 수가 없음에 따라서 VLP 수율 및 백신 효능에 음성으로 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. (문헌참조: L. Robinson, T. J. D. Knight-Jones, B. Charleston. Global Foot-and-Mouth Disease Research Update and Gap Analysis: 3 - Vaccines. Transboundary and Emerging Diseases (2016) P30-41).

[0006] VLP-암호화 유전자가 시험관내 이의 연속 계대 동안에 재조합 바이러스에서 안정적으로 유지될 수 있도록 하는 VLP-암호화 유전자-함유 재조합 바이러스를 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

- [0007] 발명의 요약
- [0008] 상기된 기술적 문제점에 대한 해결은 상기 기재 및 청구항에서 특징으로 하는 구현예에 의해 성취되고 이의 상이한 양상에서의 본 발명은 청구항에 따라 수행된다.
- [0009] 일반적으로, 본 발명은 표적 유전자의 발현 안정성을 증가시키기 위한 재조합 바이러스 및 관련 방법을 제공한

다.

- [0010] 상기 언급된 재조합 바이러스에서, 표적 유전자는 재조합 바이러스의 필수 유전자에 기능적으로 연결되고 상기 필수 유전자의 업스트림에 위치하여 표적 유전자 및 필수 유전자가 동시 발현될 수 있도록 디자인된다. 예를 들어, 상기 표적 유전자는 동일한 ORF 내 재조합 바이러스의 필수 유전자의 업스트림에 삽입되어 상기 표적 유전자는 재조합 바이러스가 복제할 수 있는 한 필수 유전자와 안정적으로 동시 발현될 수 있다. 표적 유전자 발현의 상실 또는 표적 유전자 내 임의의 프레임의 돌연변이를 갖는 재조합 바이러스는 복제할 수 없다. 하나의 구현예에서, 재조합 바이러스는 헤르페스비리대, 특히, 에퀴드 알파헤르페스바이러스(Equid Alphaherpesvirus) 1 (EHV-1)로부터 유래한다. 하나의 구현예에서, 표적 유전자는 FMDV의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자를 포함한다. 본원 개시내용의 문맥에서 용어 “표적 유전자” 및 “제1 폴리뉴클레오타이드”는 상호교환될 수 있고, 용어 “필수 유전자” 및 “제2 폴리뉴클레오타이드”는 상호교환될 수 있다.
- [0011] 상기 언급된 재조합 바이러스를 사용함에 의해, 표적 유전자는 이를 함유하는 재조합 바이러스에 의해 안정적으로 발현될 수 있다.
- [0012] 본 발명은 또한 본 발명의 재조합 바이러스를 포함하는 숙주 세포 및 이의 제조 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한 본 발명의 재조합 바이러스 및/또는 본 발명의 재조합 바이러스에 의해 발현되는 목적하는 폴리펩타이드를 포함하는, 면역원성 조성물, 약제학적 조성물 또는 백신 조성물, 및 이의 제조 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 면역원성/약제학적/백신 조성물의 제조에서 본 발명의 재조합 바이러스의 용도를 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 본 발명의 재조합 바이러스 또는 본 발명의 면역원성/약제학적/백신 조성물을 동물에게 투여함에 의해 동물에서 바이러스에 의해 유발된 임상적 징후의 치료 및/또는 예방을 위한 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 추가로 본 발명의 재조합 바이러스 또는 본 발명의 면역원성/약제학적/백신 조성물을 동물에게 투여함을 포함하는, 돼지를 포함하는 식품 생산 동물과 같은 동물을 면역화시키기 위한 방법에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은 재조합 바이러스의 게놈 내 발현 카세트를 포함하는, 재조합 바이러스에 관한 것이고, 여기서, 상기 발현 카세트는 적어도 하나의 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드, 및 재조합 바이러스의 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편인 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드는 제2 폴리뉴클레오타이드에 기능적으로 연결되어 있고 상기 제1 폴리뉴클레오타이드는 제2 폴리뉴클레오타이드의 업스트림에 위치하고 상기 제2 폴리뉴클레오타이드는 재조합 바이러스에서 활성인 상기 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편의 유일한 카피물이다.
- [0017] 본 발명은 또한 재조합 바이러스의 게놈 내 발현 카세트를 작제함을 포함하는, 재조합 바이러스의 제조 방법에 관한 것이고, 여기서, 상기 발현 카세트는 적어도 하나의 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드, 및 재조합 바이러스의 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편인 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드는 제2 폴리뉴클레오타이드에 기능적으로 연결되어 있고 상기 제1 폴리뉴클레오타이드는 제2 폴리뉴클레오타이드의 업스트림에 위치하고 상기 제2 폴리뉴클레오타이드는 재조합 바이러스에서 활성인 상기 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편의 유일한 카피물이다.
- [0018] 본 발명은 추가로 재조합 바이러스의 게놈 내 발현 카세트를 작제함을 포함하는, 재조합 바이러스 내 목적하는 폴리펩타이드의 발현 안정성을 증가시키기 위한 방법에 관한 것이고, 여기서, 상기 발현 카세트는 적어도 하나의 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드, 및 재조합 바이러스의 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편인 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드는 제2 폴리뉴클레오타이드에 기능적으로 연결되어 있고 상기 제1 폴리뉴클레오타이드는 제2 폴리뉴클레오타이드의 업스트림에 위치하고 상기 제2 폴리뉴클레오타이드는 재조합 바이러스에서 활성인 상기 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편의 유일한 카피물이다.
- [0019] 본 발명의 재조합 바이러스는 재조합 바이러스의 필수 유전자와 함께 표적 유전자의 동시 발현의 새로운 발상을 토대로 작제한다. 재조합 바이러스의 표적 유전자 및 필수 유전자의 동시 발현은 표적 단백질의 안정한 발현에 이득이 될 것으로 예상된다. 재조합 바이러스의 복제는 표적 유전자의 발현에 의존하고 이는 이어서 표적 유전자의 발현이 안정적이게 한다. 재조합 바이러스가 표적 유전자의 발현을 상실하거나 표적 유전자 내 임의의 프레임의 돌연변이를 갖는 경우, 다운스트림 필수 유전자는 기능적으로 발현되지 않고 결과로서 재조합 바이러스는 복제할 수 없다. 즉, 기능적으로 함께 조합됨에 의해, 표적 유전자는 복제 선택 압력하에 안정적으로 발현된다.

- [0020] 재조합 바이러스의 표적 유전자 및 필수 유전자의 동시 발현은 표적 유전자가 기능적으로 필수 유전자에 연결되도록 함에 의해 성취될 수 있다. 예시적인 구현예에서, 표적 유전자 및 필수 유전자는 동일한 ORF 내에 위치하도록 디자인될 수 있다. 따라서, 하나의 구현예에서, 본 발명의 재조합 바이러스의 제1 폴리뉴클레오타이드 및 제2 폴리뉴클레오타이드는 동일한 ORF 내에 있다.
- [0021] 표적 유전자의 필수 유전자로의 기능적 연결을 성취하기 위한 2개의 예시적 선택 사항이 있다. 제1 선택 사항은 재조합 바이러스의 내인성 필수 유전자 (즉, 재조합 바이러스의 게놈에 천연적으로 존재하는 필수 유전자)를 결실시키거나 사일런싱하고 표적 유전자의 다운스트림에 외인성으로 도입된 동일한 필수 유전자를 삽입하여 상기 표적 유전자가 필수 유전자에 기능적으로 연결되도록 하는 것이다. 따라서, 하나의 구현예에서, 제2 폴리뉴클레오타이드는 외인성이고 재조합 바이러스의 내인성 필수 유전자는 사일런싱되었다. 제2 선택 사항은 바이러스의 내인성 필수 유전자의 업스트림에 표적 유전자를 삽입하여 표적 유전자가 필수 유전자에 기능적으로 연결되도록 하는 것이다. 따라서, 하나의 구현예에서, 제2 폴리뉴클레오타이드는 재조합 바이러스의 내인성의 필수 유전자이다.
- [0022] 하나의 구현예에서, 제2 폴리뉴클레오타이드는 재조합 바이러스의 내인성 필수 유전자이다. 또 다른 구현예에서, 제2 폴리뉴클레오타이드는 외인성이고 재조합 바이러스의 내인성 필수 유전자는 사일런싱되었다.
- [0023] 하나의 구현예에서, 제1 폴리뉴클레오타이드는 항원성 폴리펩타이드 또는 치료학적 폴리펩타이드를 암호화한다. 항원성 폴리펩타이드는 예를 들어, FMDV 항원, PRRSV 항원, DEV 항원, 및 PRV 항원, 바람직하게 FMDV 항원으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 하나의 구현예에서, 제1 폴리뉴클레오타이드는 FMDV의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자를 포함한다. 하나의 구현예에서, P1 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1로 나타난다. 하나의 구현예에서, 2A 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 2로 나타난다. 하나의 구현예에서, 3C 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 3으로 나타난다. 하나의 구현예에서, P1-2A-3C 유전자 카세트의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 4로 나타난다.
- [0024] 하나의 구현예에서, 제2 폴리뉴클레오타이드는 재조합 바이러스의 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편이다. 필수 유전자는 유기체의 복제를 위해 중요한 것으로 사료되는 유기체의 유전자들이다. 바이러스와 관련하여, 필수 유전자는 캡시드 단백질, DNA 헬리카제, DNA 레플리카제 등을 암호화하는 유전자들을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 하나의 구현예에서, 필수 유전자는 예를 들어, 캡시드 단백질, DNA 복제 관련 단백질, DNA 헬리카제, DNA 레플리카제, 수용체 결합 단백질 및 배출 (Egress)-관련 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 단백질을 암호화한다. 하나의 구현예에서, 필수 유전자는 EHV-1의 게놈으로부터 기원한다. 하나의 구현예에서, 필수 유전자는 EHV-1 ORF43 유전자 또는 EHV-1 ORF54 유전자이다. 하나의 구현예에서, ORF43 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 5로 나타난다. 하나의 구현예에서, ORF54 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 6으로 나타난다.
- [0025] 하나의 구현예에서, 제1 폴리뉴클레오타이드는 링커를 통해 제2 폴리뉴클레오타이드에 연결되어 있다. 하나의 구현예에서, 링커는 가요성 링커, 예를 들어, (GGGG)n 링커, 또는 2A 유전자, 바람직하게 2A 유전자일 수 있다. 하나의 구현예에서, 제1 폴리뉴클레오타이드는 직접 제2 폴리뉴클레오타이드에 연결되어 있다. 하나의 구현예에서, 발현 카세트는 “제1 폴리뉴클레오타이드-링커-제2 폴리뉴클레오타이드”의 구조로 나타난 작제물을 포함한다.
- [0026] 하나의 구현예에서, 재조합 바이러스는 예를 들어, 헤르페스비리대, 예를 들어, 에퀴드 알파헤르페스바이러스 1 (EHV-1), 에퀴드 알파헤르페스바이러스 4 (EHV-4) 및 소 알파헤르페스바이러스 1 (소 헤르페스바이러스 1, BHV-1)로부터 선택된 바이러스로부터 유래한다. 하나의 구현예에서, 재조합 바이러스는 헤르페스비리대 과의 구성원, 바람직하게 알파헤르페스비리대 속의 구성원, 보다 바람직하게 바리셀로바이러스 아속의 구성원으로부터 선택된 바이러스로부터 유래하고, 가장 바람직하게 상기 재조합 바이러스는 에퀴드 알파헤르페스바이러스 1 (EHV-1)로부터 유래한다.
- [0027] 하나의 구현예에서, 재조합 바이러스는 EHV-1로부터 유래하고 제1 폴리뉴클레오타이드는 FMDV의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자를 포함한다. 하나의 구현예에서, P1 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1로 나타난다. 하나의 구현예에서, 2A 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 2로 나타난다. 하나의 구현예에서, 3C 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 3으로 나타난다. 하나의 구현예에서, P1-2A-3C 유전자 카세트의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 4로 나타난다. 하나의 구현예에서, 재조합 바이러스는 EHV-1로부터 유래하고 필수 유전자는 EHV-1 ORF43 유전자 또는 EHV-1 ORF54 유전자이다. 하나의 구현예에서, ORF43 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 5로 나타난다. 하나의 구현예에서, ORF54 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 6으로

나타낸다. 하나의 구현예에서, 재조합 바이러스는 EHV-1로부터 유래하고, 필수 유전자는 EHV-1 ORF43 유전자 또는 EHV-1 ORF54 유전자이고, 제1 폴리뉴클레오타이드는 FMDV의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자를 포함한다.

[0028] 하나의 구현예에서, 발현 카세트는 추가로 예를 들어, 조절 요소, 예를 들어, 프로모터, 터미네이터 등을 포함한다. 하나의 구현예에서, 프로모터는 CMV 프로모터이다. 하나의 구현예에서, 터미네이터는 폴리A (폴리아데닐화) 신호, 바람직하게 BGH (소 성장 호르몬) 폴리A 신호이다. 하나의 구현예에서, BGH 폴리 A 신호의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 7로 나타낸다.

[0029] 하나의 구현예에서, 발현 카세트는 “프로모터-제1 폴리뉴클레오타이드-제2 폴리뉴클레오타이드-터미네이터”의 구조로 나타낸 작제물을 포함한다. 하나의 구현예에서, 발현 카세트는 “프로모터-제1 폴리뉴클레오타이드-링커-제2 폴리뉴클레오타이드-터미네이트”의 구조로 나타낸 작제물을 포함한다. 하나의 구현예에서, 프로모터는 CMV 프로모터, 바람직하게 CMV5 프로모터이다. 하나의 구현예에서, 제1 폴리뉴클레오타이드는 표적 유전자이고 이것은 FMDV의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자를 포함하거나 이들로 이루어진다. 하나의 구현예에서, 제2 폴리뉴클레오타이드는 필수 유전자이고, 이는 EHV-1 ORF43 유전자 또는 EHV-1 ORF54 유전자이다. 하나의 구현예에서, 터미네이터는 BGH이다. 하나의 구현예에서, 링커는 2A 유전자이다. 하나의 구현예에서, 발현 카세트는 CMV-P1-2A-3C-2A-ORF43-BGH 작제물을 포함하거나 이것으로 이루어진다. 하나의 구현예에서, 발현 카세트는 CMV-P1-2A-3C-2A-ORF54-BGH 작제물을 포함하거나 이것으로 이루어진다. 하나의 구현예에서, CMV-P1-2A-3C-2A-ORF43-BGH 작제물의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 8을 포함하거나 서열번호 8로 나타낸다. 하나의 구현예에서, CMV-P1-2A-3C-2A-ORF54-BGH 작제물의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 9를 포함하거나 서열번호 9로 나타낸다.

[0030] 본 발명은 추가로 본 발명의 재조합 바이러스를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명의 숙주 세포는 진핵 숙주 세포주를 포함하고, 이는 본 발명에 따른 재조합 바이러스의 복제를 허용함을 특징으로 한다. 하나의 구현예에서, 상기 숙주 세포주는 포유동물 세포주 또는 곤충 세포주이고 가장 바람직하게는 RK13 세포주, MDBK 세포주, ST 세포주, AI-ST 세포주, VERO 세포주, Sf9 세포주, Sf21, MDCK 세포주, 및/또는 이의 유도체이다. 하나의 구현예에서, 숙주 세포주는 MDBK 세포주이다.

[0031] 본 발명은 추가로 하기의 단계를 특징으로 하는, 숙주 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다: a). 진핵 숙주 세포주를 본 발명의 재조합 바이러스로 감염시키는 단계; b). 적합한 조건하에 상기 감염된 세포를 배양하는 단계 및 c). 임의로 상기 숙주 세포를 수거하는 단계.

[0032] 상기 열거한 포유동물 숙주 세포주는 일반적으로 포유동물 세포 배양을 위한 배지, 예를 들어, 얼 염(Earle's salt) 및 소태아 혈청을 보충한 최소 필수 배지 (MEM) 중에 침지시킨 플라스틱 조직 배양 용기 중에서 배양한다. 상기 포유동물 세포주를 5% CO₂ 및 약 80% 습도가 보충된 통상적인 분위기 중에서 37°C의 항온배양기 중에서 유지시킨다. 곤충 세포주는 곤충 세포 배양 배지 중에 침지시킨 플라스틱 조직 배양 용기 중에서 배양하고, 항온배양기 중의 통상적인 분위기 중에서 27°C로 유지시킨다.

[0033] 본 발명은 추가로 본 발명의 재조합 바이러스 및/또는 본 발명의 재조합 바이러스에 의해 발현되는 목적하는 폴리펩타이드를 포함하는, 면역원성 조성물, 약제학적 조성물 또는 백신 조성물에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 면역원성/약제학적/백신 조성물은 다음을 포함한다: a). 본 발명의 재조합 바이러스; 및/또는 b). 본 발명의 재조합 바이러스에 의해 발현된 목적하는 폴리펩타이드; 및 c). 임의로 약제학적 또는 수의학적으로 허용되는 담체 또는 부형제, 바람직하게는 경구, 피내, 근육내 또는 비강내 적용을 위해 적합한 담체.

[0034] 본 발명은 추가로 하기의 단계를 포함하는, 면역원성/약제학적/백신 조성물을 제조하기 위한 방법에 관한 것이다: a). 본 발명의 숙주 세포주를 본 발명의 재조합 바이러스로 감염시키는 단계; b). 적합한 조건하에서 감염된 세포를 배양하는 단계; c). 감염된 세포를 수거하는 단계; d). 임의로 단계 c)의 수거물을 정제하는 단계; 및 e). 상기 수거물을 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 단계. 하나의 구현예에서, 상기 수거물은 감염된 세포에 의해 생성된 재조합 바이러스이거나 상기 수거물은 재조합 바이러스에 의해 발현된 목적하는 폴리펩타이드이다.

[0035] 본 발명은 추가로 면역원성/약제학적/백신 조성물의 제조에서 본 발명의 재조합 바이러스의 용도에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 면역원성/약제학적/백신 조성물은 동물에 있어서 병원체에 의한 감염으로 야기된 임상 징후 또는 질환을 예방하고/하거나 치료하기 위해 사용하거나, 동물에 있어서 병원체에 의한 감염을 치료하거나 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이고, 바람직하게는 상기 동물은 돼지와 같은 식품 생산 동물이다.

