(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월20일
(11) 등록번호 10-2823029
(24) 등록일자 2025년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/001162 (2025.01)
(21) 출원번호 10-2020-7020621
(22) 출원일자(국제) 2018년12월19일
심사청구일자 2021년12월07일
(85) 번역문제출일자 2020년07월15일
(65) 공개번호 10-2020-0100126
(43) 공개일자 2020년08월25일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2018/046794
(87) 국제공개번호 WO 2019/124441
국제공개일자 2019년06월27일
(30) 우선권주장
62/608,213 2017년12월20일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO1996037616 A1*
US20140170186 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
브이엘피 테라퓨틱스 인코포레이티드
미국 19801 델라웨어주 윌밍턴 오렌지 스트리트 1209
(72) 발명자
아카하타 와타루
미국 20895 매릴랜드주 켄싱턴 화이트 플린트 드라이브 5211
우에노 류지
미국 21601 매릴랜드주 이스턴 맬러드 드라이브 28307
(74) 대리인
특허법인코리아나

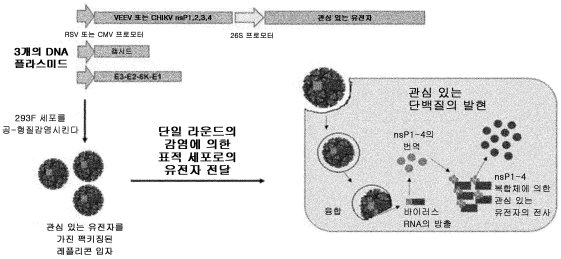
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **알파바이러스 레플리콘 입자**

(57) 요 약

(i) 캡시드(capsid) 및/또는 외피(envelope)를 포함하는 알파바이러스(alphavirus) 구조 단백질, 및 (ii) 알파바이러스 비-구조 단백질 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 적어도 하나의 관심 있는 유전자를 포함하는 알파바이러스 레플리콘(replicon)을 포함하는 알파바이러스 레플리콘 입자(ARP)로서, 적어도 하나의 캡시드, 및 외피의 E3 및 E2가 하나 이상의 아미노산 변경을 포함하나, 외피의 E1은 아미노산 변경을 포함하지 않는 ARP를 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 39/12 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 2770/36122 (2013.01)
C12N 2770/36134 (2013.01)
C12N 2770/36143 (2013.01)
C12N 2770/36152 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 알파바이러스 레플리콘 입자(ARP)로서,

(i) 캡시드(capsid) 및 외피(envelope)를 포함하는 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEEV) 구조 단백질, 및

(ii) VEEV 비-구조 단백질 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 적어도 하나의 관심 있는 유전자를 포함하는 VEEV 레플리콘(replicon)

여기서, VEEV 구조 단백질은 하나 이상의 라이신 또는 아르기닌이 아스파라긴 또는 알라닌으로 치환된 VEEV 캡시드 단백질 핵 국소화 신호(NLS) 를 포함하는, ARP.

청구항 2

제1항에 있어서, VEEV가 VEEV 균주 TC-83인, ARP.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 관심 있는 유전자가 항원을 코딩하는, ARP.

청구항 4

하기 단계를 포함하는, 제1항에 따른 알파바이러스 레플리콘 입자를 제조하는 방법:

i) VEEV 비-구조 단백질 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 적어도 하나의 관심 있는 유전자를 포함하는 벡터,

ii) VEEV 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및

iii) VEEV E3-E2-6K-E1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 세포를 공-형질감염시키는 단계로서,

여기서, VEEV 구조 단백질은 하나 이상의 라이신 또는 아르기닌이 아스파라긴 또는 알라닌으로 치환된 VEEV 캡시드 단백질 핵 국소화 신호(NLS) 를 포함하는 단계,

형질감염된 세포를 배양하는 단계, 및

세포 배양물로부터 ARP를 정제하는 단계.

청구항 5

제4항에 있어서, VEEV가 VEEV 균주 TC-83인, 제조 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 관심 있는 유전자가 항원을 코딩하는, 제조 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유전자 전달 시스템으로서 사용될 수 있는 알파바이러스 레플리콘(alphavirus replicon) 입자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 유전자 요법은 유전 물질을 세포 내로 도입하여 비정상 유전자를 보완하거나, 유익한 단백질을 만들도록 디자인된다. 돌연변이된 유전자가 필요한 단백질로 하여금 결함을 갖게 하거나 사라지게 하는 경우, 유전자 요법은 상기 유전자의 정상 카피를 도입하여 상기 단백질의 기능을 회복시킬 수 있다.

[0003] 유전자 요법은 암, 바이러스 감염, 심근 경색 및 유전적 장애 등과 같은 만성 질환을 치료하는 데 있어서 그의 잠재력 때문에 의학 및 약학에서 최근 생겨난 분야이다.

[0004] 세포 내로 직접 삽입되는 유전자는 보통 기능하지 않는다. 대신에, 벡터로서 지칭되는 담체가 유전자를 전달하도록 유전적으로 조작된다. 일부 바이러스들은 세포를 감염시킴으로써 신규 유전자를 전달할 수 있기 때문에 벡터로서 종종 사용된다. 상기 바이러스들은 사람에서 사용될 때 질환을 야기할 수 없도록

변형된다. 일부 유형의 바이러스, 예컨대, 레트로바이러스는 (신규 유전자를 포함하는) 그의 유전 물질을 인간 세포 내의 염색체 내로 삽입한다. 다른 바이러스들, 예컨대, 아데노바이러스는 그의 유전자를 세포의 핵 내로 도입하나, 이 유전자는 염색체 내로 삽입되지 않는다.

[0005] 벡터는 그 자신이 개별 세포에 의해 흡수되는 특정 조직 내로 직접 주사될 수 있거나, 체내에 정맥내(IV)로 제공될 수 있다. 대안적으로, 실험실 환경에서 환자의 세포의 샘플을 떼어내고 벡터에 노출시킬 수 있다. 그 다음, 벡터를 함유하는 세포를 환자에게 돌려보낸다. 치료가 성공적인 경우, 벡터에 의해 전달된 신규 유전자는 기능성 단백질을 만들 것이다 (https://ghr.nlm.nih.gov/primer/therapy/procedures, Int J Pharm Investig. 2013 Jan-Mar; 3(1): 1-7).

[0006] 알파바이러스는 토가비리대(Togaviridae) 과의 한 세트의 유전적, 구조적 및 혈청학적 관련 모기 매개 바이러스들을 포함한다. 알파바이러스는 동부 말 뇌염 바이러스(EEEV), 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEEV), 에버글레이즈(Everglades) 바이러스, 무캄보(Mucambo) 바이러스, 픽수나(Pixuna) 바이러스, 서부 말 뇌염 바이러스(WEEV), 신드비스(Sindbis) 바이러스, 셈리키 포레스트(Semliki Forest) 바이러스, 미들버그(Middleburg) 바이러스, 치쿤구니야(Chikungunya) 바이러스(CHIKV), 오뇽-뇽(O'nyong-nyong) 바이러스, 로스 리버(Ross River) 바이러스, 바마 포레스트(Barmah Forest) 바이러스, 게타(Getah) 바이러스, 사기야마(Sagiyama) 바이러스, 베바루(Bebaru) 바이러스, 마야로(Mayaro) 바이러스, 우나(Una) 바이러스, 아우라(Aura) 바이러스, 화타로아(Whataroa) 바이러스, 바반키(Babanki) 바이러스, 키질라가크(Kyzylagach) 바이러스, 하이랜드(Highlands) J 바이러스, 포트 모간(Fort Morgan) 바이러스, 은두무(Ndumu) 바이러스, 및 버기 크릭(Buggy Creek) 바이러스를 포함한다. 단일 바이러스 단백질을 함유하는 구조 서브유닛인 캡시드는 이십면체 뉴클레오캡시드 내의 RNA 게놈과 회합한다. 비리온에서, 상기 캡시드는 2종의 당단백질인 E1과 E2의 이종이량체성 복합체로 각각 이루어진 막횡단 단백질 스파이크들의 규칙적인 어레이로 덮인 지질 외피에 의해 둘러싸인다.

[0007] 알파바이러스 레플리콘 입자(ARP)는 세포 또는 배양물에서 생성되고, 알파바이러스 구조 단백질 및 막 지질을 포함하는 비리온 쉘 내에서 비-알파바이러스 유전자를 발현할 수 있는 "레플리콘"을 포함한다.

[0008] 알파바이러스 레플리콘 입자는 미국 특허 제7,045,335호, 국제 특허출원 공보 제WO2004/085660호 및 문헌(Virology 239, 389-401, 1997)에 기재되어 있다. 이의 제조 방법은 미국 특허 제7,078,218호에 기재되어 있고, 이 단락에서 인용된 문헌의 내용은 참고로 포함된다.

[0009] 유전자 요법의 임상 적용은 유전자를 세포 내로 적절히 도입하기에 적합한 방법이 없기 때문에 여전히 제한되므로, 이것은 많은 연구원들에게 흥미로운 분야이다. 성공적인 유전자 요법을 달성하기 위해서는, 적절한 유전자 전달 시스템의 개발이 가장 중요한 요인들 중 하나일 수 있다(Int. J Pharm Investig. 2013 an-Mar; 3(1): 1-7).

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 미국 특허 제7,045,335호

(특허문헌 0002) 특허문헌 2: 국제 특허출원 공보 제WO2004/085660호

(특허문헌 0003) 특허문헌 3: 미국 특허 제7,078,218호

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Int J Pharm Investig. 2013 Jan-Mar; 3(1): 1-7

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Virology 239, 389-401, 1997

발명의 내용

[0012] 본 발명은 개선된 알파바이러스 레플리콘 입자를 포함하는 유전자 전달 시스템에 관한 것이다.

[0013] 일 양상에서, 알파바이러스 레플리콘 입자(ARP)는,

[0014] (i) 캡시드 및/또는 외피를 포함하는 알파바이러스 구조 단백질, 및

[0015] (ii) 알파바이러스 비-구조 단백질 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 적어도 하나의 관심 있는 유전자를 포함하는 알파바이러스 레플리콘을 포함하고,

[0016] 여기서 캡시드, 외피의 E3 및 E2 중 적어도 하나가 하나 이상의 아미노산 변경을 포함하나, 외피의 E1이 아미노산 변경을 포함하지 않는다.

[0017] 일 양상에서, 본 발명은 바이러스 구조 단백질이 알파바이러스 캡시드 단백질 핵 국소화 신호(NLS) 내에 하나 이상의 변경을 가진 것인 ARP를 제공한다.

[0018] 일 양상에서, 알파바이러스 캡시드 단백질은 EEEV, WEEV, VEEV, CHIKV, 로스 리버 바이러스 또는 바마 포레스트 바이러스 캡시드 단백질이다. 상기 양상들 또는 본원에 기재된 본 발명의 임의의 다른 양상의 다양한 구체예들에서, 하나 이상의 변경은 EEEV 캡시드 단백질의 아미노산 67 내지 70; WEEV 캡시드 단백질의 아미노산 67 내지 70; VEEV 캡시드 단백질의 아미노산 64 내지 68; CHIKV 캡시드 단백질의 아미노산 62 내지 69; 로스 리버 바이러스 캡시드 단백질의 아미노산 71 내지 74; 또는 바마 포레스트 바이러스 캡시드 단백질의 아미노산 64 내지 68에서 NLS 내에 존재한다.

[0019] 상기 양상들 또는 본원에 기재된 본 발명의 임의의 다른 양상의 다양한 구체예들에서, 변경은 NLS의 하전된 아미노산 또는 NLS의 염기성 하전된 아미노산에서의 치환이다. 일부 구체예들에서, 하전된 아미노산 또는 염기성 하전된 아미노산은 라이신 또는 아르기닌이다. 일부 구체예들에서, 라이신 또는 아르기닌은 비-라이신 또는 비-아르기닌 아미노산으로 치환된다. 특정 구체예들에서, 라이신 또는 아르기닌은 아스파라긴 또는 알라닌으로 치환된다.

[0020] 상기 양상들 또는 본원에 기재된 본 발명의 임의의 다른 양상의 다양한 구체예들에서, EEEV 바이러스 캡시드 단백질 NLS는 아미노산 67에서 변경된다. 특정 구체예들에서, EEEV 바이러스 캡시드 단백질 NLS는 치환 K67N을 가진다.

[0021] 상기 양상들 또는 본원에 기재된 본 발명의 임의의 다른 양상의 다양한 구체예들에서, WEEV 바이러스 캡시드 단백질 NLS는 아미노산 67, 68 및 69 중 하나 이상의 아미노산에서 변경된다. 특정 구체예들에서, WEEV 캡시드 단백질 NLS는 K67N, K68N 및/또는 K69N을 포함한다.

[0022] 상기 양상들 또는 본원에 기재된 본 발명의 임의의 다른 양상의 다양한 구체예들에서, VEEV 캡시드 단백질 NLS는 아미노산 64, 65 및 67 중 하나 이상의 아미노산에서 변경된다. 특정 구체예들에서, VEEV 바이러스 캡시드 단백질 NLS는 K64N, K65A 또는 K65N, 및/또는 K67A 또는 K67N을 포함한다.

[0023] 상기 양상들 또는 본원에 기재된 본 발명의 임의의 다른 양상의 다양한 구체예들에서, 로스 리버 바이러스 캡시드 단백질 NLS는 아미노산 71, 72, 73 및 74 중 하나 이상의 아미노산에서 변경된다. 특정 구체예들에서, 로스 리버 바이러스 캡시드 단백질 NLS는 R71N, R72N, R73N 및/또는 R74N을 포함한다.