- [0036] 본 발명은 추가로 동물에 있어서 병원체에 의한 감염으로 야기된 임상 징후 또는 질환을 감소 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 또는 동물에 있어서 병원체에 의한 감염을 치료하거나 예방하는 방법에 사용하기 위한, 본 발명의 재조합 바이러스 또는 본 발명의 면역원성/약제학적/백신 조성물에 관한 것이고, 바람직하게는 상기 동물은 돼지와 같은 식품 생산 동물이다.
- [0037] 본 발명은 추가로 본 발명의 재조합 바이러스 또는 본 발명의 면역원성/약제학적/백신 조성물을 동물에게 투여함을 포함하는, 돼지를 포함하는 식품 생산 동물과 같은 동물을 면역화시키기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명은 추가로 돼지를 비롯한 식품 생산 동물과 같은 동물에서 병원체에 의해 야기된 임상 질환에 대해 상기 동물을 면역화시키는 방법으로서, 상기 방법은 본 발명의 재조합 바이러스 또는 본 발명의 면역원성/약제학적/백신 조성물을 상기 동물에게 투여하는 단계를 포함함으로써, 상기 재조합 바이러스 또는 상기 면역원성/약제학적/백신 조성물은 감염의 임상 징후를 유발하지는 않지만 상기 병원체의 병원성 형태에 대하여 상기 동물을 면역화시키는 면역 반응을 유도할 수 있다.
- [0039] 하나의 구현예에서, 면역화는 한 집단에 있어서 특정 바이러스 감염의 발생률을 감소시키거나, 또는 특정 바이러스 감염에 의해 야기되거나 이와 관련된 임상 징후의 중증도를 감소시킨다.
- [0040] 추가로, 본원에 제공된 면역원성 조성물을 필요로 하는 식품 생산 동물의 상기 면역원성 조성물을 사용한 면역화는 바이러스 감염에 의한 식품 생산 동물의 감염을 예방한다. 보다 더 바람직하게는, 면역화는 상기 바이러스 감염에 대해 효과적이고, 장기간 지속되는 면역학적 반응을 유도한다. 상기 기간은 2개월 이상, 바람직하게는 3개월 이상, 보다 바람직하게는 4개월 이상, 보다 바람직하게는 5개월 이상, 보다 바람직하게는 6개월 이상 지속될 것이라는 점을 이해해야 할 것이다. 상기 면역화는 면역화된 모든 동물/대상체에서 효과적이지 않을 수 있다는 점도 이해되어야 할 것이다. 그러나, 상기 용어는 한 집단의 동물/대상체들 중 상당 부분이 효과적으로 면역화되어야 함을 필요로 한다.
- [0041] 본 발명은 본 발명의 치료학적 유효량의 재조합 바이러스 또는 본 발명의 면역원성/약제학적/백신 조성물을 동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 식품 생산 동물과 같은 동물에서 바이러스에 의해 야기된 임상 징후의 치료 또는 예방을 위한 방법에 관한 것이다.
- [0042] 바람직하게는, 상기 임상 징후는, 치료 또는 예방되지 않고 (또는 면역화되지 않은) 이후 바이러스에 감염된 동물과 비교했을 때, 적어도 50%까지, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 60%까지, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 70%까지, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 80%까지, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 90%까지, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95%까지, 가장 바람직하게는 100%까지 감소한다.
- [0043] 하나의 구현예에서, 상기 언급된 바와 같은 임상 징후 또는 질환은 아프토바이러스 속 및 알파헤르페스비리내 속의 바이러스에 의해 야기되거나, 바람직하게는 FMDV에 의해 야기된다.
- [0044] 본 발명은 추가로, 동물에 있어서 병원체와 관련된 질환에 대하여 동물, 바람직하게는 돼지 또는 소와 같은 식품 생산 동물을 백신접종하고/하거나, 병원체와 관련되거나 병원체에 의해 야기된 하나 이상의 임상 징후의 발생률 또는 중증도를 감소시키기 위한 키트에 관한 것이다: 본 발명의 키트는 다음을 포함한다: a). 백신을 상기 동물에게 투여할 수 있는 분배기; b). 본 발명의 면역원성/약제학적/백신 조성물, 및 c). 임의로 지침 진단지.
- [0045] 일반 정의
- [0046] 달리 정의되지 않는 경우, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 출원 시점에 본 발명이 속하는 당업계의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 용어의 의미 및 범위는 명확해야 하지만, 임의의 잠재적 모호성이 있는 경우에는 본 명세서에 제공된 정의가 임의의 사전 또는 외부 정의보다 우선한다. 또한, 문맥에 의해 달리 요구되지 않는다면, 단수의 용어는 복수를 포함해야 하며, 복수의 용어는 단수를 포함해야 한다. 본 명세서에서, "또는"의 사용은, 달리 언급하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 또한, "포함하는"이라는 용어 뿐만 아니라 "포함한다" 및 "포함되는"과 같은 다른 형태의 사용은 제한적이지 않다. 본 명세서에서 언급되는 모든 특허 및 간행물은 본 명세서에 참조로서 포함된다.
- [0047] 본 발명의 실시는, 달리 언급하지 않는 한, 당해 분야의 기술 범위에 속하는, 바이러스학, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술, 단백질 화학 및 면역학의 통상적인 기술을 사용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌(Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. I, II and III, Second Edition (1989); DNA Cloning, Vols. I and II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J.

Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture (R. K. Freshney ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL press, 1986); Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the series, Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Protein purification methods - a practical approach (E.L.V. Harris and S. Angal, eds., IRL Press at Oxford University Press); 및 Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications)을 참조한다.

- [0048] 본 명세서에 사용되는 용어는 단지 본 발명의 특정 구현예를 설명하기 위한 것이며 한정하는 것으로 의도되지 않는다는 것을 또한 이해해야 한다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 단수 형태 ("a", "an" 및 "the")는, 내용이 명백하게 달리 지시하지 않는다면, 복수에 대한 언급을 포함한다는 것에 주의해야 한다. 따라서, 예를 들어, "항원"에 대한 언급은 2종 이상의 항원의 혼합물을 포함하며, "부형제"에 대한 언급은 2종 이상의 부형제 등의 혼합물을 포함한다.
- [0049] 분자 생물학 정의
- [0050] 본 명세서에서 사용되는 "핵산", "핵산 서열", "뉴클레오타이드 서열", "폴리뉴클레오타이드", "폴리뉴클레오타이드 서열", "RNA 서열" 또는 "DNA 서열"이라는 용어는, 올리고뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드, 및 이의 단편 및 일부, 또는 단일 또는 이중 가닥일 수 있고 센스 또는 안티센스 가닥을 나타낼 수 있는 게놈 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA를 지칭한다. 서열은 비-암호화 서열, 암호화 서열 또는 둘 다의 혼합물일 수 있다. 본 발명의 핵산 서열은 당해 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려진 표준 기술을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0051] "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"라는 용어는 또한 5개의 생물학적으로 발생하는 염기 (아데닌, 구아닌, 티민, 사이토신 및 우라실) 이외의 염기로 구성된 핵산을 포함한다.
- [0052] 용어 "폴리펩타이드"는 생물학적으로 존재하는 펩타이드 (아미드) 결합에 의해 연결된 아미노산 단량체의 단쇄이다. 본 발명과 관련하여, 달리 지적되지 않은 경우, 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 상호교환될 수 있다.
- [0053] 용어 "목적하는 폴리펩타이드"는 목적하는 생성물을 암호화하는 임의의 길이의 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드를 언급한다. 특정 양상에서, 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 외인성이다. 정의에 따르면, 재조합 바이러스에 함유된 모든 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 모든 유전자 및 이에 의해 암호화된 각각의 단백질 또는 RNA는 특히, 상이한 (바이러스) 종으로부터 유래할 때, "외인성", "외인성 서열", "외인성 유전자", "외인성 암호화 서열" 또는 "전이유전자"로서 언급된다. 특정 양상에서, 목적하는 폴리펩타이드는 항원성 폴리펩타이드 또는 치료학적 폴리펩타이드이다. 특정 양상에서, 목적하는 폴리펩타이드는 FMDV 항원이다. 본 발명과 관련하여, 달리 지적되지 않은 경우, 용어 "목적하는 폴리펩타이드" 및 "표적 단백질"은 상호교환될 수 있다.
- [0054] 당업계에 알려진 "벡터"라는 용어는, 숙주 세포에 유전 물질을 전달하는데 사용되는 폴리뉴클레오타이드 작제물, 전형적으로는 플라스미드 또는 세균 인공 염색체를 지칭한다. 벡터는, 예를 들어, 세균, 바이러스, 파아지, 세균 인공 염색체, 코스미드 또는 플라스미드일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 벡터는 DNA 또는 RNA로 구성되거나 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터는 DNA로 구성된다. 일부 구현예에서, 벡터는 감염성 바이러스이다. 이러한 바이러스 벡터는 바이러스 벡터의 복제시에 세포 배양물에서나 숙주 동물에서 어떠한 기능도 갖지 않는 외래 유전자를 운반하는 방식으로 조작된 바이러스 게놈을 함유한다. 특정 양상에서, 벡터는 유전 물질의 단순한 전달, 숙주 세포 또는 유기체의 형질감염, 백신, 예를 들어, DNA 백신으로서의 사용 또는 유전자 발현 목적과 같은 다양한 목적을 위해 사용될 수 있다. 유전자 발현은 유전자라고 불리는 특정 폴리 뉴클레오타이드 서열에 의해 지시된 바와 같이 세포에서 단백질의 생합성을 기재하는 용어이다. 특정 양상에서, 벡터는 적절한 환경에 존재할 때 벡터에 의해 운반되는 1종 이상의 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 발현을 지시할 수 있는 벡터인 "발현 벡터"일 수 있다.
- [0055] 발현을 위해 벡터 (또는 재조합체)를 제조하고/하거나 사용하기 위한 벡터 및 방법은 다음 문헌에 개시된 것들일 수 있거나 이들과 유사할 수 있다: 미국 특허 4,603,112, 4,769,330, 5,174,993, 5,505,941, 5,338,683, 5,494,807, 4,722,848, 5,942,235, 5,364,773, 5,762,938, 5,770,212, 5,942,235 및 382,425, PCT 국제공개공보 WO 94/16716, WO 96/39491 및 WO 95/30018; 문헌 [Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update, "PNAS USA 93: 11349-11353, October 1996; Moss, "Genetically engineered

poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93: 11341-11348, October 1996], 스미스 등의 미국 특허 4,745,051 (재조합 바큘로바이러스), 문헌 [Richardson, C. D. (Editor), Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.)], [Smith et al., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", Molecular and Cellular Biology, December, 1983, Vol. 3, No. 12, p. 2156-2165], [Pennock et al., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector", "Molecular and Cellular Biology March 1984, Vol. 4, No. 3, p. 406], 유럽 공개특허 EPA 0 370 573, 1986년 10월 16일자로 출원된 미국 특허 출원 920,197, 유럽 공개특허 265 785; 미국 특허 4,769,331 (재조합 헤르페스바이러스), 문헌 [Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93:11307-11312, October 1996], [Andreansky et al., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93: 11313-11318, October 1996], [Robertson et al., "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", PNAS USA 93: 11334-11340, October 1996], [Frolov et al., "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications," PNAS USA 93: 11371-11377, October 1996], [Kitson et al., J. Virol. 65, 3068-3075, 1991], 미국 특허 5,591,439 및 5,552,143; 국제공개공보 WO 98/00166; 1996년 7월 3일자로 출원되고 특허결정된 미국 출원 08/675,556 및 08/675,566 (재조합 아데노바이러스); 문헌 [Grunhaus et al., 1992, "Adenovirus as cloning vectors," Seminars in Virology (Vol. 3) p. 237-52, 1993], [Ballay et al. EMBO Journal, vol. 4, p. 3861-65, Graham, Tibtech 8, 85-87, April, 1990; Prevec et al., J. Gen Virol. 70, 42434], PCT 국제공개공보 WO 91/11525, 문헌 [Felgner et al. (1994), J. Biol. Chem. 269, 2550-2561, Science, 259: 1745-49, 1993] 및 [McClements et al., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93: 11414-11420, October 1996] 및 미국 특허 5,591,639, 5,589,466 및 5,580,859, 및 국제공개공보 WO 90/11092, WO 93/19183, WO 94/21797, WO 95/11307 및 WO 95/20660; 문헌 [Tang et al., Nature, and Furth et al., Analytical Biochemistry, relating to DNA expression vectors]. 또한, 국제공개공보 WO 98/33510; 문헌 [Ju et al., Diabetologia, 41: 736-739, 1998 (lentiviral expression system)], 스탠포드 등의 미국 특허 4,945,050; 문헌 [Fischbach et al. (Intracel)]; 국제공개공보 WO 90/01543; 문헌 [Robinson et al., Seminars in Immunology vol. 9, pp. 271-283 (1997), (DNA vector systems)], 스조카 등의 미국 특허 4,394,448 (DNA를 생세포에 삽입하는 방법); 맥코믹 등의 미국 특허 5,677,178 (세포병변 바이러스의 용도) 및 미국 특허 5,928,913 (유전자 전달용 벡터); 및 본 명세서에 인용된 기타 문헌들을 참조한다.

[0056] "바이러스 벡터" 라는 용어는, 숙주 세포 내로의 진입이 특정한 생물학적 활성, 예를 들어, 벡터에 의해 운반되는 외래 표적 유전자의 발현을 초래할 수 있는 방식으로, 재조합 DNA 기술에 의해 조작된 유전적으로 변형된 바이러스를 기재한다. 바이러스 벡터는 표적 세포, 조직 또는 유기체에서 복제 능력이 있을 수 있거나 없을 수 있다. 바이러스 벡터는 임의의 공지된 유기체의 계놈으로부터 유래된 서열을 포함할 수 있다. 서열은 이의 원래 형태로 도입될 수 있거나, 목적하는 활성을 수득하기 위해 임의의 방식으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 상기 서열은 삽입, 결실 또는 치환을 포함할 수 있다. 바이러스 벡터는 또한 외인성 폴리뉴클레오타이드 서열에 대한 삽입 부위를 포함할 수 있다. 특정 양상에서, 바이러스 벡터는 헤르페스비리대, 예를 들어, EHV-1이다.

[0057] 바이러스 벡터의 생성은 당업계에 널리 공지된 임의의 적합한 유전자 가공 기술을 사용하여 성취될 수 있고, 상기 기술은 제한 없이 예를 들어, 하기 문헌에 기재된 바와 같이 제한 엔도뉴클레아제 분해, 연결, 형질전환, 플라스미드 정제, DNA 서열 분석, 세포 배양물 중에서 형질감염을 포함한다(문헌참조: Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)) or K. Maramorosch and H. Koprowski (Methods in Virology Volume VIII, Academic Press Inc. London, UK (2014)).

[0058] 용어 "재조합 바이러스"는 바이러스 계놈의 인공 조작, 즉 재조합 DNA 기술에 의해 이의 계놈 내 외인성 서열을 포함하는 바이러스를 기재하기 위해 사용된다. 특정 양상에서, 외인성 항원 암호화 서열과 같은 외인성 서열을 포함하는 바이러스는 재조합 바이러스이다. 특정 양상에서, 재조합 바이러스는 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 서열을 함유하는 바이러스로서 간주될 수 있다. 특정 양상에서, 재조합 바이러스는 헤르페스비리대, 예를 들어, EHV-1로부터 유래하고, 표적 유전자를 포함한다.

[0059] 재조합 바이러스를 제조하기 위한 재조합 DNA 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있고 일반적으로 DNA 재조합 및 조작 방법에 의해 변형될 수 있는 바이러스 계놈의 전장 상보적 DNA 카피물 (감염성 클론)의 작제물을

사용한다.

- [0060] 용어 “기능적으로 연결된” 또는 “작동적으로 연결된”은 조절 요소들과 유전자 또는 이의 암호화 영역 간의 연결을 기재하기 위해 사용된다. 전형적으로, 유전자 발현은 1종 이상의 조절 요소, 예를 들어, 제한적이지 않은 항시성 또는 유도성 프로모터, 조직-특이적인 조절 요소 및 인헨서의 제어하에 놓이게 된다. 유전자 또는 암호화 영역은 조절 요소에 “작동가능하게 연결된” 또는 “작동적으로 연결된” 또는 “작동가능하게 연합된” 또는 “기능적으로 연결된” 것으로 일컬어지고, 유전자 또는 암호화 영역이 조절 요소에 의해 제어되거나 영향을 받는 것을 의미한다. 예를 들어, 프로모터가 암호화 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미친다면, 프로모터는 암호화 서열에 작동가능하게 연결되어 있다.
- [0061] 추가로, 본원의 기재내용과 관련하여, 용어 “기능적 연결”, “기능적으로 연결된”, “작동가능하게 연결된” 또는 “작동가능하게 연결된”은 2개 이상의 핵산 서열이 이들 각각이 올바른 형태로 발현되도록 하고 목적하는 방식으로 기능하도록 하는 방식으로 위치함을 의미한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 필수 유전자 서열의 전사 또는 해독이 폴리뉴클레오타이드의 올바른 발현에 의존하는 경우 필수 유전자 서열에 기능적으로 연결되어 있다.
- [0062] “개방 판독 프레임” 또는 “ORF”는 ATG 또는 AUG와 같은 해독 시작 신호 또는 개시 코돈 및 종결 코돈을 포함하는 핵산 서열, 즉, DNA 또는 RNA의 길이를 지칭하며, 잠재적으로 폴리펩타이드 서열로 해독될 수 있다.
- [0063] “2개의 폴리뉴클레오타이드는 동일한 ORF 내에 있다”는 2개의 폴리뉴클레오타이드가 동일한 전사 분자 내에 있고 동일한 해독 개시 신호 또는 개시 코돈 및 동일한 종결 코돈을 공유하는 수단을 언급한다. 특정 양상에서, 표적 유전자 및 필수 유전자는 동일한 전사 분자 내에 있고 동일한 해독 개시 신호 또는 개시 코돈 및 동일한 종결 코돈을 공유한다.
- [0064] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “발현”은 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 언급한다. 본 발명의 특정 양상에 따르면, “발현”이라는 용어는 외인성 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 지칭한다.
- [0065] 용어 “발현 카세트” 또는 “전사 유닛”은 전사될 하나 이상의 유전자를 함유하는 재조합 바이러스의 게놈 내의 영역을 한정한다. 특정 양상에서, 발현 카세트에 함유된 유전자는 표적 유전자 및 재조합 바이러스의 내인성 필수 유전자일 수 있다. 특정 양상에서, 발현 카세트에 함유된 유전자는 표적 유전자 및 외인성 필수 유전자일 수 있다. 발현 카세트 내에 함유된 조절 요소들을 함유하는 폴리뉴클레오타이드 서열 뿐만 아니라 전사된 유전자(들)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서로 작동가능하게 연결되어 있다. 이들은 프로모터로부터 전사되고, 전사는 적어도 하나의 폴리아데닐화 신호에 의해 종결된다. 하나의 특정 양상에서, 이들은 하나의 단일 프로모터로부터 전사된다. 결과적으로, 상이한 유전자들은 적어도 전사적으로 연결되어 있다. 1종 초과인 단백질 또는 생성물은 각 전사 유닛 (다시스트론성 전사 유닛)으로부터 전사되고 발현될 수 있다. 각 전사 유닛은 유닛 내에 함유되는 임의의 선택된 서열의 전사 및 해독에 필요한 조절 요소를 포함할 것이다. 각 전사 유닛은 동일하거나 상이한 조절 요소를 함유할 수 있다. 예를 들어, 각 전사 유닛은 동일한 터미네이터를 함유할 수 있으며, IRES 요소 또는 인트론은 전사 유닛 내에서 유전자의 기능적 연결을 위해 사용될 수 있다.
- [0066] 용어 “필수 유전자”는 유기체의 복제를 위해 필수적인 유전자들을 의미하고 따라서 생명의 기초로 간주된다. 필수 유전자의 “기능성 단편” 또는 “기능성 유도체”라는 용어는, 단편 또는 유도체가 여전히 필수 유전자 활성화에 영향을 미친다는 것을 의미한다. 바이러스와 관련하여, 유전자는 또한 이의 결실이 단일 단계 또는 다단계 성장 곡선에서 10-배 초과인 바이러스 역가에서 감소를 유도하는 경우 필수 (즉 세포 배양에서 역할을 하는)인 것으로 고려된다. 필수 유전자들의 대부분은 중앙 대사를 유지하고, DNA를 복제하고, 유전자를 단백질로 해독하고, 기본 세포 구조를 유지하고 세포 내외부의 수송 과정을 매개하는 단백질을 암호화한다. 바이러스와 관련하여, 래핑된 비리온 생성, 액틴 테일 형성 및 세포외 비리온 방출에 관여하는 모든 유전자들은 필수인 것으로 간주된다. 2개의 주요 전략을 사용하여 게놈-와이드 기반 상에서 필수 유전자, 유전자의 지시된 결실 및 트랜스포존을 사용한 무작위 돌연변이 유발을 동정하였다. 첫번째 경우에, 개별 유전자(또는 ORF)는 체계적인 방식으로 게놈으로부터 완전히 결실되어 있다. 트랜스포존-매개된 돌연변이유발에서, 트랜스포존은 가능한한 게놈 내 많은 위치에 무작위로 삽입되어 표적화된 유전자를 불활성화시킨다. 여전히 생존할 수 있거나 성장할 수 있는 삽입 돌연변이체는 필수 유전자에 있지 않다. (문헌참조: Zhang, R., 2009 & Gerdes, S., 2006).
- [0067] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “내인성”은 종에 천연적으로 존재하는 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질을 언급한다. 필수 유전자는 “바이러스의 내인성 필수 유전자”인 것으로 일컬어지고, 이는 필수 유전자가 바이러스의 게놈에 천연적으로 존재함을 의미한다. 특정 양상에서, 표적 유전자는 재조합 바이러스의 내인성 필수 유전자의

업스트림에 삽입되고 상기 필수 유전자에 기능적으로 연결된다.