[0024] 상기 양상들 또는 본원에 기재된 본 발명의 임의의 다른 양상의 다양한 구체예들에서, 바마 포레스트 바이러스 캡시드 단백질 NLS는 아미노산 64, 65, 67 및 68 중 하나 이상의 아미노산에서 변경된다. 특정 구체예들에서, 바마 포레스트 바이러스 캡시드 단백질 NLS는 K64A, K65A 또는 K65N, K67A, K67N, K68A 및/또는 K68N을 포함한다.

[0025] 캡시드 NLS에서의 변경은 미국 특허 공보 제2014-170186호 또는 제2017-073377호에 상세히 기재되어 있다. 이 공보들의 내용은 참고로 본원에 포함된다.

[0026] 일 양상에서, 알파바이러스 E2 단백질은 CHIKV E2 단백질의 아미노산 234에 상응하는 아미노산 위치에서 비-라이신 잔기(예를 들면, 아스파라긴)을 가질 수 있고/있거나, CHIKV E2 단백질의 아미노산 251에 상응하는 아미노산 위치에서 바이러스 버딩(budding) 동안 E2 단백질을 불안정화시키는 변형을 가질 수 있다.

[0027] 일 양상에서, 알파바이러스 E3 단백질은 푸린 부위(Arg-X-X-Arg)에서 아미노산 서열의 변경/돌연변이를 포함할 수 있다.

[0028] 용어 "Arg-X-X-Arg"은 푸린의 최소 절단 부위를 표시하고, "X-X"는 2개의 아미노산들의 임의의 조합을 포함한다. 푸린 부위에서 아미노산 서열에 대한 변경의 예는 Ile-Glu/Asp-Gly-Arg, Asp-Asp-Asp-Asp-Lys

또는 Ser-Gly-Gly-Gly-Ser으로의 변경을 포함한다. 푸린 부위 변경에 대한 상세한 내용은 미국 특허 공보 제2016-0040134호 및 제2016-0200775호(인용된 문헌들은 참고로 본원에 포함됨)에 기재되어 있다.

[0029] 예를 들면, VEEV CT83 균주는 그의 E3 영역의 말단에서 RKRR의 푸린 부위를 갖고, RKRR은 SGGGS로 대체될 수 있다.

[0030] 본 발명에 따르면, 알파바이러스 레플리콘은 알파바이러스 비-구조 단백질 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 뉴클레오티드, 및 적어도 하나의 관심 있는 유전자를 포함한다. 알파바이러스 비-구조 단백질은 구조 단백질이 유래한 알파바이러스와 동일한 알파바이러스로부터 유래한 단백질일 수 있다. 알파바이러스 비-구조 단백질은 구조 단백질이 유래한 알파바이러스와 상이한 알파바이러스로부터 유래한 단백질일 수 있다(키메라 알파바이러스 레플리콘 입자).

[0031] 예를 들면, CHIKV로부터 유래한 알파바이러스 구조 단백질, 및 VEEV nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 뉴클레오티드 및 관심 있는 유전자를 포함하는 알파바이러스 레플리콘을 포함하는 ARP가 본 발명에 따라 제공될 수 있다.

[0032] 일 양상에서, 본 발명은 하기를 포함하는 알파바이러스 레플리콘 입자(ARP)를 제공한다:

[0033] (i) 캡시드 및/또는 외피를 포함하는 CHIKV 구조 단백질, 및

[0034] (ii) VEEV 비-구조 단백질 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 적어도 하나의 관심 있는 유전자를 포함하는 VEEV 레플리콘.

[0035] 관심 있는 유전자는 임의의 원하는 공급원, 예를 들면, 바이러스, 원핵생물, 진핵생물, 고세균으로부터 유래한 매우 다양한 서열들로부터 선택될 수 있다. 관심 있는 유전자의 범주의 예는 예를 들면, 항원성 단백질을 포함하는 면역원, 사이토카인, 독소, 치료 단백질, 효소, 안티센스 서열 및 면역 반응 조절제를 포함한다.

[0036] 다른 양상에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 알파바이러스 레플리콘 입자를 제조하는 방법을 제공한다:

[0037] i) 알파바이러스 비-구조 단백질 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 적어도 하나의 관심 있는 유전자를 포함하는 벡터,

[0038] ii) 알파바이러스 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및

[0039] iii) 알파바이러스 E3-E2-6K-E1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 세포를 공-형질감염시키는 단계로서,

[0040] 여기서 적어도 하나의 캡시드, E3 및 E2는 하나 이상의 아미노산 변경을 포함하나, E1은 아미노산 변경을 포함하지 않는 단계,

[0041] 형질감염된 세포를 배양하는 단계, 및

[0042] 세포 배양물로부터 ARP를 정제하는 단계.

[0043] 일반적으로, 알파바이러스 구조 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드는 E1, E2, 6k 및 E3을 코딩하는 뉴클레오티드를 포함한다. 야생형 바이러스 구조 단백질의 발현 시, 6K 및 E3은 조립 과정 동안 천연적으로 절단되고 ARP로부터 제거된다. 성숙 야생형 ARP는 캡시드, E1 및 E2 단백질을 포함할 수 있다. 아미노산 서열의 하나 이상의 변경이 예를 들면, E3 단백질의 푸린 부위에 도입될 때, E3은 절단될 수 없고 ARP에 함유될 수 있다. 본 명세서 및 청구범위에서, "바이러스 구조 단백질"은 6k 및/또는 E3을 가진 바이러스 구조 단백질뿐만 아니라 6K 및/또는 E3을 갖지 않은 바이러스 구조 단백질도 지칭한다.

[0044] 알파바이러스가 CHIKV 또는 VEEV인 대표적인 ARP는 도 1에 의해 예시된다.

[0045] 일 양상에서, 본 발명은 하기를 포함하는 키메라 알파바이러스 레플리콘 입자를 제공한다:

[0046] (i) 캡시드 및/또는 외피를 포함하는 CHIKV 구조 단백질, 및

[0047] (ii) VEEV 비-구조 단백질 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 적어도 하나의 관심 있는 유전자를 포함하는 VEEV 레플리콘.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 ARP를 생성하기 위한 개략적 프로토콜을 보여준다.

도 2는 VEEV 레플리콘 입자의 구축을 보여준다.

도 3은 VEEV_pBR322_NLuc 벡터를 보여준다.

도 4는 TC83_CMV_CAwt_헬퍼 1p 벡터를 보여준다.

도 5는 TC83_CMV_CAmut_헬퍼 1P 벡터를 보여준다.

도 6은 TC83_CMV_WTgp_헬퍼 2P 벡터를 보여준다.

도 7은 TC83_CMV_E3gp_헬퍼 2P 벡터를 보여준다.

도 8은 VEE VRP 내로의 VEEV 레플리콘의 팩키징 능력을 확인하기 위한 개략적 프로토콜을 보여준다.

도 9는 도 8에 나타낸 시험의 결과를 보여준다.

도 10은 VEEV 레플리콘 입자의 구축에 있어서 다중 클로닝 부위의 도입을 보여준다.

도 11은 VEEV_pBR322_MCS_NLuc_잠정적 벡터를 보여준다.

도 12는 정제된 VEE 바이러스 레플리콘 입자의 웨스턴 블롯팅의 결과를 보여준다.

도 13은 IKK를 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 VRP에 의해 감염된 세포의 웨스턴 블롯팅을 보여준다. 레인 1, VRP에 의해 감염된 세포, 레인 2, IKK 플라스미드 벡터에 의해 감염된 세포(양성 대조군).

도 14는 JNK2를 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 VRP에 의해 감염된 세포의 웨스턴 블롯팅을 보여준다.

도 15는 루시퍼라제(luciferase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 VRP에 의해 감염된 세포의 루시퍼라제 어세이의 결과를 보여준다.

도 16은 GFP를 코딩하는 유전자를 포함하는 VRP에 의해 감염된 세포에서의 GFP의 발현을 보여준다.

도 17은 GFP를 코딩하는 유전자를 포함하는 VRP에 의해 감염된 M2 분극화된 대식세포에서의 GFP 발현을 보여준다.

도 18은 실시예 9의 개략적 프로토콜을 보여준다.

도 19는 실시예 9의 결과를 보여준다.

도 20은 CHIKV 구조 단백질 및 VEEV 레플리콘으로부터 수득된 정제된 키메라 ARP의 웨스턴 블롯팅을 보여준다.

도 21은 도 20의 ARP에 의해 감염된 세포의 FACS 분석을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 정의

[0050] 본원에서 사용된 바와 같이, "알파바이러스"는 토가비리대 과의 바이러스에 속하는 RNA 함유 바이러스를 지칭하기 위한 것이다. 예시적 토가비리대 바이러스는 동부 말 뇌염 바이러스(EEEV), 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEEV), 에버글레이즈 바이러스, 무캄보 바이러스, 픽수나 바이러스, 서부 말 뇌염 바이러스(WEEV), 신드비스 바이러스, 셈리키 포레스트 바이러스, 미들버그 바이러스, 치쿤구니야 바이러스(CHIKV), 오뇽-뇽 바이러스, 로스 리버 바이러스, 바마 포레스트 바이러스, 게타 바이러스, 사기야마 바이러스, 베바루 바이러스, 마야로 바이러스, 우나 바이러스, 아우라 바이러스, 화타로아 바이러스, 바반키 바이러스, 키질라가크 바이러스, 하이랜드 J 바이러스, 포트 모간 바이러스, 은두무 바이러스, 버기 크릭 바이러스 및 옥켈보(Ockelbo) 바이러스를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0051] "알파바이러스 구조 단백질"은 천연 생성 바이러스 캡시드 또는 외피 단백질과 적어도 약 80% 아미노산 서열 동일성을 가진 폴리펩티드 또는 이의 단편을 의미한다. 일 구체예에서, 알파바이러스 구조 단백질은 동부 말 뇌염 바이러스(EEEV), 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEEV), 에버글레이즈 바이러스, 무캄보 바이러스, 픽수나 바이러스, 서부 말 뇌염 바이러스(WEEV), 신드비스 바이러스, 셈리키 포레스트 바이러스, 미들버그 바이러스, 치쿤구니야 바이러스(CHIKV), 오뇽-뇽 바이러스, 로스 리버 바이러스, 바마 포레스트 바이러스, 게타 바이러스, 사기야마 바이러스, 베바루 바이러스, 마야로 바이러스, 우나 바이러스, 아우라 바이러스, 화타로아 바이러스,

바반키 바이러스, 키질라가크 바이러스, 하이랜드 J 바이러스, 포트 모간 바이러스, 은두무 바이러스 및 버기크릭 바이러스와 적어도 약 85%, 90% 또는 95% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가진다. 알파바이러스 구조 단백질의 야생형 아미노산 서열은 진뱅크(GenBank)로부터 수득될 수 있다.

[0052] 특정 구체예들에서, 알파바이러스는 CHIKV, 예를 들면, CHIKV 균주 37997 또는 LR2006 OPY-1이다. 다른 구체예들에서, 알파바이러스는 VEEV, 예를 들면, VEEV 균주 TC-83이다.

[0053] "알파바이러스 레플리콘"은 생체내 표적 세포에서 그 자신의 증폭을 유도할 수 있는 RNA 분자를 의미한다. 레플리콘은 RNA 증폭을 촉매작용하는 중합효소(들)(nsp1, nsp2, nsp3, nsp4)을 코딩하고, 코딩된 중합효소(들)에 의해 인식되고 사용되는, 복제를 위해 요구된 시스 RNA 서열을 함유한다. 알파바이러스 레플리콘은 전형적으로 하기 순서의 요소들을 함유한다: 5' UTR, 알파바이러스 비-구조 단백질(nsp1, nsp2, nsp3, nsp4)을 코딩하는 서열, 3' UTR, 및 폴리 A 신호. 알파바이러스 레플리콘은 관심 있는 유전자의 발현을 유도하는 하나 이상의 바이러스 하위게놈 프로모터도 함유한다. 상기 서열들은 종래 기술에서 교시된 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다.

[0054] "알파바이러스 레플리콘 입자"(ARP)는 알파바이러스 구조 단백질에 의해 팩키징된 알파바이러스 레플리콘을 의미한다. ARP는 임의의 알파바이러스 구조 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하지 않는다.

[0055] "작용제"는 임의의 소분자 화합물, 항체, 핵산 분자 또는 폴리펩티드, 또는 이들의 단편을 의미한다.

[0056] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역증강제(adjuvant)"는 제제에서 특정 면역원과 함께 사용될 때, 생성된 면역 반응을 증강시키거나, 변경시키거나 변형시키는 화합물을 지칭하기 위한 것이다. 일부 구체예들에서, 면역증강제는 ARP와 함께 사용된다. 면역 반응의 변형은 항체 면역 반응 및 세포 면역 반응 중 하나 또는 둘 다의 특이성의 강화 또는 확장을 포함한다. 면역 반응의 변형은 일부 항원 특이적 면역 반응들의 감소 또는 억제를 의미할 수도 있다. 일 구체예에서, 면역증강제는 Ribi 면역증강제이다.

[0057] "완화시킨다"는 질환 또는 이의 증상의 발생 또는 진행을 감소시키거나, 억제하거나, 약화시키거나, 줄이거나, 정지시키거나 안정화시키는 것을 의미한다.

[0058] "변경"은 폴리펩티드 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열과 관련하여 특정된 위치에서 아미노산 또는 뉴클레오티드의 변화를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 변경은 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 특정된 위치에서 아미노산 또는 뉴클레오티드의 치환, 결실 또는 삽입을 포함한다. 일부 구체예들에서, 알파바이러스 캡시드 단백질 핵 국소화 신호의 변경은 하전된 아미노산(예를 들면, 라이신 또는 아르기닌)을 비하전된 아미노산(예를 들면, 알라닌 또는 아스파라긴, 또는 염기성 하전된 아미노산, 예컨대, 라이신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산)으로 치환시키는 것을 포함한다.