- [0068] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "외인성"은 외래 종으로부터 또는 동일한 종이라도 이의 본래의 형태로부터 가공된 경우로부터 기원하거나 생성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질을 언급한다. 특정 양상에서, 재조합 바이러스의 내인성 필수 유전자는 사일런싱되고 동일한 외인성 필수 유전자는 표적 유전자의 다운스트림에 삽입되고 여기에 기능적으로 연결된다.
- [0069] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "작제물"은 인공적으로 생성된 플라즈미드와 같은 재조합 핵산을 언급한다.
- [0070] "조절 요소", "조절 핵산" 및 "발현 제어 요소"라는 용어는 상호교환적으로 사용되며, 특정 숙주 유기체에서 작동가능하게 연결된 암호화 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 이들 용어는 프로모터, 프로모터 서열, RNA 폴리머라아제와 전사 인자의 기본 상호 작용에 필요한 핵심 요소, 업스트림 요소, 인핸서 및 반응 요소를 비롯하여 전사를 촉진하거나 조절하는 모든 요소에 광범위하게 사용되거나 이를 포함한다. 원핵 세포에서의 예시적인 조절 요소는 프로모터, 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포에서 사용되는 조절 요소는, 숙주 세포에서 암호화 서열의 발현 및/또는 암호화된 폴리펩타이드의 생산을 제공하고/하거나 조절하는, 프로모터, 인핸서, 스플라이싱 신호, 폴리아데닐화 신호, 터미네이터, 단백질 분해 신호, 내부 리보솜 진입 부위 (IRES), 피코나바이러스(picornaviridal) 2A 서열 등과 같은 전사 및 해독 제어 서열을 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0071] 본원에 사용된 바와 같은, "프로모터" 또는 "프로모터 서열"이라는 용어는, RNA 폴리머라아제의 결합을 허용하고 유전자의 전사를 지시하는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 전형적으로, 프로모터는 유전자의 전사 시작 부위에 근접한 유전자의 5'-비암호화 영역에 위치한다. 전사의 개시에서 기능하는 프로모터 내의 서열 요소는 종종 컨센서스 뉴클레오타이드 서열을 특징으로 한다. 프로모터의 예로는 세균, 효모, 식물, 바이러스 및 동물, 예를 들어, 포유 동물 (말, 돼지, 소 및 사람 포함), 조류 또는 곤충으로부터 유래하는 프로모터가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 프로모터는 유도성, 억제성 및/또는 항시성일 수 있다. 유도성 프로모터는 온도 변화와 같은 배양 조건의 일부 변화에 대응하여 이의 제어하에 DNA로부터 전사의 증가된 수준을 개시되게 한다 (문헌 [Ptashne, 2014]). 당업자에게 널리 공지된 프로모터의 예는 예를 들어 CMV-5이다. SV40 대형 T, HCMV 및 MCMV 이메디에이트 어얼리 유전자 1, 사람 연장 인자 알파 프로모터.
- [0072] 용어 "인핸서"는 프로모터의 활성화에 대해 시스 위치에서 작용하고 따라서 상기 프로모터에 기능적으로 연결된 유전자 또는 암호화 서열의 전사를 자극하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 프로모터와 달리, 인핸서의 효과는 위치 및 배향과 무관하므로, 인트론 내에서 또는 심지어 암호화 영역 내에서 전사 유닛의 앞 또는 뒤에 위치할 수 있다. 인핸서는 전사 유닛의 바로 근처에 및 프로모터로부터 상당한 거리에 위치할 수 있다. 또한, 프로모터와 물리적 및 기능적 중첩을 가질 수 있다. 당업자는 독립적 요소 또는 폴리뉴클레오타이드 서열 내 클로닝된 요소 (예를 들어, ATCC에 또는 상업 및 산업 공급원에 기탁된)로서 가용한 다양한 공급원으로부터 (및 GenBank와 같은 데이터뱅크에 기탁된, 예를 들어, SV40 인핸서, CMV 인핸서, 폴리오마 인핸서, 아데노바이러스 인핸서) 다수의 인핸서를 알고 있다. 다수의 프로모터 서열은 또한 흔히 사용되는 CMV 프로모터와 같이 인핸서 서열을 함유한다. 사람 CMV 인핸서는 지금까지 동정된 가장 강한 인핸서 중 하나이다. 유도가능한 인핸서의 하나의 예는 글루코코르티코이드 또는 중금속에 의해 자극될 수 있는, 메탈로티오네인 인핸서이다.
- [0073] "전사-조절 요소"는 통상적으로 발현하고자 하는 유전자 서열의 업스트림에 프로모터를 포함하고, 전사 개시 및 종결 부위 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다.
- [0074] "전사 개시 부위"라는 용어는 1차 전사물, 즉, mRNA 전구체에 도입된 제1 핵산에 상응하는 작제물 내의 핵산을 지칭한다. 전사 개시 부위는 프로모터 서열과 중첩될 수 있다.
- [0075] "종결 신호" 또는 "터미네이터" 또는 "폴리아데닐화 신호" 또는 "폴리A" 또는 "전사 종결 부위" 또는 "전사 종결 요소"는, 진핵세포 mRNA의 3'-말단의 특정 부위에서의 절단 및 절단된 3'-말단에서 약 100~200개의 아데닌 뉴클레오타이드 (폴리 A 테일)의 서열의 전사후 도입을 유발시켜서, RNA 폴리머라아제가 전사를 종결하게 하도록 하는 신호 서열이다. 폴리아데닐화 신호는 절단 부위의 약 10~30개의 뉴클레오타이드 업스트림의 서열 AATAAA 및 다운스트림에 위치한 서열을 포함한다. tk 폴리 A, SV40 후기 및 초기 폴리 A, BGH 폴리 A (예를 들어, 미국 특허 5,122,458에 개시되어 있음) 또는 햄스터 성장 호르몬 폴리 A (국제공개공보 WO 2010010107)와 같은 다양한 폴리아데닐화 요소가 공지되어 있다.
- [0076] "해독 조절 요소"는 발현하고자 하는 각각의 개별 폴리펩타이드에 대한 해독 개시 부위 (AUG), 정지 코돈 및 폴리 A 신호를 포함한다. 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)가 일부 작제물에 포함될 수 있다. 발현을 최적화하기

위해, 발현하고자 하는 핵산 서열의 5'- 및/또는 3'-비해독 영역을 제거, 부가 또는 변경하여 전사 또는 해독의 수준에서 발현을 감소시키거나 방해할 수 있는 임의의 잠재적인 여분의 부적절한 대체 해독 개시 코돈 또는 다른 서열을 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 컨센서스 리보솜 결합 부위 (Kozak 서열)는 개시 코돈의 바로 업스트림에 삽입되어 해독 및 이에 따른 발현을 증진시킬 수 있다. 이러한 리보솜 결합 부위 주변의 A/U 함량이 더욱 증가하면 리보솜 결합은 더욱 효율적이다.

- [0077] 또한, 프레이밍 오차 또는 관독 프레임 전환으로 불리우는 용어 “프레임의 돌연변이”는 3개로 나누어질 수 없는 DNA 서열 내 다수의 뉴클레오타이드의 인델 (indel) (삽입 또는 결실)에 의해 유발된 유전자 돌연변이를 언급한다. ORF 내 프레임의 돌연변이는 ORF 내 비정상적인 유전자의 발현을 초래한다.
- [0078] 용어 "유전자 사일런싱"은 유전자를 “중단(turning off)” 시켜 이것이 단백질 생성 형태로의 발현 또는 다른 형태의 발현을 하지 못하게 한다. 유전자 사일런싱은 유전자의 불능화가 유전자의 목적을 결정하는 고도로 효과적인 방식이기 때문에 중요한 연구 기술이다. 유전자는 다양한 상이한 방식으로 및 많은 상이한 기전 중 하나를 통해 사일런싱될 수 있다. 유전자 사일런싱은 흔히 유전자 녹아웃과 동일한 것으로 간주된다. 즉, 유전자가 녹아웃되는 경우, 이들은 유기체의 계놈으로부터 완전히 소멸됨에 따라 어떠한 발현을 갖지 않는다. 본 발명의 문맥 내에서, 유전자 사일런싱은 또한 유전자의 발현이 유전자의 잔여 활성이 이의 기능을 성취하는데 충분하지 않은 수준으로 감소함을 포함한다. 예를 들어, 특정 양상에서, 바이러스의 내인성 필수 유전자는 필수 유전자의 잔여 활성이 외인성으로 도입되고 표적 유전자와 기능적으로 연결된 필수 유전자 상의 표적 유전자의 제어에 영향을 미칠 수 없는 수준으로 사일런싱되어 있다.
- [0079] "숙주 세포"는 재조합 바이러스 복제할 수 있는 세포를 지칭한다. 특정 양상에서, 숙주 세포는 진핵성 숙주 세포주, 바람직하게 포유동물 세포주 또는 곤충 세포주일 수 있다. 숙주 세포는 RK13 세포주, MDBK 세포주, ST 세포주, AI-ST 세포주, VERO 세포주, Sf9 세포주, Sf21, MDCK 세포주, 및/또는 이의 유도체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0080] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "안정한 발현" 또는 "발현 안정성"은 재조합 바이러스가 이의 계대 동안에 외인성 폴리뉴클레오타이드의 상실 또는 외인성 폴리뉴클레오타이드에서 임의의 프레임의 돌연변이 없이 외인성 폴리뉴클레오타이드를 올바르게 발현할 수 있음을 의미한다. 본 발명과 관련하여, 외인성 폴리뉴클레오타이드의 안정한 발현은 외인성 폴리뉴클레오타이드가 재조합 바이러스의 필수 유전자에 기능적으로 연결되고 필수 유전자의 업스트림에 위치하도록 함에 의해 성취된다. 외인성 폴리뉴클레오타이드의 상실 또는 외인성 폴리뉴클레오타이드 내 프레임의 돌연변이를 갖는 재조합 바이러스는 복제하지 않고 따라서 재조합 바이러스 배양 액체로부터 제거된다. 따라서, 배양 액체에 존재하는 우성 재조합 바이러스는 외인성 폴리뉴클레오타이드 및 필수 유전자를 올바르게 동시 발현할 수 있는 것들이다.
- [0081] 외인성 폴리뉴클레오타이드의 발현은 다양한 방법에 의해, 예를 들어, ELISA에 의해, 웨스턴 블롯팅에 의해, 방사선 면역 검정법에 의해, 면역 침전에 의해, 단백질의 생물학적 활성에 대한 검정에 의해, 또는 단백질의 면역 염색 후의 FACS 분석에 의해 결정될 수 있다. 특정 양상에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드의 발현은 웨스턴 블롯팅에 의해 결정된다.
- [0082] EHV-1 정의
- [0083] "헤르페스 바이러스" 또는 "헤르페스 바이러스 벡터"는 헤르페스비알레스 목의 헤르페스비리대 과에 속하는 종을 지칭한다.
- [0084] "에퀴드 헤르페스 바이러스 벡터" 또는 "에퀴드 헤르페스 바이러스" 또는 "EHV"라는 용어는, 말에 영향을 미치는 헤르페스비리대 과의 구성원을 의미한다. 지금까지, 8종의 상이한 에퀴드 헤르페스바이러스가 확인되었는데, 5종은 알파헤르페스비리내 아과 (EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 및 EHV-9)에 속하며, 3종은 감마헤르페스비리내 아과에 속한다. (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Virus Taxonomy: 2015 Release EC 47, London, UK, July 2015; Email ratification 2016 (MSL #30).
- [0085] “에퀴드” 또는 “에퀴네” 또는 “에퀸 (equin)”이라는 용어는, 말, 당나귀 및 얼룩말, 바람직하게는 말을 포함하는 말과를 의미하거나 이에 속한다. 또한, “에퀴드” 또는 “에퀴네” 또는 “에퀸”이라는 용어는 말과 구성원의 잡종 (예를 들어, 노새, 버새 등)을 포함한다.
- [0086] “EHV-1”이라는 용어는 헤르페스비리대 과의 알파헤르페스비리내 속의 바리셀로바이러스 아속의 구성원인 에퀴드 알파헤르페스바이러스 1을 의미한다. EHV-1에 대한 비제한적인 기준 서열은, 예를 들어, 야생형 EHV-1 종 ab4 (Genbank 수탁 번호 AY665713.1) 또는 RacH (Hubert 1996)이다. 특정 양상에서, 재조합 바이러스는 헤르

페스비리대 과로부터 유래하고 예를 들어, EHV-1 또는 EHV-4, 바람직하게 EHV-1이다.

- [0087] EHV-1 ORF43 유전자는 상호캡소머성 트리플렉스(intercapsomeric triplex)의 성분인 VP23으로서 공지된 캡시드 단백질을 암호화한다(문헌참조: Elizabeth A. R. Telford, et al, Journal of General Virology, 1998, 79, 1197-1203). 하나의 구현예에서, EHV-1 ORF43 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 5로 나타낸다.
- [0088] EHV-1 ORF54 유전자는 DNA 헬리카제-프라이마제(primase) 복합체의 성분인 단백질을 암호화한다(문헌참조: Elizabeth A. R. Telford, et al, Journal of General Virology, 1998, 79, 1197-1203). 하나의 구현예에서, EHV-1 ORF54 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 6으로 나타낸다.
- [0089] FMDV 정의
- [0090] “구제역 바이러스” 또는 “FMDV”는 피코나비리대 과의 아프토바이러스 속 중의 종을 언급한다.
- [0091] 용어 “P1 단백질” 또는 “단백질 P1”은 전구체 단백질이 4개 캡시드 단백질, VP4, VP2, VP3 및 VP1을 함유함을 의미한다. 성숙화 공정 동안에, 단백질 P1은 프로테아제 3C에 의해 VP0, VP1 및 VP3으로서 공지된 3개의 단백질로 절단된다. 비리온에서, 단백질 VP0은 이어서 2개의 단백질, VP4 및 VP2로 절단된다. 하나의 구현예에서, P1 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1로 나타낸다.
- [0092] 용어 “2A 펩타이드” 또는 “펩타이드 2A”는 자가-절단 펩타이드이고 여러 바이러스 과에 사용되고 다중 폴리펩타이드를 제조하기 위해 피코나비리대 과의 FMDV가 가장 잘 알려져 있다. FMDV에서, 2A 펩타이드는 P1-2A 전구체의 C-말단에 위치한다. 하나의 구현예에서, 2A 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 2로 나타낸다.
- [0093] 용어 “프로테아제 3C” 또는 “3C 프로테아제”는 프로테아제 및 엔도펩티다제 효소를 의미하고 이들은 비-말단 서열의 펩타이드 결합을 절단하는 피코나비리드에서 발견된다. 3C 프로테아제는 P3 전구체에 위치하고 P1 전구체 단백질을 VP0 (VP4 및 VP2의 전구체), VP3 및 VP1으로 프로세싱할 수 있다. 하나의 구현예에서, 3C 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 3으로 나타낸다.
- [0094] P1-2A-3C 카세트는 2A 펩타이드 유전자를 함유하는 서열에 의해 연결된 P1 유전자 및 3C 유전자를 함유하는 단일 ORF를 의미한다. 하나의 구현예에서, P1-2A-3C 유전자 카세트의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 4로 나타낸다.
- [0095] 백신 정의
- [0096] “면역원성 또는 면역학적 조성물”은 조성물에 대한 세포 또는 항체-매개된 면역 반응의 숙주에서 면역학적 반응을 유도하는 적어도 하나의 항원 또는 이의 면역 원성 부분을 포함하는 물질의 조성물을 지칭한다.
- [0097] 본 명세서에서 사용되는 “항원”이라는 용어는 당해 분야에서 잘 이해되고 있으며, 면역원성인 물질, 즉, 면역원 뿐만 아니라, 면역 무반응 또는 아네르기, 즉, 이물질에 대한 신체 방어 기작에 의한 반응의 결핍을 유도하는 물질을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 “항원”이라는 용어는, 전장 단백질 뿐만 아니라 에피토프를 함유하거나 포함하는 이의 펩타이드 단편을 의미한다.
- [0098] “식품 생산 동물”이라는 용어는, 돼지, 소, 가금류 등과 같은 사람의 소비를 위해 사용되는 동물을 의미하며, 바람직하게 식품 생산 동물은 돼지 및 소, 가장 바람직하게는 돼지를 의미한다. 본 발명의 특정 양상에서, “식품 생산 동물”은 소, 양, 염소 및 돼지, 바람직하게는 돼지를 포함하는 발굽이 갈라진 동물이다.
- [0099] 본 명세서에서 사용되는 “면역원성 조성물”은, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 면역학적 반응을 유도하는 바이러스 표면 단백질과 같은 단백질 또는 폴리펩타이드를 지칭할 수 있다. “면역원성 단편” 또는 “면역원성 부분”이라는 용어는, 1종 이상의 에피토프를 포함하고, 따라서 본 명세서에 기재된 면역학적 반응을 유도하는 단백질 또는 폴리펩타이드의 단편 또는 절단된 형태 및/또는 치환된 형태를 지칭한다. 일반적으로, 이러한 절단된 형태 및/또는 치환된 형태, 또는 단편은 전장 단백질로부터 유래된 적어도 6개의 연속 아미노산을 포함할 것이다. 이러한 단편은 당해 분야에 잘 알려진 임의의 수의 에피토프 맵핑 기술을 사용하여 확인할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey]을 참조한다. 예를 들어, 선형 에피토프는, 단백질 분자의 일부에 상응하는 다수의 펩타이드를 고체 지지체 상에서 동시에 합성하고, 펩타이드가 여전히 지지체에 부착되어 있는 동안 펩타이드를 항체와 반응시킴으로써, 결정될 수 있다. 상기 기술은 당업계에서 공지되어 있고 기재되어 있으며, 예를 들어, 문헌(미국 특허 제4,708,871호; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; and Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715)을 참조한다. 유사하게, 입체형태

에피토프는, 예를 들어, x선 결정학 및 2차원 핵 자기 공명 등에 의해 아미노산의 공간적 입체형태를 결정함으로써 용이하게 확인할 수 있다. 문헌 [Epitope Mapping Protocols, 상기와 동일]을 참조한다. 합성 항원은 또한, 예를 들어, 폴리에피토프, 플랭킹 에피토프 및 다른 재조합 또는 합성 유도된 항원의 정의 내에도 포함된다. 예를 들어, 문헌(Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann et al. (1996), J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408; and Gardner et al., (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, June 28-July 3, 1998)을 참조한다. (이의 교시 및 내용은 모두 본원에 참조로 인용된다)

[0100] 본 명세서에서 사용되는 "백신"이란 용어는, 동물에서 면역학적 반응을 유도하는 적어도 1종의 면역학적 활성 성분 및 가능하게는 반드시 아니지만 활성 성분의 면역 활성을 증진시키는 1종 이상의 추가 성분을 포함하는 약제학적 조성물을 지칭한다. 백신은 약제학적 조성물에 전형적인 추가 성분을 추가로 포함할 수 있다. 구별로서, 백신의 면역학적 활성 성분은 완전한 바이러스 입자를 원래의 형태로 또는 소위 변형된 생백신 (MLV)의 약독화된 입자로서 또는 소위 사백신 (KV)의 적절한 방법으로 불활성화된 입자로서 포함할 수 있다. 또 다른 형태에서, 백신의 면역학적 활성 성분은 유기체의 적절한 요소 (서브유닛 백신)를 포함할 수 있으며, 여기서, 이들 요소는 전체 입자 또는 이러한 입자를 함유하는 성장 배양물의 파괴, 및 임의로 목적하는 구조(들)를 제공하는 후속적인 정제 단계에 의해, 또는, 예를 들어, 세균, 곤충, 포유 동물 또는 다른 종에 기반한 적합한 시스템의 사용에 의한 적절한 조작을 포함하는 합성 공정 및 임의로 후속적인 분리 및 정제 절차에 의해, 또는 적합한 약제학적 조성물을 사용하는 유전 물질의 직접적인 도입 (폴리뉴클레오타이드 백신 접종)에 의해 백신을 필요로 하는 동물에서 합성 공정의 유도에 의해 생성된다. 백신은 상기에서 기재된 요소들 중 하나 또는 동시에 하나 초과를 포함할 수 있다. 본 발명의 특정 양상 내에서 사용되는 "백신"은 재조합 백신으로도 불리는 생백신 또는 생 바이러스를 지칭한다. 본 발명의 또 다른 특정 양상에서, "백신"은 바이러스 유사 입자 (VLP)를 포함하는 불활성화 또는 사멸된 바이러스를 지칭한다. 따라서, 백신은 서브 유닛 백신 또는 사백신 (KV) 또는 불활성화 백신일 수 있다.