[0059] "변경"은 당분야에서 알려진 표준 방법, 예컨대, 본원에 기재된 방법에 의해 검출될 때 유전자 또는 폴리펩티드의 발현 수준 또는 활성과 관련된 변화(증가 또는 감소)를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 변경은 발현 수준의 10%, 25%, 50%, 75% 또는 100% 이상의 변화를 포함한다. 변경은 발현 수준의 10배, 20배, 50배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 500배 또는 1000배 이상의 변화를 포함한다.

[0060] "유사체"는 동일하지 않으나 유사한 기능적 또는 구조적 특징을 가진 분자를 의미한다. 예를 들면, 폴리펩티드 유사체는 천연 생성 폴리펩티드에 비해 유사체의 기능을 향상시키는 일부 생화학적 변형을 가지면서 상응하는 천연 생성 폴리펩티드의 생물학적 활성을 보유한다. 이러한 생화학적 변형은 예를 들면, 리간드 결합을 변경시키지 않으면서 유사체의 단백질분해효소 내성, 막 투과성 또는 반감기를 증가시킬 수 있다. 유사체는 비천연 아미노산을 포함할 수 있다.

[0061] 이 개시에서, "포함한다", "포함하는", "함유하는" 및 "가진" 등은 미국 특허법에서 이들에 부여된 의미를 가질 수 있고, "포괄한다", "포괄하는" 등을 의미할 수 있고; "본질적으로 구성된" 또는 "본질적으로 구성된다"는 마찬가지로 미국 특허법에서 부여된 의미를 갖고, 상기 용어는, 언급된 것의 기본 또는 신규 특성이 언급된 것보다 더 많은 것의 존재에 의해 변화되지 않는 한, 언급된 것보다 더 많은 것의 존재를 허용할 정도로 제한되지 않으나, 종래 기술 구체예를 배제한다.

[0062] "검출한다"는 검출되는 피분석물의 존재, 부재 또는 양을 확인하는 것을 지칭한다.

[0063] "질환"은 세포, 조직 또는 장기의 정상 기능을 손상시키거나 방해하는 임의의 상태 또는 장애를 의미한다.

[0064] "유효량"은 비치료 환자에 비해 질환의 증상을 완화시키기 위해 요구된 작용제의 양을 의미한다. 질환의 예

방 또는 치료를 위해 본 발명을 실시하는 데 사용되는 활성 화합물(들)의 유효량은 투여 방식, 대상체의 연령, 체중 및 일반적인 건강에 따라 달라진다. 궁극적으로, 주치의 또는 수의사는 적절한 양 및 투약 용법을 결정할 것이다. 이러한 양은 "유효"량으로서 지칭된다.

[0065] "단편"은 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 부분을 의미한다. 이 부분은 바람직하게는 기준 핵산 분자 또는 폴리펩티드의 전체 길이의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 함유한다. 단편은 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개 또는 1000개의 뉴클레오티드 또는 아미노산을 함유할 수 있다.

[0066] "마커"는 질환 또는 장애와 관련된 발현 수준 또는 활성의 변경을 가진 임의의 단백질 또는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[0067] 본원에서 사용된 바와 같이, "핵 국소화 신호" 또는 "NLS"는 폴리펩티드의 표면에 존재할 때 폴리펩티드를 세포의 핵으로 표적화하는 아미노산 서열이다. NLS 서열은 당분야에서 알려져 있다. 예를 들면, 문헌(Goldfarb, D., and N. Michaud (1991) Trends Cell Biol. 1, 20-24); 및 문헌(Gorlich, D., and I. W. Mattaj (1996) Science 271, 1513-1518)을 참조한다. 일 구체예에서, NLS는 양으로 하전된 아미노산, 예컨대, 라이신 또는 아르기닌의 하나 이상의 짧은 서열을 포함한다. NLS를 위한 컨센서스 서열은 K-K/R-X-K/R(Schneider, J. et al. (1988) Cell 54,117-125), 및 약 10개 아미노산의 스페이서에 의해 분리된 2개의 염기성 아미노산 클러스터들, 예를 들면, KR[PAATKKAGQA]KKKK(Dingwall et al., / Cell Biol. 107 (3): 841-9)를 포함한다. 본 발명의 알파바이러스 아미노산 서열과 관련하여, NLS는 EEEV 캡시드 단백질의 아미노산 67 내지 70(KRKK); WEEV 캡시드 단백질의 아미노산 67 내지 70(KKKK); VEEV 캡시드 단백질의 아미노산 64 내지 68(KKPKK); CHIKV 캡시드 단백질의 아미노산 62 내지 69(RRNRKNKK); 로스 리버 바이러스 캡시드 단백질의 아미노산 71 내지 74(RKKK); 및 바마 포레스트 바이러스 캡시드 단백질의 아미노산 64 내지 68(KKPKK)에 존재한다. 예를 들면, VEEV TC83 캡시드 단백질의 K64N이 사용될 수 있다.

[0068] 본원에서 사용된 바와 같이, "작용제를 수득하는"에서와 같이 "수득하는"은 작용제를 합성하거나, 구입하거나 다른 방식으로 획득하는 것을 포함한다.

[0069] "감소시킨다"는 적어도 10%, 25%, 50%, 75% 또는 100%의 음의 변경을 의미한다.

[0070] "기준"은 표준 또는 대조군 조건을 의미한다.

[0071] "기준 서열"은 서열 비교를 위한 기준으로서 사용된 규정된 서열이다. 기준 서열은 특정된 서열의 서브세트 또는 전체; 예를 들면, 전체 길이 cDNA 또는 유전자 서열의 분절, 또는 완전한 cDNA 또는 유전자 서열일 수 있다. 폴리펩티드의 경우, 기준 폴리펩티드 서열의 길이는 일반적으로 적어도 약 16개 아미노산, 바람직하게는 적어도 약 20개 아미노산, 보다 바람직하게는 적어도 약 25개 아미노산, 훨씬 더 바람직하게는 약 35개 아미노산, 약 50개 아미노산 또는 약 100개 아미노산일 것이다. 핵산의 경우, 기준 핵산 서열의 길이는 일반적으로 적어도 약 50개 뉴클레오티드, 바람직하게는 적어도 약 60개 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 적어도 약 75개 뉴클레오티드, 훨씬 더 바람직하게는 약 100개 뉴클레오티드 또는 약 300개 뉴클레오티드, 또는 이들 근처 또는 이들 사이의 임의의 정수일 것이다.

[0072] 서열 동일성은 전형적으로 서열 분석 소프트웨어(예를 들면, 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)(위스콘신주 53705 매디슨 유니버시티 애비뉴 1710 위스콘신 대학 생물공학 센터)의 서열 분석 소프트웨어 팩키지, BLAST, BESTFIT, GAP, 또는 PILEUP/PRETTYBOX 프로그램)를 사용함으로써 측정된다. 이러한 소프트웨어는 상동성의 정도를 다양한 치환, 결실 및/또는 다른 변형에 배정함으로써 동일하거나 유사한 서열들을 매칭한다. 보존적 치환은 전형적으로 하기 군 내에서의 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민; 세린, 쓰레오닌; 라이신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신. 동일성의 정도를 측정하는 예시적 방식에서, 밀접히 관련된 서열을 표시하는, e<"3>과 e<"100> 사이의 확률 점수와 함께 BLAST 프로그램이 사용될 수 있다.

[0073] "구조 폴리단백질"은 바이러스 캡시드 또는 외피에 기여하는 적어도 2개의 분리될 수 있는 폴리펩티드들을 포함하는 복합 아미노산 분자를 의미한다. 일 구체예에서, 상기 폴리펩티드들은 바이러스 효소(예를 들면, 캡시드 자가단백질분해효소(autoproteinase) 및 신호분해효소(signalase))를 사용한 절단에 민감하다.

[0074] "대상체"는 인간 또는 비-인간 포유동물, 예컨대, 소, 말, 개, 양 또는 고양이를 포함하나 이들로 한정되지 않는 포유동물을 의미한다.

[0075] 본원에서 제공된 범위는 그 범위 내의 모든 값들에 대한 약칭인 것으로 이해된다. 예를 들면, 1 내지 50의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50으로 구성된 군으로부터의 임의의 숫자, 숫자들의 조합 또는 하위범위를 포함하는 것으로 이해된다.

[0076] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료한다", "치료하는", "치료" 등은 장애 및/또는 이와 관련된 증상을 감소시키거나 완화시키는 것을 지칭한다. 불가능하지는 않을지라도, 장애 또는 상태의 치료는 장애, 상태 또는 이와 관련된 증상이 완전히 제거될 것을 요구하지 않는다는 것을 인식할 것이다.

[0077] 구체적으로 언급되어 있거나 문맥으로부터 자명하지 않는 한, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "또는"은 포괄적인 것으로 이해된다.

[0078] 구체적으로 언급되어 있거나 문맥으로부터 자명하지 않는 한, 본원에서 사용된 바와 같이, 단수형 용어는 단수 또는 복수인 것으로 이해된다.

[0079] 구체적으로 언급되어 있거나 문맥으로부터 자명하지 않는 한, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 당분야에서 일반 공차의 범위, 예를 들면, 평균의 2 표준 편차 이내인 것으로 이해된다. 약은 언급된 값의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% 또는 0.01% 이내인 것으로 이해될 수 있다. 문맥으로부터 달리 자명하지 않는 한, 본원에서 제공된 모든 숫자 값들은 용어 약에 의해 수식된다.

[0080] 본원에서 제공된 임의의 조성물 또는 방법은 본원에서 제공된 임의의 다른 조성물들 및 방법들 중 하나 이상과 조합될 수 있다.

[0081] 알파바이러스 레플리콘

[0082] 알파바이러스 레플리콘은 진핵생물 세포에게 전달될 때, (그가 그 자신으로부터 생성하는 안티센스 카피를 통해) 그 자신으로부터 전사에 의한 다수의 딸 RNA들의 생성을 유발할 수 있다. 알파바이러스 레플리콘은 세포에게 전달된 후 직접 번역될 수 있고, 이 번역은 전달된 RNA로부터 안티센스 전사체 및 센스 전사체 둘 다를 생성하는 RNA 의존적 RNA 중합효소를 제공한다. 따라서, 전달된 RNA는 다수의 딸 RNA들의 생성을 유발한다. 이 딸 RNA들뿐만 아니라 동일선상의 하위게놈 전사체들도 코딩된 단백질의 제자리 발현을 제공하도록 그들 스스로 번역될 수 있거나, 단백질의 제자리 발현을 제공하도록 번역되는, 전달된 RNA와 동일한 센스를 가진 추가 전사체를 제공하도록 전사될 수 있다. 이 순서의 전사의 전체 결과는 도입된 레플리콘 RNA의 수의 엄청난 증폭이므로, 코딩된 단백질은 세포의 주요 폴리펩티드 생성물이 된다.

[0083] 본 발명에 따르면, 알파바이러스 레플리콘은 비-구조 단백질 n1, n2, n3 및 n4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 적어도 하나의 관심 있는 유전자를 포함한다. 알파바이러스 레플리콘은 임의의 알파바이러스 구조 단백질을 코딩하지 않는다.

[0084] 알파바이러스 비-구조 단백질은 상기 논의된 알파바이러스들 중 하나로부터 유래한 야생형 단백질일 수 있거나, 야생형 아미노산 서열의 하나 이상의 변경을 가질 수 있다. 알파바이러스 비-구조 단백질의 변경은 다양한 종래 기술 참고문헌들에 개시되어 있고, 당업자는 공개적으로 알려진 정보를 기반으로 적합한 알파바이러스 비-구조 단백질을 선택할 수 있다.

[0085] 알파바이러스 레플리콘은 당분야에서 잘 알려져 있고 임의의 이전에 개시된 레플리콘을 사용할 수 있다(예를 들면, 문헌(Virology. 1997 Dec 22;239(2):389-401), 국제 특허출원 공보 제WO2009/131604호, 제WO2011/005799호, 제WO2012/031043호, 제WO2014/1270493호 및 제WO2015/095167호, 인용된 문헌들의 내용은 참고로 본원에 포함됨).

[0086] 알파바이러스 구조 단백질

[0087] ARP는 알파바이러스 구조 단백질인 캡시드 및 외피 단백질을 가진다. 바람직하게는, 알파바이러스 구조 단백질은 캡시드 단백질, 및 외피의 E2 및 E1 단백질을 포함하고, 외피의 E3 단백질도 가질 수 있다. 본 발명에 따르면, 캡시드 및 외피 중 적어도 하나는 포유동물 세포에서 ARP 발현을 향상시키는 적어도 하나의 변경을 가진다.

[0088] 일 구체예에서, 알파바이러스 구조 단백질은 적어도 알파바이러스 캡시드 단백질 NLS의 라이신 잔기에 상응하는 아미노산 위치에서 비-라이신 잔기(예를 들면, 알라닌 또는 아스파라긴)를 갖고/갖거나, 알파바이러스 캡시드 단백질 NLS의 아르기닌 잔기에 상응하는 아미노산 위치에서 비-아르기닌 잔기(예를 들면, 알라닌 또는 아스파라

긴)를 가진 알파바이러스 캡시드 단백질을 포함한다. 특정 구체예들에서, 알파바이러스 캡시드 단백질은 변경 K67N, K68N 및 K69N 중 하나 이상을 가진 WEEV CBA87 균주 캡시드 단백질이다. 일부 구체예들에서, 알파바이러스 캡시드 단백질은 변경 K64N, K65A, K65N, K67A 및 K67N 중 하나 이상을 가진 VEEV TC83 균주 캡시드 단백질이다. 일부 구체예들에서, 알파바이러스 캡시드 단백질은 변경 K67N을 가진 EEEV PE-6 균주 캡시드 단백질이다. 특정 구체예들에서, 알파바이러스 캡시드 단백질은 변경 R62A, R63A, R65A, K66A, K68A 및 K69A 중 하나 이상을 가진 CHIKV 균주 37997 캡시드 단백질이고; 알파바이러스 캡시드 단백질은 변경 R71N, K72N, K73N 및 K74N 중 하나 이상을 가진 로스 리버 바이러스 캡시드 단백질이고; 알파바이러스 캡시드 단백질은 변경 K64A, K64N, K65A, K65N, K67A, K67N, K68A 및 K68N 중 하나 이상을 가진 바마 포레스트 바이러스 캡시드 단백질이다. 상기 논의된 알파바이러스들의 야생형 캡시드 단백질 아미노산 서열은 진뱅크에서 입수될 수 있다.

[0089] 일 구체예에서, 알파바이러스 E2 단백질은 CHIKV E2 단백질의 아미노산 234에 상응하는 아미노산 위치에서 비-라이신 잔기(예를 들면, 아스파라긴)를 갖고/갖거나, CHIKV E2 단백질의 아미노산 251에 상응하는 아미노산 위치에서 바이러스 버딩 동안 E2 단백질을 불안정화시키는 변형을 가진다.

[0090] 일 구체예에서, 알파바이러스 E3을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 푸린 부위(Arg-X-X-Arg)에서 아미노산 서열에 대한 변경/돌연변이를 포함하도록 변형될 수 있다.

[0091] 용어 "Arg-X-X-Arg"은 푸린의 최소 절단 부위를 표시하고, "X-X"는 2개의 아미노산들의 임의의 조합을 포함한다. 푸린 부위에서 아미노산 서열에 대한 변경의 예는 Ile-Glu/Asp-Gly-Arg, Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 또는 Ser-Gly-Gly-Gly-Ser으로의 변경을 포함한다. 상세한 설명은 미국 특허 공보 제2016-0040134호 및 제2016-0200775호에 기재되어 있다(인용된 문헌들은 참고로 본원에 포함됨).

[0092] 예를 들면, VEEV CT83 균주는 그의 E3 영역의 말단에서 RKRR을 포함하는 푸린 부위를 갖고, RKRR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 SGGGS를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열로 대체될 수 있다.

[0093] 본 발명의 일부 구체예들에서, 단백질은 침묵 치환, 추가 또는 결실을 생성하되, 코딩된 단백질의 성질 또는 활성, 또는 단백질이 만들어지는 방식을 변경시키지 않는 변경을 함유하는 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0094] ARP의 제조 방법

[0095] ARP는 당분야에서 알려진 절차에 의해 제조될 수 있다. ARP를 생성하기 위한 예시된 절차는 문헌(Virology 239, 389-401, 1997)에 개시되어 있고, 인용된 문헌의 내용은 참고로 본원에 포함된다.

[0096] 일반적으로, ARP는 알파바이러스 레플리콘을 코딩하는 벡터, 즉 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 관심 있는 유전자를 포함하는 벡터; 및 알파바이러스 바이러스 구조 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 헬퍼 벡터로 적합한 숙주 세포를 공-형질감염시킴으로써 생성될 수 있다. 바람직하게는, 알파바이러스 레플리콘을 코딩하는 벡터, 캡시드 단백질을 코딩하는 벡터 및 외피 단백질을 코딩하는 벡터로 세포를 공-형질감염시킨다.

[0097] 구체적으로, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 알파바이러스 레플리콘 입자를 제조하는 방법을 제공한다:

[0098] i) 알파바이러스 비-구조 단백질 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 적어도 하나의 관심 있는 유전자를 포함하는 벡터,

[0099] ii) 알파바이러스 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및

[0100] iii) 알파바이러스 E3-E2-6K-E1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 세포를 공-형질감염시키는 단계로서,

[0101] 여기서 적어도 하나의 캡시드, E3 및 E2는 하나 이상의 아미노산 변경을 포함하나, E1은 아미노산 변경을 포함하지 않는 단계,

[0102] 형질감염된 세포를 배양하는 단계, 및

[0103] 세포 배양물로부터 ARP를 정제하는 단계.

[0104] 분자생물학 분야에서 숙련된 자는 매우 다양한 발현 시스템들 중 임의의 발현 시스템을 사용하여 ARP를 생성할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 공-형질감염될 정확한 세포(숙주 세포)는 본 발명에 그다지 중요하지 않다. ARP는 원핵생물 숙주(예를 들면, 이. 콜라이(E. coli)) 또는 진핵생물 숙주(예를 들면, 사카로마이세스 세레

비지애(Saccharomyces cerevisiae), 곤충 세포, 예를 들면, Sf21 세포, 또는 포유동물 세포, 예를 들면, NIH 3T3, HeLa, COS 세포)에서 생성될 수 있다. 이러한 세포는 광범위한 공급원들(예를 들면, 어메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection), 메릴랜드주 록랜드 소재; 예를 들면, 상기 문헌(Ausubel et al.)도 참조)로부터 입수될 수 있다. 곤충 세포의 비한정적 예는 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)(Sf) 세포, 예를 들면, Sf9, Sf21, 트리코플루지아 니(Trichoplusia ni) 세포, 예를 들면, 하이 파이브(High Five) 세포, 및 드로소필라(Drosophila) S2 세포이다. (효모를 포함하는) 진균 숙주 세포의 예는 사카로마이세스 세레비지애, 클루이베로마이세스 락티스(Kluyveromyces lactis)(K lactis), 칸디다 알비칸스(C. albicans) 및 칸디다 글라브라타(C. glabrata)를 포함하는 칸디다 종, 아스퍼길루스 니둘란스(Aspergillus nidulans), 쉬조사카로마이세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe)(S. pombe), 피키아 파스토리스(Pichia pastoris), 및 야로위아 리폴라이티카(Yarrowia lipolytica)이다. 포유동물 세포의 예는 COS 세포, 새끼 햄스터 신장 세포, 마우스 L 세포, LNCaP 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포, 아프리카 녹색 원숭이 세포, CV1 세포, HeLa 세포, MDCK 세포, Vero 및 Hep-2 세포이다. 아프리카발톱개구리(Xenopus laevis) 난모세포, 또는 양서류 유래의 다른 세포도 사용될 수 있다. 원핵생물 숙주 세포는 세균 세포, 예를 들면, 이. 콜라이, 바실러스 서브틸리스(B. subtilis) 및 마이코박테리아를 포함한다.

[0105] 상기 단백질들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 수득하는 방법은 당분야에서 알려져 있다. 예를 들면, 특정 알파바이러스 단백질, 예를 들면, CHIKV, WEEV, EEEV, VEEV, 로스 리버 바이러스 또는 바마 포레스트 바이러스 구조 단백질을 코딩하는 유전자는 상기 바이러스에 의해 감염된 세포로부터 추출된 폴리아데닐화된 mRNA로부터 RT-PCR에 의해 단리될 수 있다. 생성된 생성물 유전자는 폴리뉴클레오티드 삽입물로서 벡터 내로 클로닝될 수 있다.

[0106] 용어 "벡터"는 유기체들, 세포들 또는 세포 성분들 사이에 핵산 서열을 전파시킬 수 있고/있거나 전달할 수 있는 수단을 지칭한다. 벡터는 자체적으로 복제하거나 숙주 세포의 염색체 내로 삽입될 수 있는 플라스미드, 바이러스, 박테리오파지, 전구바이러스, 파지미드, 트랜스포존, 인공 염색체 등을 포함한다. 벡터는 자체적으로 복제하지 않는 네이키드(naked) RNA 폴리뉴클레오티드, 네이키드 DNA 폴리뉴클레오티드, 동일한 가닥 내에 DNA 및 RNA 둘 다로 구성된 폴리뉴클레오티드, 폴리라이신-접합된 DNA 또는 RNA, 펩티드-접합된 DNA 또는 RNA, 리포좀-접합된 DNA 등일 수도 있다. 모두는 아니지만 많은 통상의 구체예들에서, 본 발명의 벡터는 플라스미드 또는 백미드(bacmid)이다.

[0107] 전형적으로, 발현될 핵산 분자는 프로모터 및/또는 인핸서에 "작동가능하게 연결"되고, 프로모터 및/또는 인핸서에 의한 전사 조절 제어를 받는다.

[0108] 형질감염 방법 및 발현 비히클의 선택은 선택된 숙주 시스템에 의해 좌우될 것이다. 형질감염 방법은 예를 들면, 문헌(Ausubel et al.)(상기)에 기재되어 있고; 발현 비히클은 예를 들면, 문헌(Cloning Vectors: A Laboratory Manual (P. H. Pouwels et al., 1985, Supp. 1987))에서 제공된 발현 비히클들로부터 선택될 수 있다. 이 단락에서 인용된 참고문헌은 참고로 본원에 포함된다.

[0109] 본 발명의 ARP를 생성하기 위한 다양한 발현 시스템들이 존재한다. 이러한 ARP를 생성하는 데 유용한 발현 벡터는 염색체 유래의 벡터, 에피좀 유래의 벡터 및 바이러스 유래의 벡터, 예를 들면, 세균 플라스미드, 박테리오파지, 트랜스포존, 효모 에피좀, 삽입 요소, 효모 염색체 요소, 바이러스, 예컨대, 바큘로바이러스, 파포바바이러스, 예컨대, SV40, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스, 파울폭스 바이러스, 가성광견병 바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래한 벡터들, 및 이들의 조합으로부터 유래한 벡터들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0110] 본원에서 사용된 구축물 및/또는 벡터는 본원에 기재된 외피 단백질 또는 캡시드 단백질을 비롯한 구조 단백질을 코딩하는 알파바이러스 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 본원에서 사용된 구축물 및/또는 벡터는 비-구조 단백질 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 알파바이러스 폴리뉴클레오티드, 및 관심 있는 유전자를 포함한다.

[0111] 벡터는 예를 들면, 파지, 플라스미드, 바이러스 또는 레트로바이러스 벡터일 수 있다. 상기 뉴클레오티드를 포함하는 구축물 및/또는 벡터는 적절한 프로모터, 예컨대, 비한정적 예인 CMV 프로모터, 파지 람다 PL 프로모터, 이. 콜라이 lac, phoA 및 tac 프로모터, SV40 초기 및 후기 프로모터, 및 레트로바이러스 LTR의 프로모터에 작동가능하게 연결되어야 한다. 다른 적합한 프로모터는 숙주 세포 및 원하는 발현율에 따라 숙련된 당업자에게 알려져 있을 것이다. 발현 구축물은 전사 시작 및 종결을 위한 부위도 함유할 것이고, 전사된 영역 내에 번역을 위한 리보좀 결합 부위도 함유할 것이다. 구축물에 의해 발현된 전사체의 코딩 부분은 바람직하

게는 번역되는 폴리펩티드의 시작 부위에서 번역 시작 코돈을 포함할 것이고 상기 폴리펩티드의 말단에 적절하게 위치된 종결 코돈을 포함할 것이다.

[0112] 벡터는 바람직하게는 적어도 하나의 선택 마커를 포함할 것이다. 이러한 마커는 디하이드로폴레이트 환원효소, 진핵생물 세포 배양을 위한 G418 또는 네오마이신 내성, 및 이. 콜라이 및 다른 세균에서의 배양을 위한 테트라사이클린, 카나마이신 또는 앰피실린 내성 유전자를 포함한다. 바람직한 벡터들 중에는 바이러스 벡터, 예컨대, 바큘로바이러스, 폭스바이러스(예를 들면, 백시니아 바이러스, 아비폭스 바이러스, 카나리폭스 바이러스, 파울폭스 바이러스, 라쿤폭스 바이러스, 스완폭스 바이러스 등), 아데노바이러스(예를 들면, 개 아데노바이러스), 헤르페스바이러스 및 레트로바이러스가 있다. 본 발명과 함께 사용될 수 있는 다른 벡터는 pQE70, pQE60 및 pQE-9, pBluescript 벡터, 파지스크립트(Phagescript) 벡터, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5를 포함하는, 세균에서 사용될 벡터를 포함한다. 바람직한 진핵생물 벡터 중에는 pFastBacl pWINEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 및 pSG, pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL이 있다. 다른 적합한 벡터는 숙련된 당업자에게 용이하게 명확할 것이다.

[0113] 재조합 구축물은 제조되어 형질감염에 사용될 수 있고, 본원에 기재된 바이러스 단백질들을 포함하는 바이러스 단백질을 진핵생물 세포 및/또는 원핵생물 세포 내로 발현할 수 있다. 따라서, 본 발명은 ARP의 형성을 허용하는 조건 하에서 캡시드, E3, E2, 6K 및 E1 또는 이들의 부분을 포함하는 알파바이러스 구조 단백질을 코딩하는 핵산을 함유하는 벡터(또는 벡터들), 및 알파바이러스 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 관심 있는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0114] 일 구체예에서, 상기 벡터는 재조합 바큘로바이러스이다. 또 다른 구체예에서, 상기 재조합 바큘로바이러스는 곤충 세포 내로 형질감염된다. 바람직한 구체예에서, 상기 세포는 곤충 세포이다. 또 다른 구체예에서, 상기 곤충 세포는 Sf9 세포이다.