[0101] "약제학적 조성물"은, 투여되는 유기체, 또는 유기체 내에 또는 유기체상에 살고 있는 유기체의 생리학적 기능, 예를 들어, 면역학적 기능을 변형시킬 수 있는 1종 이상의 성분으로 본질적으로 이루어진다. 상기 용어는 항생제 또는 항기생충제 뿐만 아니라, 가공 특성, 무균성, 안정성, 소화관내 또는 비경구 경로, 예를 들어, 경구, 비강내, 정맥내, 근육내, 피하, 진피내 또는 다른 적합한 경로를 통해 조성물을 투여할 실현가능성, 투여 후 내성 또는 방출 제어 특성 (이들에 한정되는 것은 아님)과 같은 다른 특정 목적을 달성하기 위해 일반적으로 사용되는 다른 성분을 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 입증 목적만을 위해 제공된 이러한 약제학적 조성물의 하나의 비제한적인 예는 다음과 같이 제조될 수 있다: 감염된 세포 배양물의 세포 배양 상청액을 안정화제 (예를 들어, 스페르미딘 및/또는 소 혈청 알부민 (BSA))와 혼합한 후, 혼합물을 다른 방법으로 동결 건조하거나 탈수시킨다. 백신 접종 전에, 이어서 혼합물을 수용액 (예를 들어, 식염수, 포스페이트 완충된 식염수 (PBS)) 또는 비-수용액 (예를 들어, 오일 유화액, 알루미늄계 보조제) 중에 재수화시킨다.

[0102] 본 명세서에서 사용되는 "약제학적으로 또는 수의학적으로 허용되는 담체"로는 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 보조제, 안정화제, 희석제, 보존제, 항균제, 항진균제, 등장화제, 흡착 지연제 등이 포함된다. 일부의 바람직한 구현예, 특히 동결 건조된 면역원성 조성물을 포함하는 것들에서, 본 발명에 사용하기 위한 안정화제로는 동결 건조 또는 냉동 건조용 안정화제가 포함된다.

[0103] 일부 구현예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 보조제를 함유한다. 본 명세서에서 사용되는 "보조제"로는 수산화 알루미늄 및 인산 알루미늄, 사포닌, 예를 들어, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), 유중수형 유화액, 수중유형 유화액, 수중 유중수형 유화액이 포함될 수 있다. 유화액은 특히 경질 액체 파라핀 오일 (유립 약전 타입); 스쿠알란 또는 스쿠알렌과 같은 이소프레노이드 오일; 알켄, 특히 이소부텐 또는 데센의 올리고머화에 의해 생성되는 오일; 선형 알킬기를 함유하는 산 또는 알코올의 에스테르, 보다 특히, 식물 오일, 에틸 올레에이트, 프로필렌 글리콜 디-(카프릴레이트/카프레이트), 글리세릴 트리-(카프릴레이트/카프레이트) 또는 프로필렌 글리콜 디올레에이트; 분지형 지방산 또는 알코올의 에스테르, 특히 이소스테아르산 에스테르를 기본으로 할 수 있다. 오일은 유화제와 함께 사용되어 유화액을 형성한다. 유화제는 바람직하게는 비이온성 계면활성제, 특히, 소르비탄의 에스테르, 만나이드의 에스테르 (예를 들어, 안하이드로만니톨 올레에이트), 글리콜의 에스테르, 폴리글리세롤의 에스테르, 프로필렌 글리콜의 에스테르 및 올레산, 이소스테아르산, 리시놀레산 또는 하이드록시스테아르산의 에스테르 (이들은 임의로 에톡시화된다), 및 폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌 공중합체 블록, 특히, 플루로닉 (Pluronic) 제품, 특히, L121이다. 문헌 [Hunter et al., The Theory and Practical Application of

Adjuvants (Ed.Stewart-Tull, D. E. S.), JohnWiley and Sons, NY, pp51-94 (1995)] 및 [Todd et al., Vaccine 15:564-570 (1997)]을 참조한다. 예시적인 보조제는 문헌 ["Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" edited by M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995]의 147 페이지에 기술된 SPT 유화액 및 동 문헌의 183 페이지에 기술된 유화액 MF59이다.

[0104] 보조제의 추가 예로는 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체 및 말레산 무수물과 알케닐 유도체의 공중합체 중로부터 선택되는 화합물이 있다. 유리한 보조제 화합물은 특히 당류 또는 다가 알코올의 폴리알케닐 에테르와 가교된 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체이다. 이들 화합물은 카보머라는 용어로 공지되어 있다 (문헌 [Phameuropa Vol. 8, No. 2, June 1996]). 당해 분야의 통상의 기술자는 또한 적어도 3개, 바람직하게는 8개 이하의 하이드록실기를 가지며 적어도 3개의 하이드록실기의 수소 원자가 적어도 2개의 탄소 원자를 갖는 불포화 지방족 라디칼로 대체되어 있는 폴리하이드록실화 화합물과 가교된 이러한 아크릴계 중합체를 기술하는 미국 특허 2,909,462를 참조할 수 있다. 바람직한 라디칼은 2 내지 4개의 탄소 원자를 함유하는 것들, 예를 들어, 비닐, 알릴 및 다른 에틸렌계 불포화기이다. 불포화 라디칼은 자체에 메틸과 같은 다른 치환체를 함유할 수 있다. CARBOPOL® (BF Goodrich, Ohio, USA)의 명칭으로 시판되는 제품이 특히 적절하다. 이들은 알릴 슈크로스 또는 알릴 펜타에리트리톨과 가교되어 있다. 이들 중에서, Carbopol 974P, 934P 및 971P가 언급될 수 있다. CARBOPOL® 971P의 사용이 가장 바람직하다. 말레산 무수물과 알케닐 유도체의 공중합체 중에서도, 말레산 무수물과 에틸렌의 공중합체인 공중합체 EMA (Monsanto)가 있다. 이들 중합체가 물에 용해되면, 면역원성 조성물, 면역학적 조성물 또는 백신 조성물 자체가 혼입될 보조제 용액을 수득하기 위해서는 바람직하게는 생리학적 pH로 중화될 산 용액이 생성된다.

[0105] 또 다른 적절한 보조제는 다수의 다른 것들 중에서도 RIBI 보조제 시스템 (Ribi Inc.), 블록 공중합체 (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), 모노포스포릴 지질 A, 아브리딘 지질-아민 보조제, 이. 콜라이 (재조합체 또는 기타)로부터 유래된 열-불안정성 장독소, 콜레라 독소, IMS 1314 또는 뮤라밀 디헵타이드, 또는 천연적으로 존재하거나 또는 재조합 사이토킨 또는 이의 유사체 또는 내인성 사이토킨 방출 자극제가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0106] 보조제는 약 100 µg 내지 약 10 mg/용량의 양으로, 바람직하게는 약 100 µg 내지 약 10 mg/용량의 양으로, 보다 바람직하게는 약 500 µg 내지 약 5 mg/용량의 양으로, 보다 더 바람직하게는 약 750 µg 내지 약 2.5 mg/용량의 양으로, 가장 바람직하게는 약 1 mg/용량의 양으로 첨가될 수 있는 것으로 예상된다. 그렇지 않으면, 보조제는 최종 생성물의 약 0.01 용적% 내지 50 용적%의 농도, 바람직하게는 약 2 용적% 내지 30 용적%의 농도, 보다 바람직하게는 약 5 용적% 내지 25 용적%의 농도, 보다 더 바람직하게는 약 7 용적% 내지 약 22 용적%의 농도, 가장 바람직하게는 10 용적% 내지 20 용적%의 농도로 존재할 수 있다.

[0107] "희석제"는 물, 식염수, 텍스트로스, 에탄올, 글리세롤 등을 포함할 수 있다. 등장화제는 특히 염화 나트륨, 텍스트로스, 만니톨, 소르비톨 및 락토스를 포함할 수 있다. 안정화제는 다른 것들 중에서도 알부민 및 에틸렌디아민테트라아세트산의 알칼리염을 포함한다.

[0108] "단리된"은 자연 상태에서부터 "사람의 수작업에 의해" 변경된 것을 의미하며, 즉, 천연적으로 존재한다면 원래 환경으로부터 변화 또는 제거되거나, 변화 및 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 생물체에 천연적으로 존재하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리헵타이드는 "분리된" 것이 아니지만, 천연 상태의 공존 물질로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리헵타이드는 본 명세서에 사용되는 용어처럼 "단리된" 것이다.

[0109] 제제

[0110] 조성물이 투여되는 대상체는 바람직하게는 소, 말, 양, 돼지, 가금류 (예를 들어, 닭), 염소, 고양이, 개, 햄스터, 마우스 및 래트를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 동물이며, 가장 바람직하게는 포유 동물은 돼지이다.

[0111] 본 발명의 제형은 유효 면역량의 1종 이상의 면역원성 조성물 및 생리학적으로 허용되는 비히클을 포함한다. 백신은 유효 면역량의 1종 이상의 면역원성 조성물 및 생리학적으로 허용되는 비히클을 포함한다. 제형은 투여 모드에 적합해야 한다.

[0112] 면역원성 조성물은 필요에 따라 소량의 습윤제 또는 유화제 또는 pH 완충제를 또한 함유할 수 있다. 면역원성 조성물은 액체 용액, 현탁액, 유화액, 정제, 환제, 캡슐, 서방형 제형 또는 분말일 수 있다. 경구용 제형은 약 객학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 탄산 마그네슘 등과 같은 표준 담체를 포함할 수 있다.

- [0113] 치료 방법
- [0114] 바람직한 투여 경로는 비강내, 경구, 진피내 및 근육내를 포함하지만 이들에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는 단일 용량으로의 응용수 중의 투여가 바람직하다. 통상의 기술자는, 본 발명의 조성물이 또한 다른 투여 경로에 의해서 뿐만 아니라, 1개, 2개 또는 그 이상의 용량으로 투여될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 이러한 다른 경로는 피하, 피내, 복강내, 피내를 포함하고, 치료의 목적하는 지속 기간 및 유효성에 따라, 본 발명에 따른 조성물은, 예를 들어, 수일, 수주 또는 수개월 동안 매일 1회 또는 수회, 또한 간헐적으로, 약 10^3 내지 10^8 TCID₅₀과 같은 상이한 투여량으로 투여될 수 있다 (상기 바이러스 역가 참조).
- [0115] 본 조성물은 필요에 따라 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 유닛 제형을 함유할 수 있는 팩 또는 디스펜서 장치로 제공될 수 있다. 팩은, 예를 들어, 블리스터 팩과 같은 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치는 바람직하게는 포유 동물, 특히, 돼지에게 투여하기 위한 투여 설명서를 수반할 수 있다. 이러한 용기(들)는, 의약품 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 통지와 관련되어 있으며, 당해 통지는 사람 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매에 대한 기관의 승인을 반영한다.
- [0116] 서열 개요:
- [0117] 하기의 서열은 본 발명에 상세히 나타내고 기재한다:
- [0118] 서열번호 1 P1 유전자의 뉴클레오타이드 서열,
- [0119] 서열번호 2 2A 유전자의 뉴클레오타이드 서열,
- [0120] 서열번호 3 3C 유전자의 뉴클레오타이드 서열,
- [0121] 서열번호 4 P1-2A-3C 유전자 발현 카세트의 뉴클레오타이드 서열,
- [0122] 서열번호 5 EHV-1 ORF43 유전자의 뉴클레오타이드 서열,
- [0123] 서열번호 6 EHV-1 ORF54 유전자의 뉴클레오타이드 서열,
- [0124] 서열번호 7 BGH 폴리 A 신호의 뉴클레오타이드 서열,
- [0125] 서열번호 8 CMV5-P12A3C2AORF43-BGH 카세트의 뉴클레오타이드 서열,
- [0126] 서열번호 9 CMV5-P12A3C2AORF54-BGH 카세트의 뉴클레오타이드 서열,
- [0127] 서열번호 10 프라이머 서열, 및
- [0128] 서열번호 11 프라이머 서열.

조항

하기의 조항이 본원에 기재된다:

본 발명은 하기의 조항을 제공한다:

1. 재조합 바이러스의 게놈 내 발현 카세트를 포함하는 재조합 바이러스로서, 상기 발현 카세트가 적어도 하나의 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드, 및 상기 재조합 바이러스의 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편인 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 제2 폴리뉴클레오타이드에 기능적으로 연결되어 있고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 제2 폴리뉴클레오타이드의 업스트림에 위치하고, 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 상기 재조합 바이러스에서 활성인 상기 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편의 유일한 카피물인, 재조합 바이러스.
2. 제1항에 있어서, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 동일한 ORF 내에 있는, 재조합 바이러스.
3. 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 상기 재조합 바이러스의 내인성 필수 유전자인, 재조합 바이러스.
4. 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 외인성이고 상기 재조합 바이러스의 내인성 필수 유전자가 사일렌싱되어 있는, 재조합 바이러스.

5. 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 항원성 폴리펩타이드 또는 치료학적 폴리펩타이드를 암호화하는, 재조합 바이러스.
6. 제5항에 있어서, 상기 항원성 폴리펩타이드가 FMDV 항원, PRRSV 항원, DEV 항원, 및 PRV 항원으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 바람직하게 FMDV 항원인, 재조합 바이러스.
7. 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 FMDV의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자를 포함하는, 재조합 바이러스.
8. 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 바이러스가 헤르페스비리대(herpesviridae), 예를 들어, 에퀴드 알파헤르페스바이러스(Equid Alphaherpesvirus) 1 (EHV-1), 에퀴드 알파헤르페스바이러스 4 (EHV-4) 및 기타 바리셀로바이러스(Varicelloviruses), 예를 들어, 슈도라비 바이러스 (Pseudorabies virus) (PrV) 및 소 헤르페스바이러스 1(BHV-1), 아데노비리대(Adenoviridae) (AdV), 예를 들어, 개과 아데노바이러스 (Canine Adenovirus)(CADV), 아데노 관련 비리대(Adeno-associated viridae), 렌티비리대(Lentiviridae), 예를 들어, 레트로바이러스, 및 포스비리대(Poxviridae)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 바이러스로부터 유래하는, 재조합 바이러스.
9. 제8항에 있어서, 상기 바이러스가 헤르페스비리대 과, 바람직하게는 알파헤르페스비리내 속, 보다 바람직하게는 바리셀로바이러스 아속, 가장 바람직하게는 에퀴드 알파헤르페스바이러스 1 (EHV-1)의 구성원인, 재조합 바이러스.
10. 제1항에 있어서, 상기 재조합 바이러스가 EHV-1로부터 유래하고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 FMDV의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자를 포함하는, 재조합 바이러스.
11. 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 필수 유전자가 캡시드 단백질, DNA 복제 관련 단백질, DNA 헬리카제, DNA 레플리카제, 수용체 결합 단백질 및 배출 (Egress)-관련 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 단백질을 암호화하는, 재조합 바이러스.
12. 제11항에 있어서, 상기 재조합 바이러스가 EHV-1로부터 유래하고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 FMDV의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자를 포함하고, 상기 필수 유전자가 EHV-1 ORF43 유전자 또는 EHV-1 ORF54 유전자인, 재조합 바이러스.
13. 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 링커를 통해 상기 제2 폴리뉴클레오타이드에 연결된, 재조합 바이러스.
14. 제13항에 있어서, 상기 링커가 가요성 링커 또는 2A 유전자, 바람직하게 2A 유전자일 수 있는, 재조합 바이러스.
15. 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 제2 폴리뉴클레오타이드에 직접 연결된, 재조합 바이러스.
16. 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트가 프로모터, 바람직하게는 CMV5 프로모터와 같은 조절 요소들을 추가로 포함하는, 재조합 바이러스.
17. 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트가 P1-2A-3C-2A-ORF43 작제물 또는 P1-2A-3C-2A-ORF54 작제물, 바람직하게는 CMV-P1-2A-3C-2A-ORF43-BGH 작제물 또는 CMV-P1-2A-3C-2A-ORF54-BGH 작제물, 보다 바람직하게 서열번호 8에 나타난 바와 같은 CMV-P1-2A-3C-2A-ORF43-BGH 작제물 또는 서열번호 9에 나타난 바와 같은 CMV-P1-2A-3C-2A-ORF54-BGH 작제물을 포함하는, 재조합 바이러스.
18. 재조합 바이러스의 게놈 내 발현 카세트를 작제함을 포함하는, 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 재조합 바이러스를 제조하기 위한 방법으로서, 상기 발현 카세트가 적어도 하나의 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드, 및 상기 재조합 바이러스의 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편인 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 제2 폴리뉴클레오타이드에 기능적으로 연결되어 있고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 제2 폴리뉴클레오타이드의 업스트림에 위치하고, 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 상기 재조합 바이러스에서 활성인 상기 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편의 유일한 카피본인, 방법.
19. 재조합 바이러스의 게놈 내 발현 카세트를 작제함을 포함하는, 재조합 바이러스 내 목적하는 폴리펩타이드의 발현 안정성을 증가시키기 위한 방법으로서, 상기 발현 카세트가 적어도 하나의 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드, 및 상기 재조합 바이러스의 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편인 제2 폴리

- 뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 제2 폴리뉴클레오타이드에 기능적으로 연결되어 있고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 제2 폴리뉴클레오타이드의 업스트림에 위치하고, 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 상기 재조합 바이러스에서 활성인 상기 필수 유전자 또는 이의 기능성 단편의 유일한 카피본인, 방법.
20. 제19항에 있어서, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 동일한 ORF 내에 있는, 방법.
21. 제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 상기 재조합 바이러스의 게놈 내 천연적으로 존재하는 필수 유전자인, 방법.
22. 제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 외인성이고, 상기 재조합 바이러스의 게놈 내 천연적으로 존재하는 필수 유전자가 사일런싱되어 있는, 방법.
23. 제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 항원성 폴리펩타이드 또는 치료학적 폴리펩타이드를 암호화하는, 방법.
24. 제23항에 있어서, 상기 항원성 폴리펩타이드가 FMDV 항원, PRRSV 항원, DEV 항원, 및 PRV 항원으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 바람직하게 FMDV 항원인, 방법.
25. 제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 FMDV의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자를 포함하는, 방법.
26. 제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 바이러스가 헤르페스비리데, 예를 들어, 에퀴드 알파헤르페스바이러스 1 (EHV-1), 에퀴드 알파헤르페스바이러스 4 (EHV-4) 및 기타 바리셀로바이러스, 예를 들어, 슈도라비 바이러스 (PrV) 및 소 헤르페스바이러스 1(BHV-1), 아데노비리데 (AdV), 예를 들어, 개과 아데노바이러스(CAdV), 아데노 관련 비리데, 렌티비리데, 예를 들어, 레트로바이러스, 및 폭스비리데로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 바이러스로부터 유래하는, 방법.
27. 제26항에 있어서, 상기 바이러스가 헤르페스비리데 과, 바람직하게는 알파헤르페스비리데 속, 보다 바람직하게는 바리셀로바이러스 아속, 가장 바람직하게는 에퀴드 알파헤르페스바이러스 1 (EHV-1)의 구성원인, 방법.
28. 제19항에 있어서, 상기 재조합 바이러스가 EHV-1로부터 유래하고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 FMDV의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자를 포함하는, 방법.
29. 제19항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 필수 유전자가 캡시드 단백질, DNA 복제 관련 단백질, DNA 헬리카제, DNA 레플리카제, 수용체 결합 단백질 및 출현 (Egress)-관련 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 단백질을 암호화하는, 방법.
30. 제29항에 있어서, 상기 재조합 바이러스가 EHV-1로부터 유래하고, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 FMDV의 P1 유전자, 2A 유전자 및 3C 유전자를 포함하고, 상기 필수 유전자가 EHV-1 ORF43 유전자 또는 EHV-1 ORF54 유전자인, 방법.
31. 제19항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 링커를 통해 상기 제2 폴리뉴클레오타이드에 연결된, 방법.
32. 제31항에 있어서, 상기 링커가 가요성 링커 또는 2A 유전자, 바람직하게 2A 유전자일 수 있는, 방법.
33. 제19항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 제2 폴리뉴클레오타이드에 직접 연결된, 방법.
34. 제19항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트가 프로모터, 폴리A 등과 같은 다른 조절 요소들, 바람직하게는 프로모터, 보다 바람직하게는 CMV5 프로모터를 추가로 포함하는, 방법.
35. 제19항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트가 P1-2A-3C-2A-ORF43 작제물 또는 P1-2A-3C-2A-ORF54 작제물, 바람직하게는 CMV-P1-2A-3C-2A-ORF43-BGH 작제물 또는 CMV-P1-2A-3C-2A-ORF54-BGH 작제물, 바람직하게 서열번호 8에 나타난 바와 같은 CMV-P1-2A-3C-2A-ORF43-BGH 작제물 또는 서열번호 9에 나타난 바와 같은 CMV-P1-2A-3C-2A-ORF54-BGH 작제물을 포함하는, 방법.
36. 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 재조합 바이러스를 포함하는 숙주 세포로서, 바람직하게 상기 숙주 세포가 진핵 숙주 세포주이고; 보다 바람직하게 상기 숙주 세포주가 포유동물 세포주 또는 곤충 세포주이고; 가장

바람직하게는 상기 숙주 세포가 RK13 세포주, MDBK 세포주, ST 세포주, AI-ST 세포주, VERO 세포주, Sf9 세포주, Sf21, MDCK 세포주, 및/또는 이의 유도체인, 숙주 세포.

37. 하기 단계를 특징으로 하는, 제36항에 따른 숙주 세포의 제조 방법:

- a. 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 재조합 바이러스로 상기 숙주 세포주를 감염시키는 단계,
- b. 상기 감염된 세포를 적합한 조건하에 배양하는 단계, 및
- c. 임의로 상기 숙주 세포를 수거하는 단계.

38. 하기를 포함하는 면역원성, 약제학적 또는 백신 조성물:

- a. 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 재조합 바이러스, 및/또는
- b. 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 재조합 바이러스에 의해 발현되는 목적하는 폴리펩타이드, 및
- c. 임의로 약제학적으로 또는 수의과적으로 허용되는 담체 또는 부형제 (바람직하게는, 상기 담체는 경구, 피부 내, 근육내 또는 비강내 용도로 적절하다).

39. 하기의 단계를 포함하는, 면역원성, 약제학적 또는 백신 조성물의 제조 방법:

- a. 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 재조합 바이러스로 제36항의 숙주 세포를 감염시키는 단계,
- b. 상기 감염된 세포를 적합한 조건하에 배양하는 단계,
- c. 감염된 세포를 수거하는 단계,
- d. 임의로 단계 c)의 수거물을 정제하는 단계, 및
- e. 임의로 상기 수거물을 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 단계.

40. 제39항에 있어서, 상기 수거물이 감염된 세포에 의해 생성된 재조합 바이러스이거나 상기 수거물이 재조합 바이러스에 의해 발현된 목적하는 폴리펩타이드인, 방법.

41. 동물에 있어서 병원체에 의한 감염으로 야기된 임상 징후 또는 질환을 예방하고/하거나 치료하기 위한, 또는 동물에 있어서 병원체에 의한 감염을 치료하거나 예방하는 방법에 사용하기 위한, 면역원성, 약제학적 또는 백신 조성물의 제조에서 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 재조합 바이러스의 용도로서, 바람직하게는 상기 동물이 돼지(swine)와 같은 식품 생산 동물인, 용도.

42. 동물에 있어서 병원체에 의한 감염으로 야기된 임상 증상 또는 질환을 감소시키거나 예방하는 방법에 사용하기 위한, 또는 동물에 있어서 병원체에 의한 감염을 치료하거나 예방하는 방법에 사용하기 위한, 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 재조합 바이러스, 또는 제38항의 면역원성, 약제학적 또는 백신 조성물로서, 바람직하게는 상기 동물이 돼지와 같은 식품 생산 동물인, 재조합 바이러스 또는 면역원성, 약제학적 또는 백신 조성물.

43. 동물에서 병원체에 의해 야기되는 질환에 대하여 돼지 또는 소와 같은 식품 생산 동물과 같은 동물을 면역 화시키거나, 치료하거나, 예방하는 방법으로서, 상기 방법이 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 재조합 바이러스 또는 제38항의 면역원성, 약제학적 또는 백신을 상기 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

44. 하기를 포함하는, 동물에 있어서 병원체와 관련된 질환에 대하여 동물, 바람직하게는 돼지 또는 소와 같은 식품 생산 동물을 백신접종하고/하거나, 병원체와 관련되거나 병원체에 의해 유발된 하나 이상의 임상 증상의 발생률 또는 중증도를 감소시키기 위한 키트:

- a. 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 재조합 바이러스 또는 제38항의 면역원성, 약제학적 또는 백신 조성물을 상기 동물에게 투여할 수 있는 분배기;
- b. 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 재조합 바이러스 또는 제38항의 면역원성, 약제학적 또는 백신 조성물, 및
- c. 임의로 지침 진단지.

[0129] [도면의 간단한 설명]

[0130] 하기의 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고 본 발명의 특정 양상을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에 제공된 특정 구현예의 상세한 설명과 함께 이들 도면 중 하나 이상을 참조로 보다 잘 이해될 수

있다.

- [0131] 도 1. 필수 유전자 전좌 개념의 설명. A: 필수 유전자는 결실되어 있고 표적 유전자와 함께 전좌되어 있고; B: 표적 유전자는 또한 이의 본래의 위치에서 필수 유전자의 업스트림에서 삽입될 수 있다.
- [0132] 도 2. FMDV P12A3C 카세트의 디자인.
- [0133] 도 3. 전달 플라스미드의 작제 과정이 설명되어 있다. 표적 유전자 P12A3C를 합성하고 벡터 pUC19-CMV5-ORF1/3-링커에 클로닝하여 pUC19-CMV5-P12A3C를 수득한다. EHV-1 필수 유전자 ORF43 또는 ORF54를 또한 합성하고 pUC19-CMV5-P12A3C에 클로닝하여 최종 전달 플라스미드를 생성하고 이는 재조합체 EHV-1을 생성하기 위해 사용된다.
- [0134] 도 4. CMV5-P12A3C2AORF43-BGH의 겔 전기영동 결과. 제한 효소 I-CeuI를 사용한 전달 플라스미드의 분해. 분해 후, 약 7kb의 표적 단편을 방출시키고 재조합을 위해 사용하였다.
- [0135] 도 5. 유전자 ORF43 또는 ORF54는 EHV-1 벡터로부터 결실시키고 결실 돌연변이체 바이러스는 시험관내 복제할 수 없다. 대조군으로서, EHV-1 야생형은 형질감염 후 2일째에 용이하게 구제될 수 있고 잘 증식하였다. 구제된 바이러스는 EGFP 유전자를 함유하기 때문에, 플라크는 녹색 형광을 나타낸다.
- [0136] 도 6. ORF43 유전자 전좌된 재조합 EHV-1의 유전자 구조. ORF43 유전자는 이의 본래의 위치로부터 결실시키고 FMDV P12A3C 유전자의 다운스트림에 전좌시켰다.
- [0137] 도 7. IFA에 의한 FMDV 단백질 발현 및 EHV-1 ORF71 복원의 확인.
- [0138] EHV-1 ORF43 또는 ORF54 전좌를 갖는 재조합 바이러스는 형질감염 후 구제될 수 있다. FMDV 표적 단백질의 발현은 IFA에 의해 확인하였다. EHV-1 gp2는 EHV-1 플라크의 존재를 나타내기 위해 염색하였다.
- [0139] 도 8. 일련의 재조합 EHV-1은 정규 디자인으로 작제하였지만 안정하게 표적 단백질을 발현할 수 없다. (A) 음성 EHV-1 플라크는 이중 IFA에 의해 밝혀졌고; (B) 음성 플라크의 서열 분석은 단일 뉴클레오타이드 산 결실을 포함하는 무작위 유전학적 변화를 보여주었고 다운스트림 유전자의 프레임의 돌연변이를 유발한다.
- [0140] 도 9. 표적 FMDV 단백질 및 EHV-1 단백질 둘다를 발현할 수 있는 플라크를 보여주는, 대표적인 이중 IFA 결과의 도해.
- [0141] 도 10. 상이한 계대 수준의 재조합 바이러스로부터 FMDV VLP의 검출.
- [0142] 도 11. A: 표적 유전자 발현 카세트 및 프라이머 위치의 도해; B: 상이한 계대 수준의 재조합 바이러스로부터의 PCR 결과.
- [0143] 도 12. 모 EHV-1과 비교하여 재조합 EHV-1의 시험관내 단일 단계 성장 동력학.
- [0144] 실시예
- [0145] 하기의 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 입증하기 위해 포함된다. 후속 실시예에 기재된 기술은 본 발명의 수행에서 잘 기능하는 것으로 본원 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내고 이의 수행을 위해 바람직한 방식을 구성하는 것이 고려될 수 있는 것으로 당업자는 인지해야 한다. 그러나, 당업자는 본원의 개시내용의 측면에서, 기재된 특정 구현예에서 많은 변화가 만들어 질 수 있고 본 발명의 취지 및 범위로부터 벗어나는 것 없이 유사한 결과를 여전히 수득할 수 있음을 인지해야 한다.
- [0146] 상기 연구에서, 어떠한 예외가 주지되지 않는 경우, 모든 재료는 상업적으로 시판되고 제조원(QIAGEN, Promega, Thermo Fisher and BIO-RAD)으로부터 구입하였다.
- [0147] 실시예 1: FMDV 항원을 안정적으로 발현할 수 있는 본 발명의 재조합 EHV-1의 작제
- [0148] 1.1 FMDV P1-2A-3C 유전자 발현 카세트의 작제
- [0149] FMDV VLP를 발현하기 위해, FMDV 혈청형 0 중 (GenBank ID: JN998085)으로부터 유래된 유전자 발현 카세트 P1-2A-3C를 디자인하였다. 본 연구에서, FMDV P1-2A-3C 유전자 발현 카세트는 P1 유전자 (서열번호 1), 2A 유전자 (서열번호 2) 및 3C 유전자 (서열번호 3)의 뉴클레오타이드 서열을 기반으로 하는 젠스크립트 (Genscript)에 의해 화학적으로 합성하였다. 상기 연구에 사용되는 합성 P1-2A-3C 유전자 발현 카세트의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 4로 나타낸다. P1-2A-3C 카세트의 디자인은 도 2에 도해하였다.

- [0150] 1.2 전달 플라스미드의 작제
- [0151] 2-단계 Red-매개된 재조합을 위한 상동성 플랭킹 영역, 가나마이신 내성 유전자, 프로모터 및 BGH 폴리 A 신호를 함유하는 전달 벡터 pUC19-CMV5-ORF1/3-링커(젠스크립트)가 상기 연구에 사용되었다.
- [0152] 전달 플라스미드를 생성하기 위해, P1-2A-3C 유전자 (서열번호 4)를 ORF1/3의 부위에서 전달 벡터에 삽입하였다. 이어서, ORF43 유전자 (서열번호 5) 및 ORF54 유전자 (서열번호 6)는 화학적으로 합성하였고 P1-2A-3C 유전자 (서열번호 4)의 다운스트림에 클로닝하여 각각 전달 플라스미드 pUC19-CMV5-P12A3C2AORF43 및 pUC19-CMV5-P12A3C2AORF54를 생성한다. 전달 플라스미드 pUC19-CMV5-P12A3C2AORF43의 작제 과정은 도 3에 도해하였다.
- [0153] 전달 플라스미드는 제한 효소 I-CeuI (NEB)에 의해 분해하여, 각각 CMV5-P12A3C2AORF43-BGH (서열번호 8) 및 CMV5-P12A3C2AORF54-BGH (서열번호 9)를 함유하는 약 7kb의 2개의 단편을 방출시키고 이어서 겔 정제 (Invitrogen)하고 겔 전기영동을 통해 확인하였다. 방출된 단편은 추가의 재조합을 위해 사용하였다. CMV5-P12A3C2AORF43-BGH의 겔 전기영동 결과는 도 4에 도해하였다.
- [0154] 1.3 EHV-1 바이러스 벡터의 작제
- [0155] EHV-1 백신 중 Rach (Patel, JR and Heldens, J, 2005)은 바이러스 벡터로서 사용하여 본 연구에서 혈청형 O FMDV 유전자 P12A3C를 발현시켰다. Rach 종은 천연 숙주, 즉 말에서의 이의 독성을 상실하였고 이후 유럽 및 USA 둘다에서 변형된 생백신 (MLV)으로서 사용되어왔다(문헌참조: Patel, JR and Heldens, J, 2005). Rach 바이러스 게놈은 ORF71 유전자(gp2를 암호화하는) 대부분을 소형-F 레플리콘 서열로 대체함에 의해 세균 인공 염색체 (BAC)로서 작제하였고, Bacmid는 pRach로서 지정하였다(문헌참조: Rudolph and Osterrieder, 2002, Virology 293, 2002, 356-367; US7482441B2).
- [0156] 본 연구에서, 필수 유전자들인 ORF43 유전자 및 ORF54 유전자를 각각 pRach로부터 결실시키고 ORF43 유전자가 결실된 pRach (도 5에서 EHV-1-de1ORF43 P1로서 나타낸 바와 같이) 및 ORF54 유전자가 결실된 pRach(도 5에서 EHV-1-de1ORF54 P1으로서 나타낸 바와 같이)는 제한 단편 길이 다형태 (RFLP) 분석에 의해 동정하였다.
- [0157] MDBK 세포에 EHV-1-de1ORF43 P1 및 EHV-1-de1ORF54 P1을 형질감염시킴에 의해, 결실 돌연변이체가 세포 배양물에서 복제할 수 없음을 확인하였다. 상기 결과는 하기 도 5에 나타낸다.
- [0158] 1.4 본 발명의 재조합 EHV-1의 작제
- [0159] 본 발명의 재조합 EHV-1은 2-단계 Red-매개된 재조합 전략을 통해 작제하였다(문헌참조: Tischer BK et al, BioTechniques 2006 (40), 191-197). 특히, 단계 1.2에서 수득된 전달 플라스미드를 분해하여 각각 CMV5-P12A3C2AORF43-BGH (서열번호 8) 및 CMV5-P12A3C2AORF54-BGH (서열번호 9)의 단편들을 방출하였다. 2개의 방출된 단편들은 각각 EHV-1-de1ORF43 P1 및 EHV-1-de1ORF54 P1을 함유하는 이. 콜라이 컴피던트 세포에 전기천공하였다. 재조합 바이러스의 유전자 구조는 도 6에 도해하였다. 재조합 클론은 이어서 클로람페니콜 및 가나마이신 이중 내성 LB 한천 플레이트 상에서 선택하였다. 재조합 Bacmid DNA를 추출하고 PCR 및 RFLP 방법 둘다에 의해 분석하였다. Red 재조합의 2번째 단계에서, 1% 아라비노스를 사용하여 호밍 엔도뉴클레아제 I-SceI의 발현을 유도하였고 이로써 가나마이신 유전자의 업스트림에서 I-SceI 제한 부위를 절단하고 궁극적으로 가나마이신 카세트를 절개한다.
- [0160] 1.5 바이러스 구제 및 정제
- [0161] 재조합 EHV-1을 구제하기 위해, 재조합 Bacmid DNA를 추출하고 리포펙타민 3000 (Thermo Fisher)를 사용하여 6-웰 플레이트에서 MDBK 세포 (Sigma)를 형질감염시켰다. 형질감염 후, 세포를 매일 관찰하여 GFP-양성 및 -음성 플라크 둘다의 형성을 조사하였다. 배양 상등액과 함께 형질감염된 세포를 2회 동결시키고 해동하고 원심분리에 의해 세정하고 계대 1로서 정의되는 재조합 바이러스를 후기 분석을 위해 -80° C에 저장하였다. 제한 희석 또는 플라크 정제를 수행하여 GFP-음성 재조합 바이러스를 분리하였고, 여기서, 소형-F 함유 EGFP 유전자를 제거하고 상실된 ORF71을 분자간 상동성 재조합 기전을 통해 복구하였다. 각 라운드의 제한 희석은 하나의 계대로서 인지하였다.
- [0162] 실시예 2: FMDV 단백질의 발현 및 검출
- [0163] 2.1 IFA, 슈크로스 농도 구배 원심분리 및 웨스턴 블롯
- [0164] FMDV 단백질의 발현을 확인하기 위해, 간접적인 형광 검정(IFA)은 FMDV VP1에 대한 모노클로날 항체를 사용하여

수행하였다(Jeno-Biotech, Cat#9172). MDBK 세포를 감염시키고 1.5% 메틸 셀룰로스로 덮었다. 감염 3일 후에, 세포는 1xPBS로 세척하고, 4% 포르말데하이드로 고정화하고, 0.1% Triton X-100을 투과시키고 상응하는 항체로 염색하였다. FMDV 단백질의 발현은 IFA에 의해 확인하였다(도 7).

[0165] 웨스턴 블롯 분석을 위해, 감염된 세포 펠렛을 용해시키고 4x LDS 샘플 완충액(Invitrogen) 및 Nupage 10x 환원제(Invitrogen)와 혼합하였다. 5분동안 85° C에서 가열한 후, 단백질은 NuPAGE 겔 (Invitrogen)상에서 분리하고 PVDF 막(Lifetech)에 전달하였다. 막 차단 후, 막을 1시간 동안 항-FMDV VP1 mAb (1차 항체, Jeno-Biotech)로 항온처리하고 이어서 세척 후 1시간 동안 항-마우스 IgG-HRP (2차 항체, Santa-Cruz)로 항온처리하였다. 막에 슈퍼시그널 웨스트 펠트 최대 민감성 기질 (Supersignal West Femto Maximum Sensitivity substrate) (Thermo Scientific)을 막에 적용한 후 이미지를 현상하였다.

[0166] FMDV VLP의 형성을 확인하기 위해, 감염된 세포 배양물을 원심분리에 의해 사전에 세정하고 Amicon Ultra-15mL 원심분리기 필터(Merk, Ultracel-100KDa)를 사용한 환의여과에 의해 농축시킴에 이어서 10° C에서 22시간 동안 53,720g에서 10%-60% 슈크로스 농도구배 초원심분리에 적용하였다. 슈크로스 농도구배는 높은 곳에서 낮은 곳으로 14개 분획으로 분리하였다. 각각의 분획에서 단백질은 상기된 바와 같이 항-FMDV VP1 mAb를 사용한 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다.

[0167] 실시예 3: FMDV 단백질 발현의 안정성의 연구

[0168] 3.1 FMDV P1-2A-3C 유전자는 정규 디자인과 함께 안정적으로 발현될 수 없다.

[0169] 대조군으로서 상이한 재조합 EHV-1(상이한 프로모터 및 삽입 부위를 갖는)을 FMDV P1-2A-3C 유전자를 EHV-1 바이러스 벡터에 직접 도입하는 정규 디자인으로 작제하였다. 상이한 재조합 EHV-1의 유전학적 안정성 시험 결과는 하기의 표에 요약한다.