[0115] 폴리펩티드 생성을 위한 한 특정 세균 발현 시스템은 이. 콜라이 pET 발현 시스템(노바겐 인코포레이티드(Novagen, Inc.), 위스콘신주 매디슨 소재)이다. 이 발현 시스템에 따르면, 폴리펩티드를 코딩하는 DNA는 발현을 허용하도록 디자인된 배향으로 pET 벡터 내로 삽입된다. 이러한 폴리펩티드를 코딩하는 유전자가 T7 조절 신호의 제어 하에 있기 때문에, 상기 폴리펩티드의 발현은 숙주 세포에서 T7 RNA 중합효소의 발현을 유도함으로써 달성된다. 이것은 전형적으로 IPTG 유도에 반응하여 T7 RNA 중합효소를 발현하는 숙주 균주를 사용함으로써 달성된다. 그 다음, 재조합 폴리펩티드는 일단 생성되면 당분야에서 알려진 표준 방법, 예를 들면, 본원에 기재된 방법에 따라 단리된다.

[0116] 폴리펩티드 생성을 위한 또 다른 세균 발현 시스템은 pGEX 발현 시스템(파마샤(Pharmacia))이다. 이 시스템은 기능성 유전자 생성물을 신속히 정제하고 회수하면서 유전자 또는 유전자 단편을 융합 단백질로서 고수준으로 발현하도록 디자인된 GST 유전자 융합 시스템을 사용한다. 관심 있는 단백질은 일본주혈흡충(Schistosoma japonicum)으로부터의 글루타티온 S-트랜스퍼라제 단백질의 카르복실 말단에 융합되고, 글루타티온 세파로스 4B를 사용한 친화성 크로마토그래피에 의해 세균 용해물로부터 용이하게 정제된다. 융합 단백질은 글루타티온을 사용한 용출에 의해 온화한 조건 하에서 회수될 수 있다. 융합 단백질로부터의 글루타티온 S-트랜스퍼라제 도메인의 절단은 부위 특이적 단백질분해효소를 위한 인식 부위가 이 도메인의 업스트림에 존재함으로써 용이해진다. 예를 들면, pGEX-2T 플라스미드에서 발현된 단백질은 트롬빈에 의해 절단될 수 있고; pGEX-3X에서 발현된 단백질은 인자 Xa에 의해 절단될 수 있다.

[0117] 선택된 벡터 및 숙주 세포에 따라, ARP는 재조합 단백질이 발현되고 알파바이러스 레플리콘이 생성되고 알파바이러스 구조 단백질의 입자에 의해 팩키징된 알파바이러스 레플리콘을 함유하는 ARP가 형성되게 하는 조건 하에서 벡터에 의해 형질감염된 숙주 세포를 생장시킴으로써 생성된다. 일 구체예에서, 본 발명은 알파바이러스 비-구조 단백질 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 적어도 하나의 관심 있는 유전자를 포함하는 벡터, 및 적어도 하나의 알파바이러스 단백질을 각각 코딩하는 적어도 하나의 벡터를 적합한 숙주 세포 내로 공-형질감염시키는 단계, 및 ARP 형성을 허용하는 조건 하에서 상기 알파바이러스 단백질을 발현시키는 단계를 포함하는, ARP의 제조 방법을 포함한다. 다른 구체예에서, 진핵생물 세포는 효모, 곤충, 양서류, 조류 또는 포유동물 세포로 구성된 군으로부터 선택된다. 적절한 생장 조건의 선택은 당분야에서 통상의 기술을 가진 자의 기술 내에 있다.

[0118] 본 발명의 ARP를 생성하는 세포를 생장시키는 방법은 회분 세포 배양 기법, 유가 세포 배양 기법, 연속 세포 배양 기법 및 관류 세포 배양 기법을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 일 구체예에서, 알파바이러스 레플리콘을 코딩하는 벡터 및 캡시드를 코딩하는 폴리펩티드를 포함하는 벡터, 및 외피 단백질, 예컨대, CHIKV 또는

VEEV로부터 유래한 외피 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 공-형질감염시킨 세포를 생물반응기 또는 발효 챔버 내에서 생장시키는데, 이러한 반응기 또는 챔버 내에서 세포는 증식하고 정제 및 단리를 위한 단백질(예를 들면, 재조합 단백질)을 발현한다. 전형적으로, 세포 배양은 멸균 제어된 온도 및 대기 조건 하에서 수행된다. 생물반응기는 세포를 배양하는 데 사용되는 챔버이고, 이 챔버 내의 환경적 조건, 예컨대, 온도, 대기, 교반 및/또는 pH는 모니터링될 수 있다. 일 구체예에서, 생물반응기는 스테인레스 강철 챔버이다. 다른 구체예에서, 상기 생물반응기는 사전멸균된 플라스틱 주머니(예를 들면, Cellbag.RTM., 웨이브 바이오텍(Wave Biotech), 뉴저지주 브리지워터 소재)이다. 다른 구체예에서, 상기 사전멸균된 플라스틱 주머니는 약 50 ℓ 내지 1000 ℓ 주머니이다.

[0119] ARP는 그의 무결성을 보존하는 방법, 예컨대, 구배 원심분리, 예를 들면, 염화세슘, 수크로스 및 이오딕사놀(iodixanol)뿐만 아니라, 예를 들면, 이온 교환 및 겔 여과 크로마토그래피를 포함하는 표준 정제 기법도 이용함으로써 단리된다.

[0120] 하기 내용은 본 발명의 ARP를 어떻게 제조할 수 있고 단리할 수 있고 정제할 수 있는지의 일례이다. 당분야에서 숙련된 자는 ARP를 제조하고 정제하는 데 이용될 수 있는 추가 방법이 있다는 것을 인식한다. 따라서, 본 발명은 본원에 기재된 방법으로 한정되지 않는다.

[0121] 일반적으로, 본 발명의 ARP의 생성은 (감염되지 않은) 포유동물 세포(예를 들면, 인간 배아 신장(293T) 세포) 또는 Sf9 세포를 진탕기 플라스크 내로 시딩하고 세포로 하여금 증폭하게 하고 세포가 생장하고 증식함에 따라(예를 들면, 125 mℓ 플라스크부터 50 ℓ 웨이브(Wave) 주머니까지) 규모를 확장함으로써 달성된다. 적절한 세포주를 위해 세포를 생장시키는 데 사용되는 배지를 제제화한다(바람직하게는 무혈청 배지, 예를 들면, 곤충 배지 ExCell-420, JRH). 그 다음, 가장 효율적인 감염 다중도(예를 들면, 세포당 약 1 내지 약 3 플라크 형성 유닛)에서 적절한 벡터(예를 들면, 포유동물 발현 벡터 또는 SF 세포의 경우 재조합 바큘로바이러스)로 세포를 형질감염시키거나 감염시킨다. 폴리뉴클레오티드들 또는 이들의 부분을 세포에서 발현시키는데, 이들은 상기 세포에서 ARP로 자가조립하고, 감염 후 대략 24시간 내지 72시간(hpi)에서 세포로부터 분비된다. 통상적으로, 형질감염 또는 감염은 세포가 생장의 중간 대수기에서 있을 때(4.x10<6>개 내지 8.x10<6>개 세포/mℓ) 가장 효율적이고 적어도 약 90% 생존가능하다. 추가로, 형질감염된 세포를 세포 배양에서 높은 pH 조건(pH > 7.2, 예를 들면, pH 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7 또는 8.8 이상)에 노출시켜 ARP 생성을 증가시킬 수 있다.

[0122] 세포 배양 배지에서 ARP의 수준이 최대치에 가까울 때, 그러나 광범위한 세포 용해 전에, 본 발명의 ARP를 감염 후 대략 48시간 내지 120시간에서 수확한다. 수확 시 세포 밀도 및 생존율은 염료 배제 어세이에 의해 확인될 때 적어도 20% 생존율로 약 $0.5x10^6$개 세포/mℓ 내지 약 $1.5x10^6$개 세포/mℓ일 수 있다. 그 다음, 배지를 제거하고 정화한다. NaCl을 배지에 약 0.4 내지 약 1.0 M, 바람직하게는 약 0.5 M의 농도로 첨가하여 ARP 응집을 피할 수 있다. 본 발명의 ARP를 함유하는 세포 배양 배지로부터의 세포 및 세포 잔해물의 제거는 사전멸균된 일회용 중공형 섬유 0.5 또는 1.00 ㎛ 필터 카트리지 또는 유사한 디바이스를 사용한 접선 유동 여과(TFF)에 의해 달성될 수 있다.

[0123] 추가로, ARP를 정제 동안 높은 pH 조건(pH > 7.2, 예를 들면, pH 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7 또는 8.8 이상)에 노출시켜 ARP 생성을 증가시킬 수 있다.

[0124] 그 다음, 사전멸균된 일회용 500,000 분자량 컷오프 중공형 섬유 카트리지를 사용한 한외여과로 정화된 배양 배지 중의 ARP를 농축한다. 0.5 M NaCl을 함유하는 10배 부피 pH 7.0 내지 8.0 인산염 완충 식염수(PBS)에 대해 상기 농축된 ARP를 정용여과하여 잔류 배지 성분을 제거할 수 있다.

[0125] 농축되고 정용여과된 ARP를, 약 4℃ 내지 약 10℃에서 18시간 동안 6,500 x g에서 원심분리함으로써, 0.5 M NaCl을 가진 pH 7.2 PBS 완충제 중의 20% 내지 60% 불연속 수크로스 구배 상에서 더 정제할 수 있다. 통상적으로, 상기 구배로부터 모아질 수 있고 저장될 수 있는 ARP는 약 30% 수크로스와 약 40% 수크로스 사이 또는 계면(20% 및 60% 단계 구배)에서 구별되는 가시적 밴드를 형성할 것이다. 이 생성물은 정제 과정에서 다음 단계를 위한 준비에서 200 mM의 NaCl을 포함하도록 희석될 수 있다. 이 생성물은 ARP를 함유하고 온전한 바큘로바이러스 입자를 함유할 수 있다.

[0126] ARP의 추가 정제는 음이온 교환 크로마토그래피 또는 44% 등밀도 수크로스 쿠션 원심분리에 의해 달성될 수 있다. 음이온 교환 크로마토그래피에서, 수크로스 구배로부터의 샘플(상기 참조)을, 음이온과 함께 배지를 함유하는 컬럼(예를 들면, 매트릭스 프락토겔(Matrix Fractogel) EMD TMAE)에 로딩하고, 다른 오염물질(예를

들면, 바큘로바이러스 및 DNA/RNA)로부터 ARP를 분리할 수 있는 염 구배(약 0.2 M 내지 약 1.0 M의 NaCl)를 통해 용출한다. 수크로스 쿠션 방법에서, ARP를 포함하는 샘플을 44% 수크로스 쿠션에 첨가하고 30,000 g에서 약 18시간 동안 원심분리한다. ARP는 44% 수크로스의 상부에서 밴드를 형성하는 반면, 바큘로바이러스는 하부에서 침전하고, 다른 오염 단백질은 상부에서 0% 수크로스 층에 남아있다. ARP 피크 또는 밴드가 모아진다.

[0127] 원하는 경우, 온전한 바큘로바이러스를 불활성화시킬 수 있다. 불활성화는 화학적 방법, 예를 들면, 포르말린 또는 .베타.-프로피오락톤(BPL)에 의해 달성될 수 있다. 온전한 바큘로바이러스의 제거 및/또는 불활성화도 주로 상기 예시된 바와 같이 당분야에서 알려진 선택적 침전 및 크로마토그래피 방법을 이용함으로써 달성될 수 있다. 불활성화 방법은 ARP를 함유하는 샘플을 약 25℃ 내지 약 27℃에서 3시간 동안 0.2%의 BPL에서 항온처리하는 단계를 포함한다. 바큘로바이러스는 ARP를 함유하는 샘플을 3일 동안 4℃에서 0.05% BPL에서 항온처리한 후, 1시간 동안 37℃에서 항온처리함으로써 불활성화될 수도 있다.

[0128] 불활성화/제거 단계 후, ARP를 포함하는 생성물을 또 다른 정용여과 단계를 통해 런닝시켜 불활성화 단계로부터의 임의의 시약 및/또는 임의의 잔류 수크로스를 제거할 수 있고 ARP를 원하는 완충제(예를 들면, PBS) 내에 넣을 수 있다. ARP를 포함하는 용액을 당분야에서 알려진 방법(예를 들면, 멸균 여과)으로 멸균할 수 있고 냉장고 또는 냉동고에서 저장할 수 있다.

[0129] 상기 기법들을 다양한 규모에 걸쳐 실시할 수 있다. 예를 들면, T-플라스크, 진탕 플라스크, 스피너 병(spinner bottle)부터 산업적 규모의 생물반응기까지. 생물반응기는 스테인레스 강철 탱크 또는 사전멸균된 플라스틱 주머니(예를 들면, 뉴저지주 브리지워터 소재의 웨이브 바이오텍에 의해 시판되는 시스템)을 포함할 수 있다. 당분야에서 숙련된 자는 어떤 것이 그들의 목적에 가장 바람직한지를 알 것이다.

[0130] 본원에 기재된 바와 같이, 원하는 숙주에게 투여할 때, 본 발명의 ARP는 구조 단백질이 유래한 알파바이러스에 의해 정상적으로 감염된 세포에 의해 흡수된다. 레플리콘에 함유된 관심 있는 유전자는 ARP 도입 시 세포 내로 내재화된다. 이 성질은 본원에 기재된 ARP가 관심 있는 유전자를 원하는 세포 내로 전달할 수 있기 때문에 유전자의 전달 비히클로서 상기 ARP의 사용을 용이하게 한다.