표 1

[0170] 상이한 재조합 EHV-1의 유전학적 안정성 시험의 요약

P1-2A-3C 카세트	프로모터	삽입 부위	세포주	유전학적 안정성
서열번호 4	CMV	ORF1/3	MDBK	P3 후 불안정한
서열번호 4	EHV-4 gG	ORF1/3	MDBK	P4 후 불안정한
서열번호 4	CMV	ORF70 (gG)	MDBK	P5 후 불안정한

[0171] 정규 디자인을 사용함에 의해, FMDV P1-2A-3C 유전자가 이중 IFA에 의해 나타낸 바와 같이 연속 계대 동안에 안정적으로 유지될 수 없고 표적 단백질 발현을 상실하는 경향이 있음을 알 수 있다(도 8a). 서열분석은 또한 삽입체에 무작위 결실이 있음을 보여주었다(도 8b).

[0172] 3.2 유전학적 안정성 문제를 해결하기 위해 필수적인 유전자 전좌

[0173] FMDV 단백질이 본 발명의 재조합 EHV-1에 의해 안정적으로 발현될 수 있는지를 평가하기 위해, 본 발명의 재조합 EHV-1은 MOI 0.01로 MDBK 세포상에서 연속으로 계대하였다. 각각의 계대 후, 새로운 MDBK 세포 단일층을 적당히 희석된 재조합 바이러스로 감염시키고 1.5% 메틸 셀룰로스로 덮었다. 감염 3일 후, 이중 IFA는 항-FMDV VP1 mAb 및 카프린 항-EHV-1 pAb (VMRD)의 혼합물을 사용하여 수행하였다. 개별 플라크는 형광성 현미경하에 조사하였다. FMDV VP1 및 EHV-1 항체 둘다로 염색된 플라크는 양성으로서 인지되었고 EHV-1 염색을 보여주는 것들만이 음성이다. 양성 플라크 비율을 계산하고 상이한 계대 수준 간에 비교하였다. 대표적인 이중 IFA 결과는 도 9에 나타냈다.

[0174] 모든 5회 계대(P5, P10, P15 및 P20)에서, 바이러스 DNA는 감염된 세포로부터 추출하였고 완전한 삽입체는 고성능 (high fidelity) Accuprime pfx DNA 폴리머라제(Invitrogen)를 사용하여 PCR 증폭(정배향 프라이머: taacacatggcaggcctgttg (서열번호 10), 역배향 프라이머: gagcattcgacacctatctcc (서열번호 11))시켰다. 이어서 PCR 생성물은 서열 분석하였다. 추가로, VLP의 발현은 5회 계대 마다 슈크로스 농도구배 원심분리 및 웨스턴 블롯을 사용하여 검출하였다(문헌참조: Rational Engineering of Recombinant Picornavirus Capsids to Produce Safe, Protective Vaccine Antigen. PLOS Pathogens.2013 Mar; 9(3):e1003255.). 재조합 EHV-1의 상이한 계대 수준으로부터의 FMDV VLP의 결과는 도 10에 나타냈다.

[0175] 총 EHV-1 플라크 중에서 FMDV 단백질 양성 플라크의 퍼센트를 계산하고 표 2에 나타낸다. 상기 결과는 명백하게

FMDV 단백질이 적어도 P20때까지의 계대 동안에 안정적으로 발현될 수 있음을 보여주었다.

표 2

[0176] 각각의 계대에서 총 EHV-1 플라크 중에서 FMDV 단백질 양성 플라크의 퍼센트

계대	양성률
P5	355/355 (100%)
P6	274/274 (100%)
P7	155/155 (100%)
P8	234/234 (100%)
P9	85/85 (100%)
P10	173/173 (100%)
P11	108/108 (100%)
P12	78/78 (100%)
P13	175/175 (100%)
P14	44/44 (100%)
P15	109/109 (100%)
P16	202/202 (100%)
P17	120/120 (100%)
P18	172/172 (100%)
P19	295/295 (100%)
P20	173/173 (100%)

[0177] 각각의 5회 계대로부터의 바이러스 DNA를 재조합 EHV-1으로부터 추출하고 PCR을 사용하여 전체 삽입체를 증폭시켰다. 상기 결과는 전체 삽입체가 단편 길이의 명백한 차이 없이 증폭될 수 있음을 보여주었고 (도 11), 이는 어떠한 유전학적 변화가 연속 바이러스 계대 동안에 일어나지 않음을 지적한다. PCR 생성물을 또한 서열분석하고 어떠한 유전학적 변화를 나타내지 않았다.

[0178] 실시예 4: 재조합 바이러스의 시험관내 성장 동력학

[0179] 재조합 바이러스의 시험관내 성장 성질을 평가하기 위해, 24-웰 플레이트 중 MDBK 세포는 MOI 5로 모 바이러스 및 재조합 바이러스에 의해 감염시켰다. 37° C에서 2시간 접촉시킨 후, 세포는 시트레이트 완충액 (pH 3.0)으로 세척하였다. 상이한 시점에서, 배양 상등액을 수거하고 적정하였다.

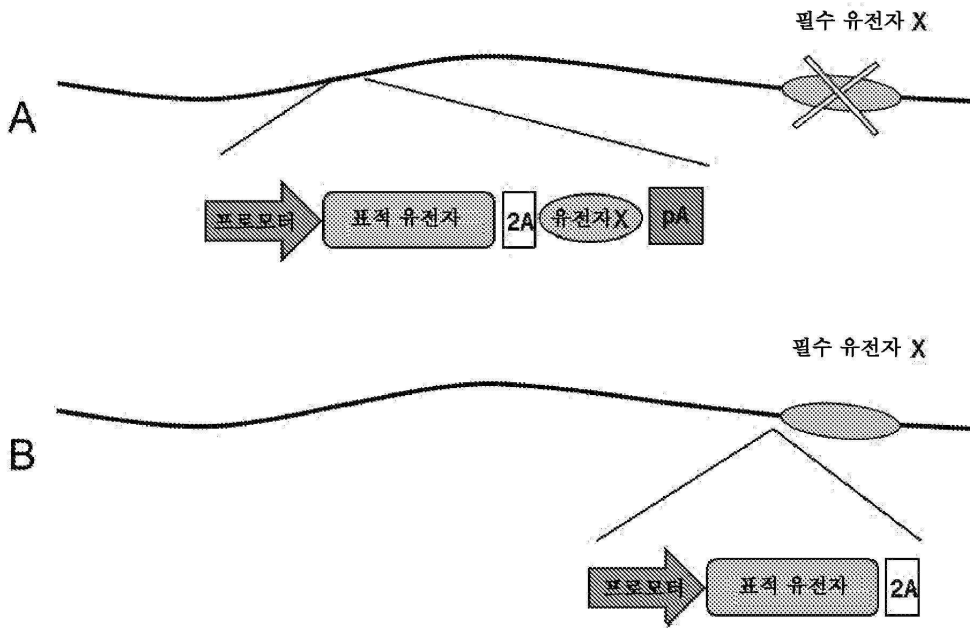
[0180] ORF43 또는 ORF54가 전좌된 재조합 바이러스 둘다의 단일 단계 성장 동력학을 결정하고 모 바이러스와 비교하였다. 도 12에서 알 수 있는 바와 같이, 재조합 바이러스는 모 바이러스와 유사한 성장 동력학을 가졌고 감염 후 36시간에 피크 역가에 도달할 수 있지만, 상기 피크는 모 바이러스 보다 약 1 logTCID50/mL 낮았는데 이것은 외래 단백질의 발현이 바이러스 성장에 영향을 미치기 때문에 예상된 것이었다.

[0181] 이것은 상기 실험 데이터로부터 결정될 수 있다: (1) 정규 디자인으로, FMDV 표적 단백질은 안정적으로 발현될 수 없고; (2) EHV-1 ORF43 또는 ORF54는 EHV-1 복제를 위한 필수 유전자이고; (3) 본 발명의 rEHV-1/FMD 작제물은 모 EHV-1과 상응하는 성장 능력을 유지하면서 안정성이 유의적으로 개선된 표적 단백질을 발현할 수 있다.

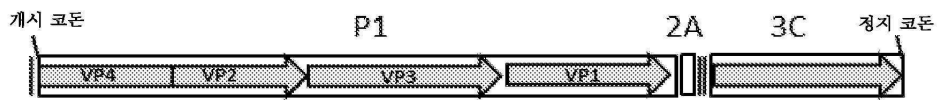
[0182] 본원에 개시되고 청구된 모든 조성물과 방법들은 본 명세서의 내용을 고려하여 과도한 실험없이도 고안하여 수행할 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 바람직한 구현예의 관점에서 기술되었지만, 본 발명의 당업계의 개념, 의미 및 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 변화들을 본원에 기술된 조성물과 방법들, 상기 방법의 단계들 또는 상기 방법 단계들의 순서에 적용할 수 있다는 사실은 당업계의 숙련자들에게는 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적 및 생리학적으로 모두 관련되어 있는 특정 제제의 경우 이들을 사용하여도 동일하거나 유사한 결과가 달성된다면 본원에 기술된 제제를 대체할 수 있음도 명백할 것이다. 당업계의 숙련자들에게 명백한 이러한 모든 유사한 대체물 및 변형은 하기의 특허청구범위에 정의된 본 발명의 의미, 범위 및 개념에 속하는 것으로 간주된다.

도면

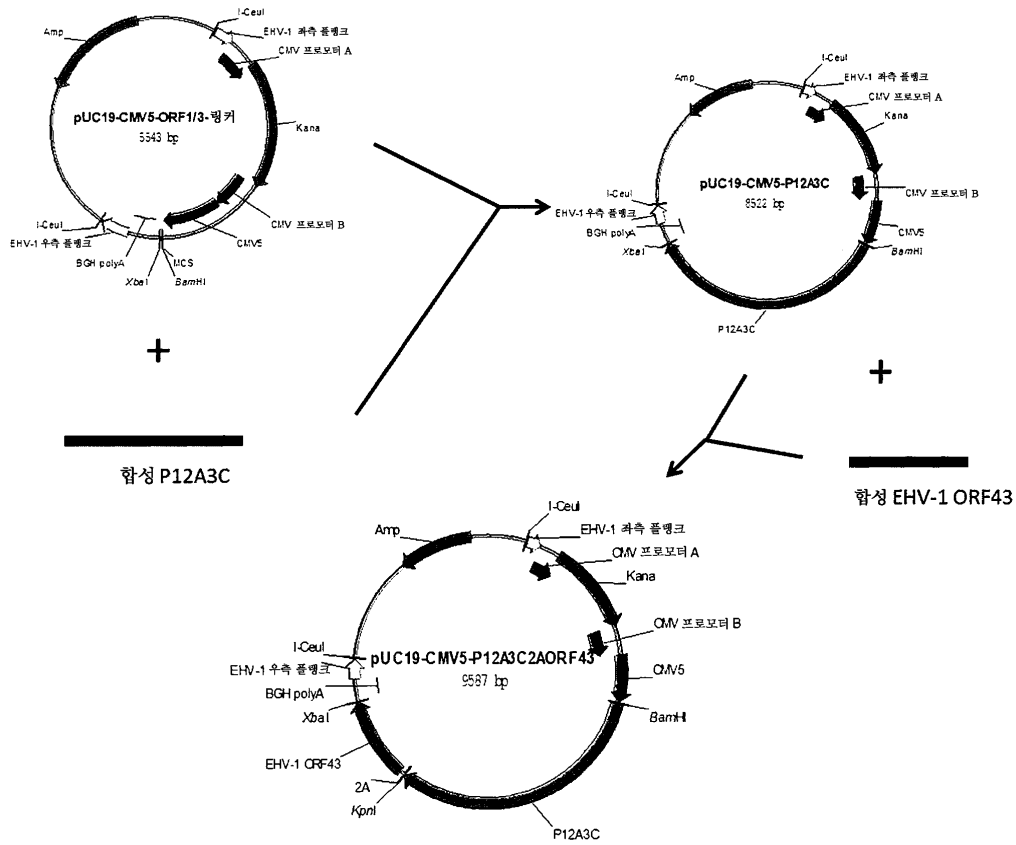
도면1



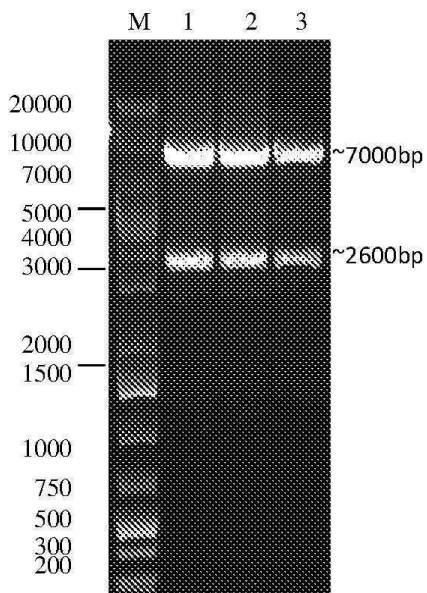
도면2



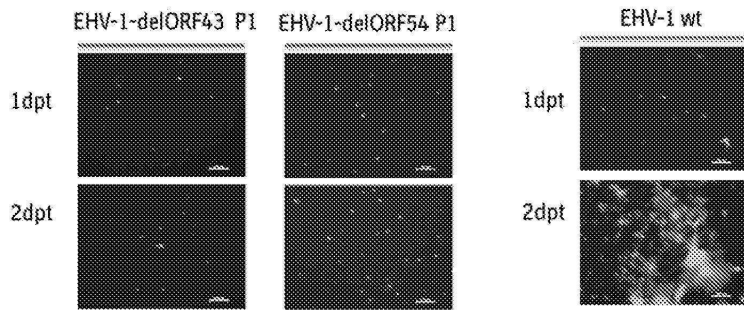
도면3



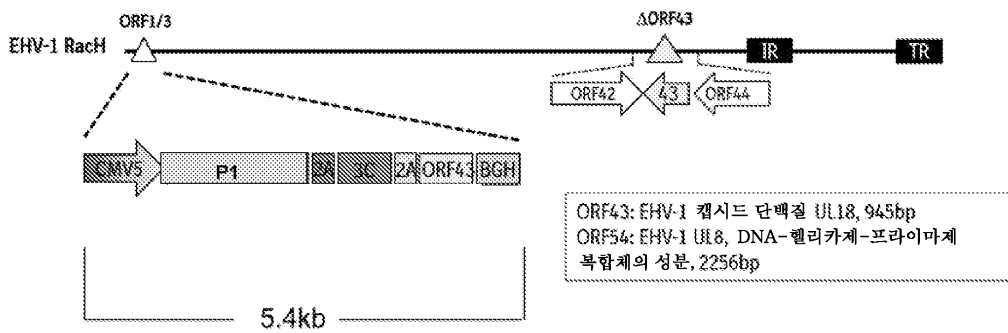
도면4



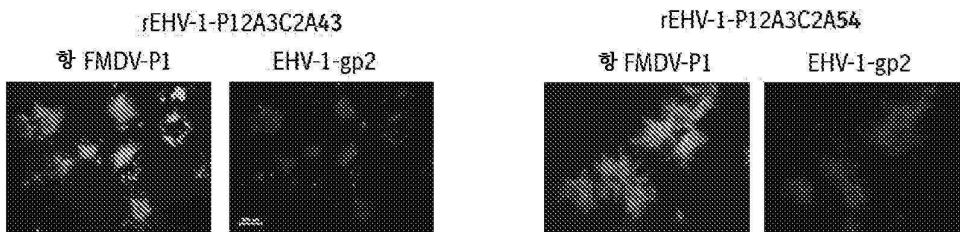
도면5



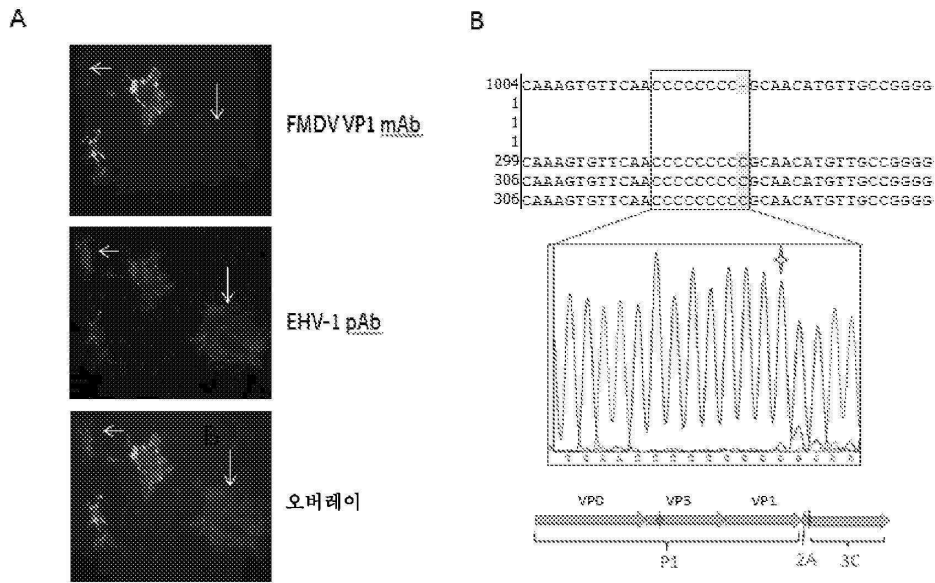
도면6



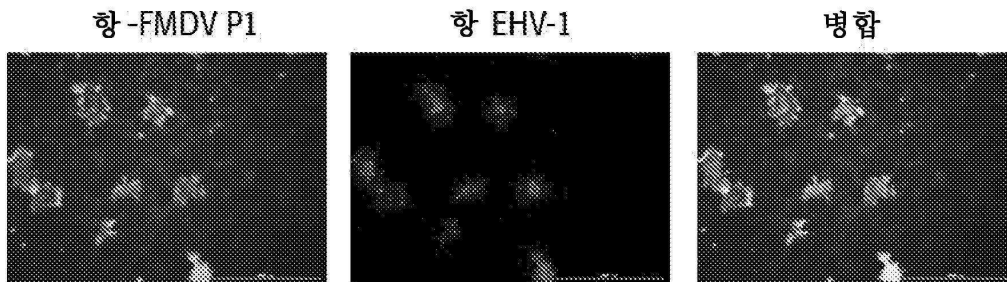
도면7



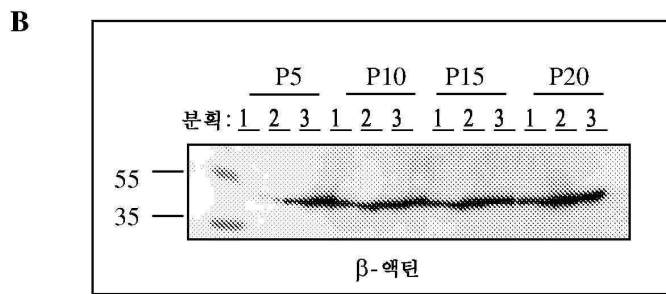
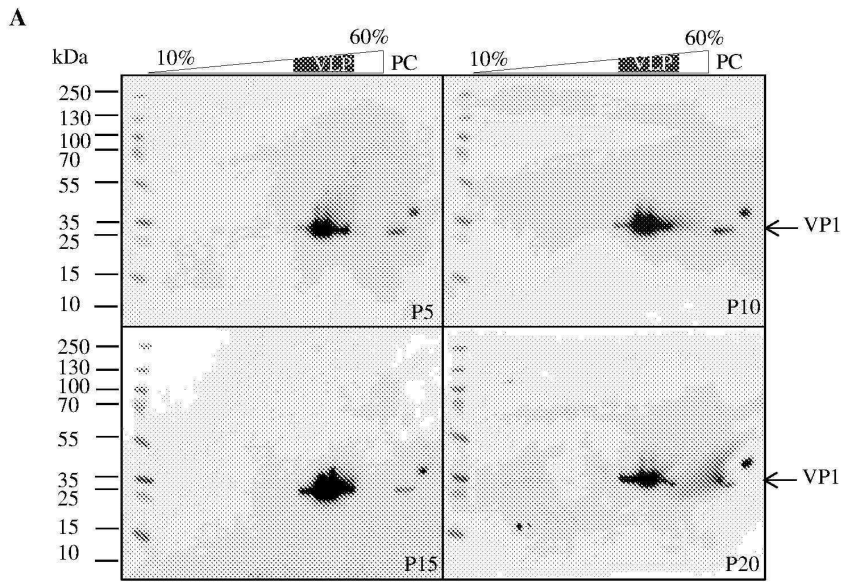
도면8



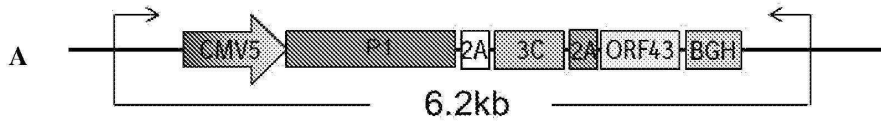
도면9



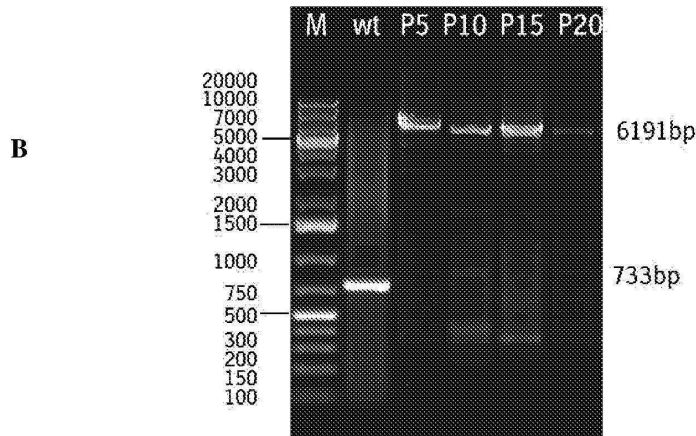
도면10



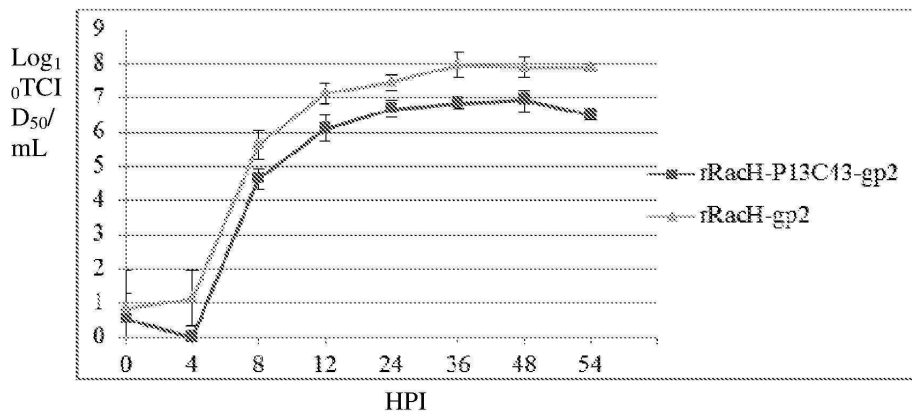
도면11



전체 삽입체를 증폭시키기 위한 PCR



도면12



서열목록

- <110> Boehringer Ingelheim (China) Investment Co., Ltd.
- <120> RECOMBINANT VIRUS CAPABLE OF STABLY EXPRESSING TARGET PROTEINS
- <130> P20192930
- <160> 11
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 2205

<212> DNA

<213> Foot-and-mouth disease virus

<400> 1

```

atgggagccg gacaatccag tccggctact gggtcacaga accaatcagg caacaccggg      60
agtatcatca acaattacta catgcagcag taccagaact ccatggacac ccaacttgg      120
gacaatgcta tcagcggagg ctccaacgag ggatccacag acacaacctc cacccacaca      180

accaaacctc agaacaatga ctggttttca aagttggcca gctctgcctt cagcggctct      240
ttcggcgccc tectcgccga taagaaaacc gaggagacca ctcttctcga ggaccgcatc      300
ctcaccacc gaaacggaca caccacctcg acaaccagt cgagtgttgg cataacgcac      360
gggtacgcaa cagctgagga ttttgaac gggccaaaca cctctggtct tgagaccaga      420
gttgtccagg cggaacggtt ctttaaaacc cacctgttcg actgggtcac cagtgatccg      480
ttcggacggt gctacttgtt ggagctcccg actgaccaca aaggtgtcta cggcagcctg      540
accgactcat acgctacat gagaaacggt tgggatgttg aggtcaccgc tgtggggaat      600

cagttcaacg gaggtgctt actggtggcc atggtgcctg aactttgttc catcgagcgg      660
agagagctgt tccagcttac gctcttccc caccagtca tcaaccccc gacgaacatg      720
acagcccaca tcaaggtgcc ctttgttggc gtcaaccgtt acgatcagta caaggtacac      780
aagccgtgga cccttgtgtt tatggtcgta gccccactga ctgtcaacac cgaaggcgt      840
ccgcagatca aggtgtafca caacatgca cccaccaacg tgcacgtcgc ggggtgagttc      900
ccttccaag aggggatfct ccctgtggcc tftagcgacg gttatggcgg cttggtgaca      960
actgaccaa agacggctga ccccgtttac ggcaaagtgt tcaaccccc cgcgaacatg      1020

ttgccggggc ggttcacaa cctcctggac gtggctgagg cttgccccac gtttctgcac      1080
ttcgatgggt acgtaccgta tftgacct aagacggatt cggacagggt gctcgcacaa      1140
tttgacttgt ctttggcagc aaaacacatg tcaaacacct tcttgcagg tcttggccag      1200
tactacagc agtacagcgg caccgtcaac ctgcacttca tgttcacagg tcccactgac      1260
gcaaaagcgc gttacatgat tgcgtatgcc cctccgggca tggagccgcc caaaacacct      1320
gaggctgctg ctactgcat tcacgcagag tgggacacgg gtctgaactc aaagtttacc      1380
ttttccatcc cctacctctc ggcggctgat tacgcgtaca ccgctctga cgctgctgag      1440

accacaaatg ttcagggatg ggtctgctta tttcaataa cacacgggaa agctgagggt      1500
gacgctcttg tctgtctggc cagtctggc aaagactttg agctcgcct gctgtggac      1560
gctcggcaac agaccacttc gacggcgag tccgctgacc ccgtgactgc caccgttgag      1620
aattacggtg gcgagacaca ggtccagagg cgcaccaca cagacgtctc attcatattg      1680

```

gacagatttg tgaagtac accaaaagac tcaataaatg tattggacct gatgcagacc 1740
 ccctcccaca ccctagtagg ggcgctctc cgcactgccca cttactatct cgtgatcta 1800
 gaggtggcag tgaaacacga gggggacctt acctgggtgc caaatggagc acctgaagca 1860

gccttggaca acaccaccaa cccaacggcg taccataagg cgccgcttac tcggcttga 1920
 ttgcctaca cggcaccaca cgtgttttg gccaccgttt acaacgggaa ctgcaaatac 1980
 gccgggggct cactgccaa cgtgagaggc gatctcaag tgctggctca gaaggcagcg 2040
 aggccgtgc ctacttcttt caactacggt gccatcaaag ccaactcgggt gacagaactg 2100
 ctgtaccga tgaagagggc cgagacgtac tgtcctcggc ccctcttggc tgttcacccg 2160
 agtgcggcca gacacaaaca gaaaatagtg ggcctgtaa agcag 2205

<210> 2

<211> 54

<212> DNA

<213> Foot-and-mouth disease virus

<400> 2

tccttgaact ttgatctgct caagtggca ggggacgtgg agtccaaccc tggg 54

<210> 3

<211> 642

<212> DNA

<213> Foot-and-mouth disease virus

<400> 3

agtggtgccc ccccgaccga cttgcaaaag atggtcatgg gtaacaccaa gcccggtgag 60
 ctcatctcg acgggaagac agtagccatc tgctgtgcta ctggagtatt tggcactgcc 120
 tacctcgtgc ctctcatct tttcgtgag aagtacgaca agatcatgtt ggacggtaga 180
 accatgacag acagtgacta cagagtgttt gagtttgaga ttaaagtaa aggacaggac 240
 atgctctcag acgtgcgct catggtgctg caccgtggga accgcgtgag agacatcacg 300

aaacactttc gtgacacagc aagaatgaag aaaggcacc cgcctgttgg tgtgatcaac 360
 aacgtgacg tcgggagact gattttctca ggtgaggccc tcacctaca ggacattgta 420
 gtgtgcatgg atggagacac catgccgggc ctatttgctt acaaagccgc caccaaagct 480
 ggctactcgc ggggagccgt ccttgctaag gatggagccg acacattcat cgttggcact 540
 cactctcag gtggcaatgg agttgggtac tgctcatgcg tatccagatc catgctccaa 600
 aaaatgaagg cacacatcga ccctgaacca caccagagt aa 642

<210> 4

<211> 2985

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P1-2A-3C gene expression cassette

<400> 4

```

atgggagccg gacaatccag tccggtact gggtcacaga accaatcagg caacaccggg      60
agtatcatca acaattacta catgcagcag taccagaact ccatggacac ccaacttgg      120
gacaatgcta tcagcggagg ctccaacgag ggatccacag acacaacctc cacccacaca      180
accaacactc agaacaatga ctggttttca aagttggcca gctctgcctt cagcggcttt      240
ttcggcgccc tcctcgccga taagaaaacc gaggagacca ctcttctcga ggaccgcatc      300
ctcaccaccg gaaacggaca caccacctcg acaaccctgt cgagtgttgg cataacgcac      360

gggtacgcaa cagctgagga ttttgtgaac gggccaaaca cctctggtct tgagaccaga      420
gttgtccagg cggaacggtt ctttaaaacc cacctgttcg actgggtcac cagtgatccg      480
ttcggacggt gctacttgtt ggagctcccg actgaccaca aaggtgtcta cggcagcctg      540
accgactcat acgcctacat gagaacgggt tgggatgttg aggtcaccgc tgtggggaat      600
cagttcaacg gaggtgcct actggtggcc atggtgcctg aactttgttc catcgagcgg      660
agagagctgt tecagttac gctcttcccc caccagtcca tcaacccccg gacgaacatg      720
acagcccaca tcaaggtgcc ctttgttggc gtcaaccgtt acgatcagta caaggtacac      780

aagccgtgga cccttgtggt tatggtcgta gccccactga ctgtcaacac cgaagcgcct      840
ccgcagatca aggtgtatgc caacatcgca cccaccaacg tgcacgtcgc gggtagttc      900
ccttccaaag aggggatfff ccctgtggcc tgtagcgacg gttatggcgg cttggtgaca      960
actgacccaa agacggetga ccccgtttac ggcaaagtgt tcaaccccc cgcacaatg      1020
ttgccggggc ggttcaccaa cctcctggac gtggctgagg cttgccccac gtttctgcac      1080
ttcgatggtg acgtaccgta tgtgaccact aagacggatt cggacagggt gctcgacaaa      1140
tttgacttgt ctttggcagc aaaacacatg tcaaacacct tccttgcagg tcttgcaccag      1200

tactacacgc agtacagcgg caccgtcaac ctgcacttca tgttcacagg tcccactgac      1260
gcgaaagcgc gttacatgat tgcgtatgcc cctccgggca tggagccgcc caaaacacct      1320
gaggctgctg ctactgcat tcacgcagag tgggacacgg gtctgaactc aaagtttacc      1380
ttttccatcc cctacctctc ggcgctgat tacgcgtaca ccgctctga cgctgctgag      1440
accacaaatg ttcagggatg ggtctgctta tttcaataa cacacgggaa agctgagggt      1500
gacgctcttg tcgtgctggc cagtctggc aaagactttg agctgcgcct gcctgtggac      1560

```

gctcggcaac agaccacttc gacgggagag tcggtgacc ccgtgactgc caccgttgag 1620

aattacggtg gcgagacaca ggtccagagg cgccaccaca cagacgtctc attcatattg 1680

gacagatttg tgaagtcac accaaaagac tcaataaatg tattggacct gatgcagacc 1740

ccctcccaca ccctagtagg ggcgctctc cgactgcca cttactatit cgctgatcta 1800

gaggtggcag tgaaacacga gggggacctt acctgggtgc caaatggagc acctgaagca 1860

gccttggaca acaccaccaa cccaacggcg taccataagg cgccgcttac tcggcttgca 1920

ttgcctaca cggcaccaca ccgtgttttg gccaccgttt acaacgggaa ctgcaatac 1980

gccgggggct cactgcccac cgtgagaggc gatctccaag tgctggctca gaaggcagcg 2040

aggccgctgc ctacttcttt caactacggt gccatcaaag ccaactcgggt gacagaactg 2100

ctgtaccgca tgaagagggc cgagacgtac tgcctcggc ccctcttgge tgttcaccg 2160

agtgcggcca gacacaaaca gaaaatagtg ggcctgtaa agcagtcctt gaactttgat 2220

ctgctcaagt tggcagggga cgtggagtcc aaccctgggc ccgatctgg aggaccttac 2280

gagggaccgg tgaagaagcc tgtcgtttg aaagtgaaag ctaagaactt gatcgtcact 2340

gagagtgggt ccccccgac cgacttgcaa aagatggtca tgggtaacac caagccgctt 2400

gagctcatac tcgacgggaa gacagtagcc atctgctgtg ctactggagt atttggcact 2460

gcctacctcg tgcctcgtca tcttttcgct gagaagtacg acaagatcat gttggacggt 2520

agaacatga cagacagtga ctacagagtg tttgagtttg agattaaagt aaaaggacag 2580

gacatgctct cagacgtcgc gctcatggtg ctgcaccgtg ggaaccgctg gagagacatc 2640

acgaaacact ttcgtgacac agcaagaatg aagaaaggca cccccgctg tgggtgtgatc 2700

aacaacgctg acgtcgggag actgattttc tcaggtgagg ccctcaccta caaggacatt 2760

gtagtgtgca tggatggaga caccatgccg ggcctatttg cctacaaagc cgccacaaa 2820

gctggtact gcgggggagc cgtccttgc t aaggatggag ccgacacatt catcgttggc 2880

actcactctg caggtggcaa tggagttggg tactgctcat gcgtatccag atccatgctc 2940

caaaaaatga aggcacacat cgacctgaa ccacaccag agtaa 2985

<210> 5

<211> 945

<212> DNA

<213> Equine herpesvirus 1

<400> 5

atggcgagt cgcctttga gattgacatc ctactgcca gtgacctatc tcccgtgac 60

ctgtcagctc ttcaaaaatg cgaggtaag cttgtgtttt tgaccgctct gcgtcgtcgc 120

gtgatgctct ccagcgtcac cctctcgtca tactatgtca acggcgcacc cccggacacg 180
ctatccctga tggcggcggtt tcgtaggcgt tttcccgcta taatacagcg cgtgctgccc 240

aacaaaaatga tagccgccgc cctgggagtc gcaccgettc cteccggggc gttcatacag 300
aacacaggcc cgtttgacct gtgcaacggg gactctgtgt gcgcgctgcc tcccattttg 360
gacgtggagg acaagctcgc cctaggatct gtgggcgagg aaatactatt tccgctgacc 420
gttccactcg cgcaagcgcg cgaactcatc gcgcggctgg tagcgcgcgc ggtgcaggct 480
ctcaccctaa acgcccaggc ccagcgcgga gcggaggtga tgttttaca cggacgaaag 540
tacaactgta ccccgatct cagacaccga gacgccgtta acggcgtggc gcggtctctg 600
gtgctaaaca tgatttttgc catgaacgag ggatcgcttg tgctgctctc gctgatacca 660

aacctgctca ccttgggaac ccaggacgga tttgtgaac ccataatcca gatgggaage 720
gccaccctgt aggttggcca gctcgtccac cagcagcccg tgcccacaacc gcaggacggc 780
gctcgcgctt tttgtgtgta cgacgctctg atgtcatgga tcagcgttgc ctgcgctctt 840
ggtgacgtgg tcggtgggaa acccttgggtg cggatctgta cgttcgaggg ccaggctacg 900
atttcccgcg gcgagaaggc ccctgtcatt caaacgettt tgtaa 945

<210> 6
<211> 2256
<212> DNA
<213> Equine herpesvirus 1
<400> 6

atggagggca gcgtcgaatg gtttaacgga catgtttgtg ctaccagtat ttactctcta 60

tggacagatc cgcaccaccc agggcatctt caggcgtctg tctacatgct gtgtcggcgc 120
ggtagcgaact acaccgcaga gttttgtcac gttcccgtct cgggcgaact cttgaaacgc 180
ggagctcgcg acgcatctct ggtaacaccg gcgcgcgttg ccagcgcgcg gcagaccgcg 240
gctgtgctg ggtgctggcc cctggctccc ctgggaaacg ccatgtttgtg gaaatccgtc 300
tacggtggca taacggcggc gcttaagcgc gccgtgggaa gctttgcttt ctateaaccc 360
ctggtgttag gaattaacac gcaaaactgga ctttagtga ccctccgacc cgccgctct 420
gcgggtgaag gcggtggcga ccacgtctct ccgcccggcg cgatcgtaa tgtgtcggtg 480

gaggtagact tggaccacgc gggcattgaa gcgagcgcgg ctagctccac aggatcgtct 540
ctcggcaggc ccagactctg cacgcttcca gatggatatt ttctctcaa cggggacatt 600
gccttagaag ttgagatcg tacaaggag gtttcatttt acagaaagta tgactctgtg 660
caacagcctg ccaacaagcg tcgcggcgac atggcagatt tgttcgtcgt gcacgaacga 720

acccttttgc taggggatg taaacgaatg ggagttaagg ttctattgcc gcgaacgttt 780
 gactgtttag ttgccagctc ccagtcagtg tcgggttttag ctgccatggc gctgtacaaa 840
 cagtggcacg ctactctatt ctctgtagag ctaccagata ctgttgtgca aatTTTTgct 900

tacctagggc cagaattaaa cccgtgtgga gaggaagtcg actattgttg ctttgttga 960
 tttcccggac tcccgacct caaggctagt tcgagcacca cggaggctgt gcgcgatgca 1020
 atggccgcct atagactgtc cgacgggctg tggccggctc taggtatgag cgcgtttcac 1080
 tttttggctc catgggacct ggaagacagg tggcccgggtg aatcggaggc aaaacgggta 1140
 gagggggcgg tacacagctt tcagcttga accgaggatg attggggggc tggcgggta 1200
 tcatgcattt tagagtcgga cgctgtaatg caggggccgt ggttcgaaa gtttgacttt 1260
 tcggcgtttt tccccacgt gtacctgttg ctgtttccc ccaatgagcg cttggctgag 1320

gtggttagat tgagggcacg tggccaacac cccaccetta agctcgctt ggtatccttt 1380
 tttggggggc tgcagcacat caaccccgta gcctataggt ccatcatagc cctatccaac 1440
 ggaatcagta agcggctgga gcacgaagtc aatcagaggg gttttgcat ctgtacatat 1500
 gtcaaagatg gcttttgggg ggcagccgga aatctgcat cagactctgt atcctacgcc 1560
 gacgcctgg ttiacgcaga ggagctaaga agcggcctc agaaggcggc cctcggacac 1620
 gtgtccgaga tggggttttc gctgccggag ggtgtccact tgaatttgcg gctggagggt 1680
 ttgtttacag acgcatctc gtggtcacc cactgttact ggttgtaaa ccgcttcacc 1740

aagatggaag actttgtagg cttccccgcc aagagcgggg ccggcagagc gcgaaggcg 1800
 agcttgtctg ccttgcctacc gctgtagcc gcggtatgcg actctagcga tatgagcacc 1860
 ctccatcagt ctgtgcgggg ggcctgcgaa cagctgtag ccggcgttt tgcgagcgc 1920
 aacaaccgc agttttggag taccaggacg gggatcgagt cgtctacgt actcccccg 1980
 gcagtttaca ggaacggcag cttgctcgac agagactgtg ggcagaggga aattgtgttg 2040
 actcgaaaac acgactgtga atccccatcg cccgtacct ggacgtctt cccaccacc 2100
 ttggttttg ggcgattga ctgtatggtc tatcttact ccattttcaa aacttatcta 2160

agcatgtaa acagagcaat atctgcctcg tgcgacggg atgaatctat gaatgtggac 2220
 tttcaatct ctgattatgc atttttattt acctaa 2256