[0131] 천연 알파바이러스 게놈은 비-구조 복제효소(replicase) 폴리단백질 이외에 바이러스 구조 단백질을 코딩하는 반면, 알파바이러스 레플리콘은 알파바이러스 구조 단백질을 코딩하지 않는다. 따라서, 알파바이러스 레플리콘은 세포에서 그 자신의 게놈 RNA 카피의 생성을 유발할 수 있으나, RNA 함유 비리온의 생성을 유발할 수 없다. 이 비리온을 생성하지 못한다는 것은 상기 레플리콘이 야생형 알파바이러스와 달리 그 자신을 감염성 형태로 영속시킬 수 없다는 것을 의미한다. 야생형 바이러스에서 영속을 위해 필요한 알파바이러스 구조 단백질들은 레플리콘에 존재하지 않고, 이들은 적어도 하나의 관심 있는 유전자에 의해 대체되므로, 하위게놈 전사체는 구조적 알파바이러스 구조 단백질보다는 오히려 관심 있는 단백질을 코딩한다.

[0132] 따라서, 일부 구체예들에서, ARP는 대상체에게 전달될 필요가 있는 치료제(들) 또는 진단제(들), 예를 들면, 조영제, 핵산 서열(siRNA 및 microRNA를 포함함), 방사성핵종, 호르몬, 펩티드, 항바이러스제, 항종양/화학요법제, 세포 생장 조절제, 세포 생장 억제제, 사이토카인, 항원, 면역증강제 및 독소일 수 있거나 이들을 코딩할 수 있는 관심 있는 유전자를 포함한다. 바이러스 구조 단백질의 입자 내에 팩키징된 레플리콘은 ARP의 안정성에 불리한 영향을 미치지 않아야 한다. 이것은 소정의 관심 있는 유전자를 함유하는 ARP를 생성하고 ARP 안정성에 대한 이의 효과(존재하는 경우)를 평가함으로써 확인될 수 있다.

[0133] 따라서, 본 발명은 관심 있는 유전자를 세포 내로 도입하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 관심 있는 유전자는 알파바이러스 레플리콘에 함유되고, 알파바이러스 레플리콘은 알파바이러스 구조 단백질의 입자에 의해 팩키징된다. 관련 구체예들에서, ARP를 세포와 접촉시킨다. 관련 구체예들에서, ARP를 세포 내로 들어가게 함으로써, 관심 있는 유전자를 세포 내로 전달한다.

[0134] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료한다", "치료하는", "치료" 등은 장애 및/또는 이와 관련된 증상을 감소시키거나 호전시키는 것을 지칭한다. 불가능하지는 않을지라도, 장애 또는 상태의 치료는 장애, 상태 또는 이와 관련된 증상이 완전히 제거될 것을 요구하지 않는다는 것을 인식할 것이다.

[0135] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "예방한다", "예방하는", "예방", "예방적 치료" 등은 장애 또는 상태를 갖지 않으나 장애 또는 상태를 발생시킬 위험에 있거나 발생시키기 쉬운 대상체에서 장애 또는 상태를 발생시킬 확률을 감소시키는 것을 지칭한다.

[0136] 관심 있는 유전자는 항원을 코딩하는 유전자일 수 있다. 본 발명의 ARP는 액체 용액 또는 현탁액으로서 주

사가능한 형태로 제조될 수 있다. 주사에 적합한 고체 형태도 유화액으로서 제조될 수 있거나, 리포좀 내에 캡슐화된 ARP를 사용함으로써 제조될 수 있다. 백신 항원은 통상적으로 담체를 제공받는 대상체에게 유해한 항체의 생성을 유도하지 않는 임의의 담체를 포함하는 약학적으로 허용가능한 담체와 조합된다. 적합한 담체는 전형적으로 느리게 대사되는 큰 거대분자, 예컨대, 단백질, 다당류, 폴리젖산, 폴리글리콜산, 중합체성 아미노산, 아미노산 공중합체, 지질 응집체 및 불활성 바이러스 입자를 포함한다. 이러한 담체는 당분야에서 숙련된 자에게 잘 알려져 있다. 이 담체는 면역증강제로서도 작용할 수 있다.

[0137] 본원에 기재된 ARP는 면역증강제(예를 들면, Ribi)와 함께 투여될 수 있다. 면역증강제는 백신 효과를 향상시키는 면역자극제이다. 원하는 경우, 하나 이상의 알파바이러스 폴리펩티드, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 ARP는 관심 있는 항원에 대해 생성된 면역 반응의 효과를 향상시키는 면역증강제와 함께 투여된다. 효과적인 면역증강제는 알루미늄 염, 예컨대, 수산화알루미늄 및 인산알루미늄, 뮤라밀 펩티드, 세균 세포벽 성분, 사포닌 면역증강제, 및 조성물의 효과를 향상시키기 위한 면역자극제로서 작용하는 다른 물질을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0138] 면역원성 조성물, 즉 본원에 기재된 ARP, 약학적으로 허용가능한 담체 및 면역증강제는 전형적으로 희석제, 예컨대, 물, 식염수, 글리세롤, 에탄올도 함유한다. 보조 물질, 예컨대, 습윤화제 또는 유화제, pH 완충 물질 등도 존재할 수 있다. 단백질은 중성 또는 염 형태로서 백신으로 제제화될 수 있다. 면역원성 조성물은 전형적으로 주사에 의해 비경구 투여되고; 이러한 주사는 피하 또는 정맥내 주사일 수 있다. 추가 제제는 다른 형태의 투여, 예컨대, 좌약 또는 경구 투여에 적합하다. 경구 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 환제, 캡슐 또는 지속 방출 제제로서 투여될 수 있다.

[0139] 면역원성 조성물은 용량 제제와 잘 맞는 방식으로 투여된다. 면역원성 조성물은 면역학적 유효량의 본원에 기재된 ARP 및 다른 앞서 언급된 성분을 포함한다. 면역학적 유효량은 감염의 치료 또는 예방에 효과적인 단회 용량, 또는 다회 용량 스케쥴로 투여되는 조성물을 의미한다. 투여되는 용량은 치료되는 대상체, 대상체의 건강 및 물리적 상태, 항체를 생성하는 대상체의 면역 시스템의 능력, 원하는 보호 정도 및 다른 관련 요인에 따라 달라질 것이다. 요구된 활성 성분의 정확한 양은 의사의 판단에 의해 좌우될 것이나, 전형적으로 용량당 5 ㎍ 내지 250 ㎍의 항원일 것이다.

[0140] 약학 조성물 및 투여

[0141] 본 발명은 본원에 기재된 ARP를 포함하는 약학 조성물을 특징으로 한다. 본원에서 유용한 약학 조성물은 조성물을 제공받는 척추동물에게 유해한 면역 반응의 생성을 스스로 유도하지 않고 과도한 독성 없이 투여될 수 있는 임의의 약제 및 본 발명의 ARP를 포함하는, 임의의 적합한 희석제 또는 부형제를 포함하는 약학적으로 허용가능한 담체를 함유한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약학적으로 허용가능한"은 연방정부 또는 주 정부의 규제 관청에 의해 승인되었거나, 포유동물, 보다 구체적으로 인간에서의 사용에 대해 미국 약전, 유럽 약전 또는 다른 일반적으로 인정받는 약전에 나열되어 있다는 것을 의미한다. 이 조성물은 척추동물에서 보호 면역 반응을 유도하기 위한 백신 및/또는 항원성 조성물로서 유용할 수 있다.

[0142] 약학적으로 허용가능한 담체는 식염수, 완충 식염수, 덱스트로스, 물, 글리세롤, 멸균 등장성 수성 완충제 및 이들의 조합을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및 다른 부형제의 철저한 논의는 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co. N.J. current edition))에 제공되어 있다. 제제는 투여 방식에 잘 맞아야 한다. 바람직한 구체예에서, 제제는 인간에게의 투여에 적합하고, 바람직하게는 멸균 비-미립자 및/또는 비-발열성 제제이다.

[0143] 조성물은 원하는 경우 소량의 습윤화제, 유화제 또는 pH 완충제도 함유할 수 있다. 조성물은 고체 형태, 예컨대, 재구성에 적합한 동결건조된 산제, 액체 용액, 현탁액, 유화액, 정제, 환제, 캡슐, 지속 방출 제제 또는 산제일 수 있다. 경구 제제는 표준 담체, 예컨대, 약학 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 사카린나트륨, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등을 포함할 수 있다.

[0144] 일부 구체예들에서, ARP 조성물은 예를 들면, ARP 조성물의 양 및 농도를 표시하는 밀봉된 용기 내에 액체 형태로 공급된다.

[0145] 바람직하게는, 액체 형태의 ARP 조성물은 적어도 약 50 ㎍/㎖, 보다 바람직하게는 적어도 약 100 ㎍/㎖, 적어도 약 200 ㎍/㎖, 적어도 500 ㎍/㎖, 또는 적어도 1 mg/㎖로 기밀 밀봉된 용기 내에 공급된다.

[0146] 대안적으로, 백신 제제는 점적, 큰 입자 에어로졸(약 10 마이크론 초과) 또는 분무에 의해 상부 기도 내로 비내 투여되거나, 작은 입자 에어로졸(10 마이크론 미만) 또는 분무에 의해 하부 기도 내로 비내 투여된다. 상기

전달 경로들 중 임의의 전달 경로가 면역 반응을 야기할지라도, 비내 투여는 알파바이러스, 예를 들면, CHIKV 또는 VEEV를 포함하는 많은 바이러스들의 도입 부위에서 점막 면역을 이끌어낸다는 추가된 이점을 부여한다.

[0147] 따라서, 본 발명은 유효 용량의 ARP, 예를 들면, 알파바이러스(예를 들면, CHIKV 또는 VEEV)를 상기 제제에 첨가하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 감염 또는 이의 적어도 하나의 증상에 대한 면역을 유도하는 백신 또는 항원성 조성물을 제제화하는 방법도 포함한다.

[0148] 일부 경우, 단회 용량을 사용한 면역의 자극이 바람직하나, 원하는 효과를 달성하기 위해 추가 용량을 동일하거나 상이한 경로로 투여할 수도 있다. 예를 들면, 신생아 및 유아에서 충분한 수준의 면역을 이끌어내기 위해 다회 투여가 요구될 수 있다. 투여는 충분한 수준 또는 보호를 유지하기 위해 필요할 때 유년기 전체에 걸쳐 간격을 두고 계속될 수 있다.

[0149] 유사하게, 반복된 또는 심각한 감염에 특히 감염되기 쉬운 성인, 예를 들면, 건강 관리 종사자, 주간 보호 종사자, 어린 소아의 가족 구성원, 중장년, 및 손상된 심폐 기능 또는 면역 시스템을 가진 개체는 보호 면역 반응을 확립하고/하거나 유지하기 위해 다회 면역화를 요구할 수 있다. 유도된 면역의 수준은 예를 들면, 중화 분비 및 혈청 항체의 양을 측정함으로써 모니터링될 수 있고, 원하는 수준의 보호를 이끌어내고 유지하기 위해 필요할 때 용량을 조절할 수 있거나 백신접종을 반복할 수 있다.

[0150] 약학 제제의 용량은 예를 들면, 바이러스 특이적 면역글로불린의 혈청 역가를 측정하거나 혈청 샘플, 소변 샘플 또는 점막 분비물에서 항체의 억제 비를 측정함으로써 예방 또는 치료 면역 반응을 이끌어내기에 효과적인 용량을 먼저 확인함으로써 숙련된 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 상기 용량은 동물 연구로부터 결정될 수 있다. 백신의 효능을 연구하는 데 사용되는 동물의 비한정적 목록은 기니 피그, 햄스터, 흰담비, 친칠라, 마우스 및 목화나무 쥐, 및 비-인간 영장류를 포함한다. 대다수의 동물들은 감염제에 대한 천연 숙주가 아니나, 질환의 다양한 양상들의 연구에 여전히 기여할 수 있다. 예를 들면, 백신 후보, 예를 들면, 본 발명의 ARP를 상기 동물들 중 임의의 동물에게 투약하여, 유도된 면역 반응을 부분적으로 특징규명할 수 있고/있거나 임의의 중화 항체가 생성되었는지를 확인할 수 있다. 예를 들면, 마우스는 크기가 작고 그의 낮은 비용이 연구원들로 하여금 대규모로 연구를 수행할 수 있게 하기 때문에 많은 연구들이 마우스 모델에서 수행되었다.

[0151] 추가로, 숙련된 당업자는 인간 임상 연구를 수행하여 인간을 위한 바람직한 유효 용량을 결정할 수 있다. 이러한 임상 연구는 관용적이고 당분야에서 잘 알려져 있다. 사용될 정확한 용량은 투여 경로에 의해서도 좌우될 것이다. 유효 용량은 시험관내 또는 동물 시험 시스템으로부터 유도된 용량-반응 곡선으로부터 추정될 수 있다.

[0152] 마찬가지로 당분야에서 잘 알려진 바와 같이, 특정 조성물의 면역원성은 면역증강제로서 알려진, 면역 반응의 비-특이적 자극제의 사용에 의해 향상될 수 있다. 면역증강제는 알려지지 않은 항원에 대한 면역의 일반화된 증가를 촉진하기 위해 실험적으로 사용되어 왔다. 면역화 프로토콜은 오랜 세월 동안 반응을 자극하기 위해 면역증강제를 사용하였고, 그 결과 면역증강제는 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 잘 알려져 있다. 일부 면역증강제들은 항원이 제시되는 방식에 영향을 미친다. 예를 들면, 면역 반응은 단백질 항원이 명반에 의해 침전될 때 증가된다. 항원의 유화도 항원 제시의 지속을 연장시킨다. 모든 목적을 위해 전체적으로 참고로 본원에 포함된 문헌(Vogel et al., "A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2nd Edition)")에 기재된 임의의 면역증강제의 포함은 본 발명의 범위 내에서 예상된다.