<210> 7

<211> 225

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BGH polyA signal

<400> 7

gtcacctaaa tgctagagct cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat 60
 ctgttgtttg cccctcccc gtgccttctt tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc 120
 tttcctaata aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg 180
 ggggtggggt ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agaca 225

<210> 8

<211> 4947

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CMV5-P12A3C2AORF43-BGH cassette

<400> 8

ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt 60
 tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgcc aacgaccccc gcccatgac 120
 gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg 180
 ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag 240
 tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc tagcatatgc caagtacgcc 300
 ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgctggcat tatgcccagt acatgacctt 360

 atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat 420
 gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 480
 tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc 540
 aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga 600
 ggtctatata agcagagctc cgcggtggcc gccggatccg ccaccatggg agccggacaa 660
 tccagtcagg ctactgggtc acagaaccaa tcaggcaaca ccgggagtat catcaacaat 720
 tactacatgc agcagtacca gaactccatg gacaccaac ttggtgacaa tgctatcagc 780

 ggaggtccca acgagggatc cacagacaca acctccacce acacaaccaa cactcagaac 840
 aatgactggt ttcaaagtt ggccagctct gccttcagcg gtcctttcgg cgcctcctc 900
 gccgataaga aaaccgagga gaccactctt ctcgaggacc gcctcctcac caccgaaac 960
 ggacacacca cctcgacaac ccagtcgagt gttggcataa cgcacgggta cgcaacagct 1020
 gaggattttg tgaacgggcc aaacacctct ggtcttgaga ccagagtgtt ccaggcggaa 1080
 cgttcttta aaaccacct gttcgactgg gtcaccagtg atccgttcgg acggtgctac 1140
 ttgttggagc tccgactga ccacaaaggt gtctacggca gcctgaccga ctcatagcc 1200

tacatgagaa acggttgga tgttgaggc accgctgtgg ggaatcagtt caacggaggc 1260
 tgcctactgg tggccatggt gcctgaactt tgttccatcg agcggagaga gctgttccag 1320
 cttacgctct tccccacca gttcatcaac ccccggacga acatgacagc ccacatcaag 1380
 gtgcctttg ttggcgtcaa ccgttiacgat cagtacaagg tacacaagcc gtggaccctt 1440
 gtggttatgg tcgtagcccc actgactgtc aacaccgaag gcgctccgca gatcaagggtg 1500
 tatgccaaca tcgcacccac caacgtgcac gtcgcggtg agttcccttc caaagagggg 1560
 attttcctg tggcctgtag cgacggttat ggcggttgg tgacaactga cccaaagacg 1620

gctgaccccg tttacggcaa agtgttcaac ccccccgca acatgttgcc ggggcggttc 1680
 accaacctcc tggacgtggc tgaggcttgc cccacgttcc tgcacttcca tggtagcgtg 1740
 ccgtatgtga cactaagac ggattcggac aggggtgctcg cacaatttga cttgtctttg 1800
 gcagcaaac acatgtcaaa caccttctct gcaggtcttg cccagtaact cacgcagtac 1860
 agcggcaccg tcaacctgca cttcatgttc acaggtccca ctgacgcgaa agcgcgttac 1920
 atgattgctg atgccccctc gggcatggag ccgccccaaa cacctgaggc tgctgctcac 1980
 tgcattcacg cagagtggga cacgggtctg aactcaaagt ttaccttttc catcccctac 2040

ctctcggcgg ctgattacgc gtacaccgcg tctgacgctg ctgagaccac aaatgttcag 2100
 ggatgggtct gcttatttca aataacacac gggaaaagctg agggtagcgc tcttgtcgtg 2160
 ctggccagtg ctggcaaaga ctttgagctg cgctgectg tggacgctcg gcaacagacc 2220
 acttcgacgg gcgagtcggc tgacccccgt actgccaccg ttgagaatta cggtagcgag 2280
 acacaggtcc agaggcgcca ccacacagac gtctcattca tattggacag atttgtgaaa 2340
 gtacaccaa aagactcaat aaatgtattg gacctgatgc agacccccct ccacacccta 2400
 gtaggggcgc tctccgac tgccacttac tatttcgctg atctagaggt ggcagtgaaa 2460

cacgaggggg accttacctg ggtgccaaat ggagcacctg aagcagcctt ggacaacacc 2520
 accaacccaa cggcgtacca taaggcgcgg cttactcggc ttgcattgcc ctacacggca 2580
 ccacaccgtg ttttggccac cgtttacaac gggaaactgca aatacgcgg gggctcactg 2640
 cccaacctga gaggcgatct ccaagtgtg gctcagaagg cagcaggcc getgectact 2700
 tctttcaact acggtgcat caaagccact cgggtgacag aactgctgta ccgcatgaag 2760
 agggccgaga cgtactgtcc tcggccccctc ttggtgttc acccgagtgc ggccagacac 2820
 aaacagaaaa tagtggcgc tgtaaagcag tccttgaact ttgatctgct caagttggca 2880

ggggacgtgg agtccaacct tggccccgga tctggaggac cttacgagg accggtgaag 2940
 aagcctgtcg ctttgaagt gaaagctaag aacttgatcg tcactgagag tggtagcccc 3000
 ccgaccgact tgcaaaagat ggtcatgggt aacaccaagc ccgttgagct catactcgac 3060

gggaagacag tagccatctg ctgtgctact ggagtatttg gcactgccta cctcgtgcct 3120
 cgtcatcttt tcgctgagaa gtacgacaag atcatgttgg acggtagaac catgacagac 3180
 agtgactaca gagtgtttga gtttgagatt aaagtaaaag gacaggacat gctctcagac 3240
 gctgcgctca tgggtgctgca ccgtgggaac cgcgtgagag acatcacgaa acactttcgt 3300

 gacacagcaa gaatgaagaa aggcaccccc gtcgttgggtg tgatcaacaa cgctgacgtc 3360
 gggagactga ttttctcagg tgaggccctc acctacaagg acattgtagt gtgcatggat 3420
 ggagacacca tgccgggcct atttgcctac aaagccgcca ccaaagctgg ctactgcggg 3480
 ggagccgtcc ttgctaagga tggagccgac acattcatcg ttggcactca ctctgcaggt 3540
 ggcaatggag ttgggtactg ctcatgctga tccagatcca tgctccaaaa aatgaaggca 3600
 cacatcgacc ctgaaccaca ccacgagggg ttgatcgttg acaccagaga tgtggaagag 3660
 cgcgtgcacg tcatgcgcaa gaccaagggt acctccttga actttgatct cctcaagttg 3720

 gcaggggacg tagagtccaa cccagggcct atggcgagtg cgcctttga gattgacatc 3780
 ctactgceca gtgacctatc tcccgtgac ctgtcagctc ttcaaaaatg cgagggtaaag 3840
 cttgtgtttt tgaccgtctc gcgtcgtcgc gtgatgetct ccagcgtcac cctctcgtca 3900
 tactatgtca acggcgcacc cccggacacg ctatccctga tggcggcgtt tcgtaggcgt 3960
 tttcccgtca taatacagcg cgtgctgccc aacaaaatga tagccgccgc cctgggagtc 4020
 gcaccgttc ctcccggggc gttcatacag aacacaggcc cgtttgacct gtgcaacggg 4080
 gactctgtgt gcgcgctgcc tcccattttg gacgtggagg acaagctgcg cctaggatct 4140

 gtgggcgagg aaatactatt tccgctgacc gttccactcg cgcaagcgcg cgaactcatc 4200
 gcgcggctgg tagcgcgcgc ggtgcaggct ctaccccaa acgcccaggc ccagcgcgga 4260
 gcggaggatga tgttttaca cggacgaaag tacaacgtga ccccgatct cagacaccga 4320
 gacgcggtta acggcgtggc gcggtctctg gtgctaaaca tgatttttgc catgaacgag 4380
 ggatcgtttg tgctgctctc gctgatacca aacctgctca ccctgggaac ccaggacgga 4440
 tttgtgaac ccataatcca gatgggaagc gccaccctg aggttgcca gctcgtccac 4500
 cagcagcccc tgcccacc gcaggacggc gctcgcctt tttgtgtgta cgacgtctg 4560

 atgtcatgga tcagcgttgc ctgcgtctt ggtgacgtgg tcggtgggaa acccttgggtg 4620
 cggatctgta cgttcgaggg ccaggctacg atttcccgcg gcgagaaggc ccctgtcatt 4680
 caaacgcttt tgiaatctag atagagggcc ctattctata gtgtcaccta aatgctagag 4740
 ctgcgtgate agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc 4800
 ccgtgccttc cttgacctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg 4860
 aaattgcatc gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg 4920

acagcaaggg ggaggattgg gaagaca 4947

<210> 9

<211> 6258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CMV5-P12A3C2AORF54-BGH cassette

<400> 9

ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgct 60

tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgcc aacgaccccc gccattgac 120

gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg 180

ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagttacat caagtgtatc atatgccaag 240

tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc tagcatatgc caagtacgcc 300

ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgctggcat tatgcccagt acatgacctt 360

atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat 420

gcggttttgg cagtlacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 480

tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc 540

aaaatgtcgt aacaactccg ccccatgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga 600

ggtctatata agcagagctc cgcgtggccg gccggatccg ccaccatggg agccggacaa 660

tccagtccgg ctactgggtc acagaaccaa tcaggcaaca ccgggagtat catcaacaat 720

tactacatgc agcagtacca gaactccatg gacaccaac ttggtgacaa tgctatcagc 780

ggaggctcca acgagggatc cacagacaca acctccacc acacaaccaa cactcagaac 840

aatgactggt tttcaaagtt ggccagctct gccttcagcg gtcttttcgg cgcctcctc 900

gccgataaga aaaccgagga gaccactctt ctcgaggacc gcatcctcac caccgaaac 960

ggacacacca cctcgacaac ccagtcgagt gttggcataa cgcacgggta cgcaacagct 1020

gaggattttg tgaacgggcc aaacacctct ggtcttgaga ccagagttgt ccaggcgga 1080

cggttcttta aaaccacct gttcgactgg gtcaccagtg atccgttcgg acggtgctac 1140

ttgttggagc tcccactga ccacaaaggt gtctacggca gcctgaccga ctcatagcc 1200

tacatgagaa acggttggga tgttgaggtc accgctgtgg ggaatcagtt caacggaggc 1260

tgctactgg tggccatggt gcctgaactt tgttccatcg agcggagaga gctgttccag 1320

cttacgtct tccccacca gttcatcaac cccggacga acatgacagc ccacatcaag 1380

gtgccctttg ttggcgtcaa ccgttacgat cagtacaagg tacacaagcc gtggaccctt 1440

gtggttatgg tcgtagcccc actgactgtc aacaccgaag gcgctccgca gatcaaggtg 1500
 tatgccaaca tcgacccac caacgtgcac gtcgcggtg agttcccttc caaagagggg 1560
 attttccctg tggcctgtag cgacggttat ggcggcttgg tgacaactga cccaaagacg 1620

gctgaccccc tttaaggcaa agtgttcaac ccccccgca acatgttgcc ggggcggttc 1680
 accaacctcc tggacgtggc tgaggcttgc cccacgttc tgcacttcca tggtagcgtg 1740
 ccgtatgtga ccaactaac ggattcggac aggggtgctcg cacaatttga cttgtctttg 1800
 gcagcaaac acatgtcaaa caccttctt gcaggcttgc cccagtacta cacgcagtac 1860
 agcggcaccg tcaacctgca cttcatgttc acaggtccca ctgacgcgaa agcgcgttac 1920
 atgattgctg atgcccccc gggcatggag ccgccccaaa cacctgaggc tgctgctcac 1980
 tgcattcacg cagagtggga cacgggtctg aactcaaagt ttacctttc catcccctac 2040

ctctcggcgg ctgattacgc gtacaccgcg tctgacgctg ctgagaccac aaatgttcag 2100
 ggatgggtct gcttatttca aataacacac gggaaagctg agggtagcgc tcttgtcgtg 2160
 ctggccagtg ctggcaaaga ctttgagctg cgctgctg tggacgctcg gcaacagacc 2220
 acttcgacgg gcgagtcggc tgaccccgctg actgccaccg ttgagaatta cggtagcgag 2280
 acacaggtcc agaggcgcca ccacacagac gtctcattca tattggacag attttgaaa 2340
 gtcacaccaa aagactcaat aaatgtattg gacctgatgc agaccccc cccacaccta 2400
 gtaggggcgc tctccgcaac tgccacttac tatttcgctg atctagaggt ggcagtgaaa 2460

cacgaggggg accttacctg ggtgccaaat ggagcacctg aagcagcctt ggacaacacc 2520
 accaacccaa cgcgctacca taaggcgccg ctactcggc ttgcattgcc ctacacggca 2580
 ccacaccgtg ttttggccac cgtttacaac gggaaactgca aatacgccgg gggctcactg 2640
 cccaactgga gaggcgaact ccaagtgtg gctcagaagg cagegagcc gctgcctact 2700
 tctttcaact acggtgcat caaagccact cgggtgacag aactgctgta ccgcatgaag 2760
 agggccgaga cgtactgtcc tcggcccc c ttggctgttc acccgagtgc ggccagacac 2820
 aaacagaaaa tagtggcgcc tgtaaagcag tccttgaact ttgatctgct caagtggca 2880

ggggacgtgg agtccaacc tgggcccga tctggaggac cttacgaggg accggtgaag 2940
 aagcctgtcg ctttgaagt gaaagctaag aacttgatcg tcactgagag tggtgcccc 3000
 ccgaccgact tgcaaaagat ggtcatgggt aacaccaagc ccgttgagct catactcgac 3060
 gggaagacag tagccatctg ctgtgctact ggagtattg gcactgccta cctcgtgcct 3120
 cgtcatctt tcgctgagaa gtacgacaag atcatgttg acggtagaac catgacagac 3180
 agtgactaca gagtgttga gtttgagatt aaagtaaaag gacaggacat gctctcagac 3240

gctgcgctca tggctgtgca ccgtgggaac cgcgtgagag acatcacgaa acactttcgt 3300

 gacacagcaa gaatgaagaa aggcaccccc gtcgttggg tgatcaacaa cgctgacgtc 3360
 gggagactga ttttctcagg tgaggccctc acctacaagg acattgtagt gtgcatggat 3420
 ggagacacca tgccgggcct atttgcctac aaagcccca ccaaagctgg ctactgcggg 3480
 ggagccgtcc ttgctaagga tggagccgac acattcatcg ttggcactca ctctgcaggt 3540
 ggcaatggag ttgggtactg ctcatgctga tccagatcca tgctccaaaa aatgaaggca 3600
 cacatcgacc ctgaaccaca ccacgagggg ttgatcgttg acaccagaga tgtggaagag 3660
 cgcgtgcacg tcatgcgcaa gaccaagggt acctccttga actttgatct cctcaagttg 3720

 gcaggggacg tagagtccaa cccagggcct atggagggca gcgtcgaatg gtttaacgga 3780
 catgtttgtg ctaccagtat ttactctcta tggacagatc cgcaccacc agggeatctt 3840
 caggcgtcgc tctacatgct gtgtcggcgc ggtagcgact acaccgaga gttttgtcac 3900
 gttcccgctc cgggcgaact cttgaaacgc ggagctcgcg acgcatctct ggtaacaccg 3960
 gcgcgcgttg ccagcggcgc gcagaccgcg gctgtgcctg ggtgctggcc cctggctccc 4020
 ctgggaaacg ccatgtttg gaaatccgtc tacggtggca taacggcggc gettaagcgc 4080
 gccgtgggaa gctttgcttt ctatcaacc ctggtgttag gaattaacac gcaaactgga 4140

 cttttagtta cctccgacc cgcccgctct gcgggtgaag gcggtggcga ccacgtctct 4200
 ccgcgggcgg cgatcgtaaa tgtgtcggtg gaggtagact tggaccacgc gggcattgaa 4260
 gcgagcgcgg ctagctccac aggatcgtct ctgccaggg ccagactctg cacgcttca 4320
 gatggatatt ttctctcaa gcgggacatt gcctagaag ttgagatcg taaaaaggag 4380
 gtttcatttt acagaaagta tgactctgtg caacagcctg ccaacaagcg tcgcggcgac 4440
 atggcagatt tttctgtct gcacgaacga acccttttgc taggggatg taaacgaatg 4500
 ggagttaagg ttctattgcc gcgaacgttt gactgtttag ttgccagctc ccagtcagtg 4560

 tcgggtttag ctgcatggc gctgtacaaa cagtggcacg ctactctatt ctctgtagag 4620
 ctaccagata ctgttgtgca aatttttgct tacctagggc cagaattaa cccgtgtgga 4680
 gaggaagtcg aciattgtt cttttttgga tttcccgac tcccaccct caaggctagt 4740
 tcgagacca cggaggctgt gcgcgatgca atggccgct atagactgtc cgacgggctg 4800
 tggccggctc taggtatgag cgcgtttcac tttttggctc catgggacc ggaagacagg 4860
 tggcccgggtg aatcggaggc aaaacgggta gagggggcgg tacacaggct tcagcttgg 4920
 accgaggatg attggggggc tgggcgggta tcatgcattt tagagtcgga cgctgtaatg 4980

caggggccgt ggttcgcaaa gtttgacttt tcggcgTTTT tccccacgct gtacctgttg 5040
 ctgtttcccc ccaatgagcg cttggctgag gtggttagat tgagggcacg tggccaacac 5100
 cccaccctta agctcgctt ggtatccttt tttggggggc tgcagcacat caaccccgta 5160
 gcctataggt ccatcatagc cctatccaac ggaatcagta agcggctgga gcacgaagtc 5220
 aatcagaggg gttttgcat ctgtacatat gtcaaagatg gcttttggg ggcagccgga 5280
 aatctgcat cagactctgt atcctacgcc gacgcgctgg ttacgcaga ggagctaaga 5340
 agcgcgcctc agaaggcggc cctcggacac gtgtccgaga tggggttttc gctgccggag 5400

 ggtgtccact tgaatttgcg gctggagggt ttgtttacag acgccatctc gtggtccacc 5460
 cactgttact ggttgtacaa ccgcttcacc aagatggaag actttgtagg cttccccgcc 5520
 aagagcgggg ccggcagagc cgcgaaggcg agcttgtctg ccttgctacc gctggtagcc 5580
 gcggtatgcg actctagcga tatgagcacc ctccatcagt ctgtcgggg ggctcgcgaa 5640
 cagctggtag ccggcgcttt tgccgagcgc aacaaccgc agttttggag taccaggacg 5700
 gggatcgagt cgtctacgt actcccccg gcagtttaca ggaacggcag cttgctcgac 5760
 agagactgtg ggcagagggg aattgtgttg actcgcaaac acgactgtga atccccatcg 5820

 ccggtaccct ggacgctctt cccaccacc ttggttttgg ggcgcattga ctgtatggc 5880
 tatcttacgt ccattttcaa aacttatcta agcatgttaa acagagcaat atctgcctcg 5940
 tgcgacgagg atgaatctat gaatgtggac tttccaatct ctgattatgc atttttatt 6000
 acctaacta gatagagggc cctattctat agtgtcacct aaatgctaga gctcgtgat 6060
 cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgccctcc cccgtgcctt 6120
 ccttgaccct ggaagggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat 6180
 cgcatgtct gagtaggtgt cattctattc tgggggtgg ggtggggcag gacagcaagg 6240

 gggaggattg ggaagaca 6258
 <210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 taacaccatg gcaggcctgt tg 22
 <210> 11
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

gagcgattcg cacctcatct cc

22