[0153] 예시적 면역증강제는 완전 프로인트 면역증강제(사멸된 마이코박테리움 튜버큘로시스(Mycobacterium tuberculosis)를 함유하는 면역 반응의 비-특이적 자극제), 불완전 프로인트 면역증강제 및 수산화알루미늄 면역증강제를 포함한다. 다른 면역증강제는 GMCSP, BCG, 수산화알루미늄, MDP 화합물, 예컨대, thur-MDP 및 nor-MDP, CGP(MTP-PE), 지질 A 및 모노포스포릴 지질 A(MPL)를 포함한다. 2% 스쿠알렌/Tween-80 유화액 내에 세균으로부터 추출된 3종의 성분인 MPL, 트레할로스 디마이콜레이트(TDM) 및 세포벽 골격(CWS)을 함유하는 RIBI도 고려된다. MF-59, 노바좀(Novasomes).RTM., MHC 항원도 사용될 수 있다.

[0154] 본 발명의 ARP는 "면역 자극제"와 함께 제제화될 수도 있다. 이 자극제는 면역 시스템의 반응을 증가시키기 위한 신체 자신의 화학적 메신저(사이토카인)이다. 면역 자극제는 면역자극, 면역증강 및 전구염증 활성을 가진 다양한 사이토카인들, 림포카인들 및 케모카인들, 예컨대, 인터류킨(예를 들면, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); 성장 인자(예를 들면, 과립구-대식세포(GM) 콜로니 자극 인자(CSF)); 및 다른 면역자극 분자, 예컨대, 대식세포 염증성 인자, Flt3 리간드, B7.1; B7.2 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 면역자극

분자는 ARP와 동일한 제제로 투여될 수 있거나, 따로 투여될 수 있다. 단백질 또는 단백질을 코딩하는 발현 벡터를 투여하여 면역자극 효과를 생성할 수 있다. 따라서, 일 구체예에서, 본 발명은 면역증강제 및/또는 면역 자극제를 포함하는 항원성 제제 및 백신 제제를 포함한다.

[0155] 본 발명에 따르면, 상기 ARP를 포함하는 전달 시스템은 관심 있는 유전자를 진핵생물 세포의 세포질 내로 전달할 수 있음으로써, 암, 바이러스 감염, 신경학적 장애, 자가면역 질환, 이식편 거부, 및 일유전자성 또는 다유전자성 유전 질환을 치료할 수 있다.

[0156] 본 발명은 본원의 범위를 한정하기 위한 것이 아닌 하기 실시예와 관련하여 상세히 기재될 것이다.

[0157] **실시예 1**

[0158] VEEV 레플리콘 입자(VRP)의 구축

[0159] 개략적 절차는 도 2에 표시되어 있다.

[0160] 루시퍼라제를 발현하는 VEEV 레플리콘 플라스미드의 확립

[0161] 1) 전체 길이 VEEV TC83 비-구조 단백질(nsp)1, nsp2, nsp3 및 nsp4 단편을 합성하였다(써모피셔(ThermoFisher)).

[0162] 유사하게, 레플리콘 구축물의 다양한 단편들에 상응하는 gblock을 다음과 같이 합성하였다(IDT).

[0163] 2) VEEV gblock1 - VEEV CA 유전자의 ATG까지 ClaI-RSVp-5' UTR-nsp1(bp1-470)-RsrII-ApaI-26Sp-sgRNA. 이 단편은 5' 말단에서 pBR322 골격 플라스미드와 36 bp 중첩을 가졌다. 이것은 단편 #1이다.

[0164] 3) VEEV gblock2 - 이 단편은 ATG 시작 코돈까지 ApaI 부위에서 시작하는 VEEV gblock1과 64 bp 중첩을 가졌다. 이것 다음에 Nano 루시퍼라제 ORF(프로메가(Promega)) 및 VEEV 3' UTR의 처음 72개 염기가 있었다.

[0165] 4) 단편 #2의 클로닝 - 하기 표에 나타낸 올리고머들을 사용한 중첩 연장 PCR로 VEEV gblock2, 전체 길이 VEEV 3' UTR 및 VEEV 폴리A 신호($A_{(n=55)}$)를 먼저 조립하였다:

표 1

[0166]

프라이머 명칭	서열 5′ → 3′
VEEV_gblock2_정방향	tcattcagctacctgagaggg (서열번호 : 7)
VEEV_gblock2_역방향	aaataaaaattttaaggcggcatgc (서열번호 : 8)
VEEV_올리고1_정방향	ttaaaatttttatttttatttttctttttctttttccgaat cggattttgtttttaatatttc (서열번호 : 9)
VEEV_올리고2_역방향	CATCAATGTATCTTATCATGTCTGtcgcgaTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTgaaatattaaaaaca (서열번호 : 10)

[0167] VEEV_올리고2는 pBR322 골격 플라스미드와 15 bp 중첩을 가진다.

[0168] 5) 그 다음, 깁슨(Gibson) 조립을 이용하여 VEEV gblock1(단편 #1), 단편 #2 및 pBR322 골격(ClaI 및 NruI-HF에 의해 절단됨)을 조립하여 pBR322-RSVp-RsrII-ApaI-26Sp-sgRNA-NanoLuc-A(n=55)-SV40 pA 골격 구축물(BB)을 수득하였다. 이 골격 구축물은 전체 길이 TC83 nsp1-4 단편을 결여하였다.

[0169] 6) RsrII 및 ApaI 제한 부위를 함유하는 프라이머를 사용하여 1)에서 수득된 합성된 써모 플라스미드로부터 nsp1-4 단편(bp 470 내지 7461)을 증폭하였다 - i) 5'-ccggccCGGACCGacaagtctctatcacc-3'(서열번호 11, 정방향 프라이머) 및 ii) 5'-ggccggGGGCCCctctcaggtagctgaatg-3'(서열번호 12, 역방향 프라이머). RsrII 및 ApaI 부위를 사용하여 이 PCR 증폭된 nsp 단편을 BB 골격 플라스미드 내로 클로닝하여 전체 길이 VEEV TC83 레플리콘

구축물을 수득하였다(도 3)

[0170] 헬퍼 플라스미드

[0171] VEEV TC83 캡시드를 코딩하는 헬퍼 플라스미드 구축물들은 도 4 및 5에 제시되어 있다. 상기 구축물들은 각각 야생형 VEEV 캡시드 단백질(서열번호 1) 및 NLS 내에 돌연변이를 가진 VEEV 캡시드(K64N, 서열번호 2)를 발현한다.

[0172] 본원에서 사용된 VEEV TC83 당단백질 E3-E2-6K-E1을 발현하는 헬퍼 플라스미드 구축물들은 도 6 및 7에 제시되어 있다. 상기 구축물들은 각각 야생형 VEEV TC83 당단백질 E3-E2-6K-E1(서열번호 3) 및 E3 변형된 E3-E2-6K-E1(E3 RKRR의 말단에서 푸린 부위가 SGGGS로 대체됨, 서열번호 4)을 발현한다.

[0173] 세포 배양 및 공-형질감염

[0174] 293T 세포를 6웰 플레이트에서 10% FBS, 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 완전 DMEM에 시딩하였다. PEI를 이용하여 캡시드를 코딩하는 헬퍼 플라스미드 및 당단백질 E1-6K-E2-E3을 코딩하는 헬퍼 플라스미드(1.7 ㎍의 각각의 플라스미드)와 함께, nsp1-4 단편을 함유하거나(VR)(서열번호 5) 결여하는(BB) 동등한 양의 VEEV RSVp-NLuc 구축물로 상기 세포를 공-형질감염시켰다. 헬퍼 플라스미드의 조합은 (서열번호 1 및 3), (서열번호 1 및 4), (서열번호 2 및 3) 또는 (서열번호 2 및 4)이었다. 세포를 37℃에서 약 3시간 동안 형질감염 혼합물과 함께 항온처리한 후, 형질감염 혼합물을 제거하였고, 세포를 1X PBS로 세척하였고, 새로 만든 DMEM을 첨가하였다. (형질감염 후) 48시간 또는 72시간에서 팩키징된 바이러스 레플리콘 입자(VRP)를 수확하였다.

VRP를 수확하기 위해, 세포 배양물을 4℃에서 5분 동안 1200 rpm에서 원심분리하여 임의의 세포 잔해물을 펠렛화함으로써 형질감염된 세포의 배양 상청액을 수득하였다. 0.45 ㎛ 필터를 통해 상기 상청액을 여과하였다. 수확된 VRP를 4℃ 또는 -80℃에서 저장하였다.

[0175] **실시예 2**

[0176] VEE 바이러스 레플리콘 입자(VRP)로의 VEEV 레플리콘의 팩키징 능력의 확인

[0177] 감염 및 루시퍼라제 어세이

[0178] 개략적 프로토콜은 도 8에 표시되어 있다.

[0179] 293T 세포를 웰당 대략 10,000개 세포의 밀도로 96웰 플레이트에서 완전 DMEM에 시딩하였다. 세포를 37℃에서 수확된 VRP의 비희석물 또는 2배 연속 희석물로 감염시켰다. 감염 후 14시간(hpi)에서, VRP를 제거하였고, 세포를 PBS로 세척하였고, 새로 만든 DMEM을 웰에 첨가하였다. 세포를 더 항온처리하였고 감염 후 24시간, 48시간 및 72시간에서 루시퍼라제 어세이를 위해 수확하였다. 동등한 양의 감염된 세포 및 Nano-Glo 루시퍼라제 어세이 시스템(프로메가)을 백색 바닥 불투명 96웰 플레이트(코스타(Costar))에 첨가함으로써 루시퍼라제 어세이를 수행하였다. Bio-Tek 시너지 HTX 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 루시퍼라제 활성을 즉시 측정하였다.

[0180] 결과

[0181] 결과는 도 9에 제시되어 있다. VRP(VR)에 의해 감염된 세포에서 감염 후 24시간만큼 빠른 시간에 루시퍼라제 발현이 확인되었다. nsp1-4를 결여하는 골격 구축물(BB)에 의해 감염된 세포는 루시퍼라제를 거의 발현하지 않았다.

[0182] **실시예 3**

[0183] 신규 VEEV 레플리콘 구축물

[0184] 다양한 "관심 있는 유전자"를 도입할 수 있도록 다중 클로닝 부위(MCS)를 도입함으로써 신규 VEEV TC83 레플리콘 플라스미드 구축물을 제조하였다. 개략적 프로토콜은 도 10에 제시되어 있다. 상기 구축물은 도 11 및 서열번호 6에 제시되어 있다. 도 11의 구축물에서, 루시퍼라제를 코딩하는 뉴클레오티드를 관심 있는 유전자로서 도입한다. 상기 플라스미드 내의 프로모터를 감염되는 세포를 고려하여 선택할 수 있다.

[0185] **실시예 4**

[0186] 캡시드 및/또는 E3-E2-6K-E1 내에 돌연변이를 갖거나 갖지 않고 관심 있는 유전자를 가진 VRP의 제조

[0187] 이 실시예에서, 관심 있는 유전자를 함유하는 VEEV 레플리콘 플라스미드를 실시예 1과 유사한 방식으로 VEEV 캡

시드 헬퍼 플라스미드 및 VEEV E3-E2-6K-E1 당단백질 헬퍼 플라스미드와 함께 293T 세포에 공-형질감염시켰다. 루시퍼라제, GFP, IKK 또는 JNK2를 코딩하는 유전자를 관심 있는 유전자로서 사용하였다.

[0188] 하기 플라스미드들을 사용하였다:

[0189] i-1) VEEV CT83 야생형 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 또는

[0190] i-2) NLS 내에 돌연변이(K64N)를 가진 VEEV CT83 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 또는

[0191] ii-1) 야생형 VEEV CT83 E3-E2-6K-E1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 또는

[0192] ii-2) E3 내의 푸린 부위에서 돌연변이를 가진 VEEV CT83 E3-E2-6K-E1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 및

[0193] iii) VEEV CT83 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 루시퍼라제, GFP, IKK 또는 JNK2를 코딩하는 관심 있는 유전자를 포함하는 플라스미드.

[0194] 공-형질감염

[0195] 관심 있는 유전자를 포함하는 VEEV TC83 레플리콘 플라스미드, VEEV 캡시드(야생형 또는 돌연변이)를 코딩하는 헬퍼 플라스미드 및 E3-E2-6K-E1(야생형 또는 돌연변이)을 코딩하는 헬퍼 플라스미드로 293T 세포를 공-형질감염시켰다. 상기 3개의 플라스미드들(1 ㎍의 캡시드, 1 ㎍의 E3-E2-6K-E1 및 10 ㎍의 관심 있는 유전자 함유 VEEV 레플리콘)을 (PEI 방법으로) 293T 세포에 형질감염시켰고, 세포를 4일 내지 7일 동안 항온처리하였다. 그 다음, 상청액으로부터 VRP를 수확하였고 옵티프렙(optiprep) 밀도 침강으로 정제하였다.

[0196] 제1 항체(1:2000)로서 항-VEEV 항체(ATCC)를 사용하고 제2 항체(1:4000)로서 항-마우스 IgG를 사용하여 웨스턴 블롯팅으로 정제된 VRP를 확인하였다. 하기 플라스미드들을 사용함으로써 수득된 VRP의 결과는 도 12에 제시되어 있다:

[0197] i) NLS 내에 돌연변이(K64N)를 가진 VEEV CT83 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드,

[0198] ii) 야생형 VEEV CT83 E3-E2-6K-E1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 및

[0199] iii) VEEV CT83 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 또한 GFP, IKK 또는 JNK2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드.

[0200] **실시예 5**

[0201] 하기 벡터들을 사용함으로써 실시예 4에서 수득된 VRP를 사용하였다:

[0202] i) NLS 내에 돌연변이(K64N)를 가진 VEEV CT83 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드,

[0203] ii) 야생형 VEEV CT83 E3-E2-6K-E1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 및

[0204] iii) VEEV CT83 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 또한 IKK 또는 JNK2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드.

[0205] 293T 세포를, IKK 또는 JNK2 유전자를 함유하는 VRP로 감염시켰다. 293T 세포에의 VRP의 감염을 실시예 2와 동일한 방식으로 수행하였다.

[0206] VRP에 의해 감염된 293T 세포에서의 IKK의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다. IKK 발현 벡터 플라스미드로 형질감염시킨 293T 세포를 양성 대조군으로서 사용하였다. 제1 항체(1:500)로서 Rb 항-IKK 항체 (프로테인텍 (Proteintech))를 사용하고 제2 항체(1:4000)로서 HRP 표지된 항-RbIgG를 사용하는 웨스턴 블롯팅을 세포 용해물에 대해 수행하였다.

[0207] 결과는 도 13에 제시되어 있다. 도 13에서, 레인 1은 VRP에 의해 감염된 293T 세포를 보여준다. 레인 2는 양성 대조군, 즉 IKK 발현 벡터 플라스미드에 의해 형질감염된 세포를 보여준다. 이 도면에서 확인되는 바와 같이, VRP에 의해 감염된 293T 세포는 IKK 단백질을 발현하였다.

[0208] 감염된 293T 세포에서 레플리콘 삽입된 JNK2 유전자로부터의 JNK2의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다.

감염되지 않은 293T 세포를 양성 대조군으로서 사용하였다. 마우스 항-JNK2 항체(산타 크루즈(Santa Cruz))를 제1 항체(1:500)로서 사용하였고, HRP 표지된 항-마우스 IgG를 제2 항체(1:4000)로서 사용하였다. 결과는 도 14에 제시되어 있다. 관심 있는 유전자로서 JNK2를 가진 VRP에 의해 감염된 293T 세포는 JNK2를 발현하는 것으로 확인되었다.

[0209] **실시예 6**

[0210] 캡시드 NLS 내의 돌연변이의 효과

[0211] 하기 플라스미드들을 사용함으로써 실시예 4에서 수득된 두 유형의 VRP들을 사용하였다:

[0212] i-1) VEEV CT83 야생형 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 또는

[0213] i-2) NLS 내에 돌연변이(K64N)를 가진 VEEV CT83 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드,

[0214] ii) 야생형 VEEV CT83 E3-E2-6K-E1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 및

[0215] iii) VEEV CT83 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 또한 루시퍼라제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드.

[0216] 293T 세포를 실시예 2와 동일한 방식으로 VRP로 감염시켰다. 루시퍼라제 어세이를 실시예 2와 동일한 방식으로 수행하였다. 결과는 도 15에 제시되어 있다.

[0217] 이 도면에서, 대조군은 루시퍼라제 활성의 배경에 상응한다. NLS 내에 돌연변이를 가진 캡시드를 가진 VRP는 야생형 캡시드를 가진 VRP(118063)에 비해 훨씬 더 높은 루시퍼라제 활성(900556)을 보였다.

[0218] 데이터는 캡시드의 변형이 캡시드에서 변형을 갖지 않은 알파바이러스 레플리콘 입자에 비해 더 높은 수율 및 발현을 유발한다는 것을 표시하였다.

[0219] **실시예 7**

[0220] 하기 벡터들을 사용한 293T 세포의 공-형질감염에 의해 실시예 4에서 수득된 VEE 바이러스 레플리콘 입자(VRP)를 사용하였다:

[0221] i) NLS 내에 돌연변이(K64N)를 가진 VEEV CT83 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드.

[0222] ii) 야생형 VEEV CT83 E3-E2-6K-E1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드.

[0223] iii) VEEV CT83 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 GFP를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드.

[0224] 이로써 수득된 VRP를 사용하여 293T 세포를 실시예 2와 동일한 방식으로 감염시켰다. 대조군은 감염되지 않은 정상 세포를 보여준다. 상기 세포에서 GFP의 발현이 확인되었다. 결과는 도 16에 제시되어 있다.

[0225] **실시예 8**

[0226] 실시예 7에서 사용된 VEEV 레플리콘 입자와 동일한 VEEV 레플리콘 입자를 사용하였다. 대식세포 J774.A1 세포 및 골수 유래의 대식세포(BMDM)를 VRP로 감염시켰다. GFP를 코딩하는 관심 있는 유전자는 형질감염된 대식세포에서 발현되었다.

[0227] 상기 세포들 둘 다를 분극화되도록 48시간 동안 IL-4로 처리하였고 GFP 발현에 대해 분석하였다. 결과는 도 17에 제시되어 있다.

[0228] **실시예 9**

[0229] CT26 모델에 대한 생체내 효능 연구

[0230] 이 실시예의 개략적 프로토콜은 도 18에 제시되어 있다. 이 실시예에서 사용된 VRP는 하기 플라스미드들을 사용함으로써 실시예 4에서 제조된 VRP이었다:

[0231] i) NLS 내에 돌연변이(K64N)를 가진 VEEV CT83 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드,

[0232] ii) 야생형 VEEV CT83 E3-E2-6K-E1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 및

[0233] iii) VEEV CT83 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 인간 IκB 인산화효소(kinase)(IKK)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드.

[0234] 이 연구는 총 32마리의 동물들에 대해 4개의 아암(n=8)으로 구성된다. 동물들을 제공받았다. 종양 부피가 60 내지 100 mm^3에 도달한 때인 0일째 날에 동물들을 무작위배정하였고, 0일째 날에 10 mg/kg(BIWx3 및 IP)으로 G1: 비히클, G2: 항-PD-1 mAb, G3: VRP 및 G4: VRP와 항-PD-1 mAb의 조합물을 사용하여 투약을 시작할 것이다. 종양 성장을 치료의 시작 후 30일까지 모니터링하였다.

[0235] 군 1, 3 및 4의 경우, 0일째 날, 2일째 날, 4일째 날, 6일째 날, 8일째 날 및 10일째 날에 50 ㎕의 비히클 또는 비히클에 분산된 VRP를 마우스에게 종양내로 주사하였다. 0.3 ㎖ 인슐린 유형 주사기를 이용하여 VRP 또는 비히클을 우측 옆구리에서 종양 내로 투여하였다. 목적은 하나의 도입 점을 사용하되, 바늘을 안팎으로 움직임으로써 물질을 종양 전체에 분포시키는 것이었다.

[0236] 종양 크기의 측정을 주당 2회 수행하였다. 이 연구를 위한 인도적 종점은 3000 mm^3의 종양 부하 및/또는 20% 이상의 체중 손실이다. 각각의 군에서 모든 8마리의 동물들의 결과는 도 19에 제시되어 있다.

[0237] 데이터는 IKK를 코딩하는 유전자를 포함하는 VRP, 및 VRP와 항-PD-1 항체의 조합물이 대조군 및 항-PD-1 단일 면역요법에 비해 더 우수한 항-종양 효과를 나타내었다는 것을 표시하였다.

[0238] **실시예 10**

[0239] 하기 세트의 벡터들을 사용하여 실시예 4와 동일한 방식으로 키메라 알파바이러스 레플리콘 입자를 제조하였다.

[0240] 키메라 ARP 1

[0241] i) 야생형 CHIKV 37997 균주 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드,

[0242] ii) 야생형 CHIKV 37997 균주 E3-E2-6K-E1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 및

[0243] iii) VEEV CT83 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 GFP를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드.

[0244] 키메라 ARP 2

[0245] i) 야생형 CHIKV OPY-1 균주 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드,

[0246] ii) 야생형 CHIKV OPY-1 균주 E3-E2-6K-E1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 및

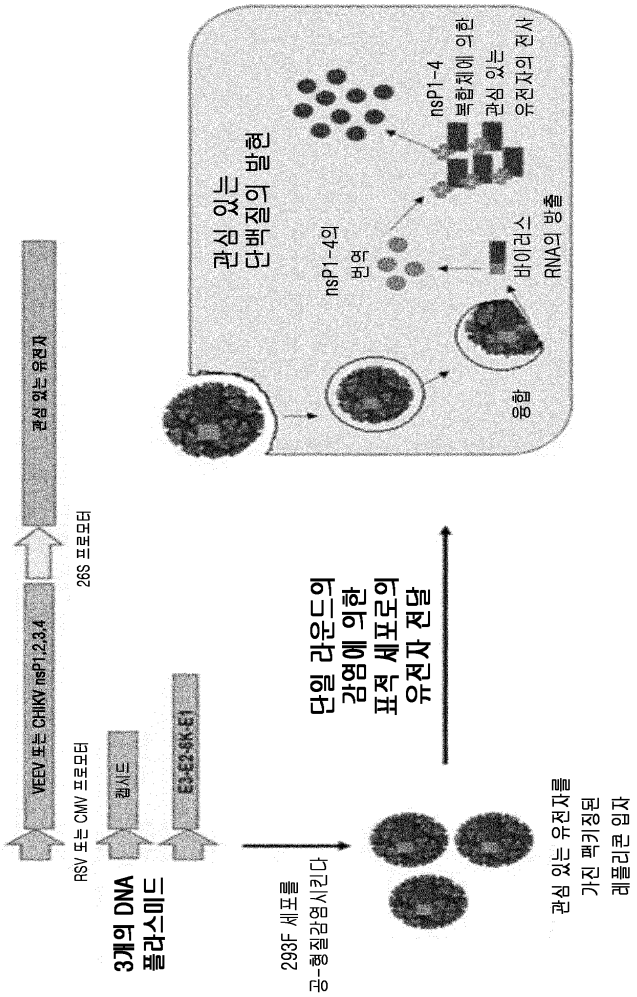
[0247] iii) VEEV CT83 nsp1, nsp2, nsp3 및 nsp4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 GFP를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드.

[0248] 수득된 ARP들을 실시예 1과 동일한 방식으로 정제하였다. 제1 항체로서 항-CHIKV 토끼 혈청(1:2000)을 사용하고 제2 항체로서 염소 항-토끼 IgG-HRP(1:4000)를 사용하여 웨스턴 블롯팅으로 정제된 키메라 ARP들을 확인하였다. 결과는 도 20에 제시되어 있다. 상기 키메라 ARP들 둘 다의 생성이 확인되었다.

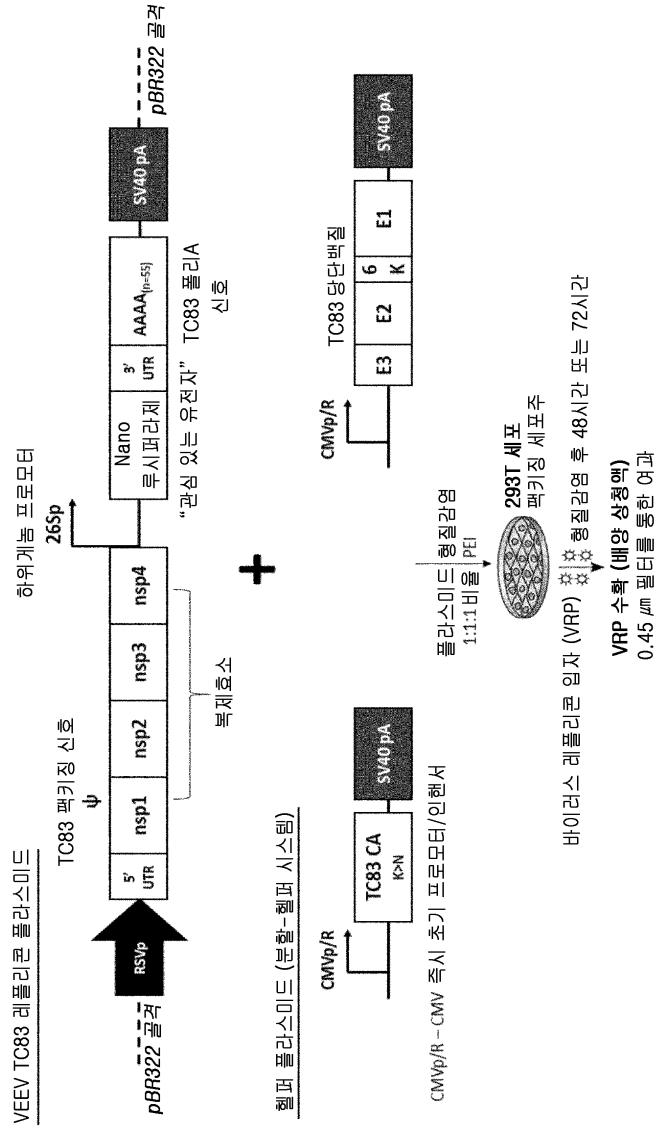
[0249] 293T 세포를, GFP를 코딩하는 상기 키메라 ARP들로 감염시켰다. 감염 후, 세포를 48시간 동안 항온처리하였고, GFP의 발현을 FACS 분석으로 확인하였다. 감염되지 않은 세포를 대조군으로서 사용하였다. 결과는 도 21에 제시되어 있다. 상기 ARP들에 의해 감염된 5.21% 및 4.07%의 세포들이 GFP를 발현하였는데, 이것은 상기 키메라 ARP들이 상기 세포에서 GFP 단백질(관심 있는 유전자는 GFP를 코딩하는 뉴클레오티드임)을 성공적으로 발현하였다는 것을 암시한다.

도면

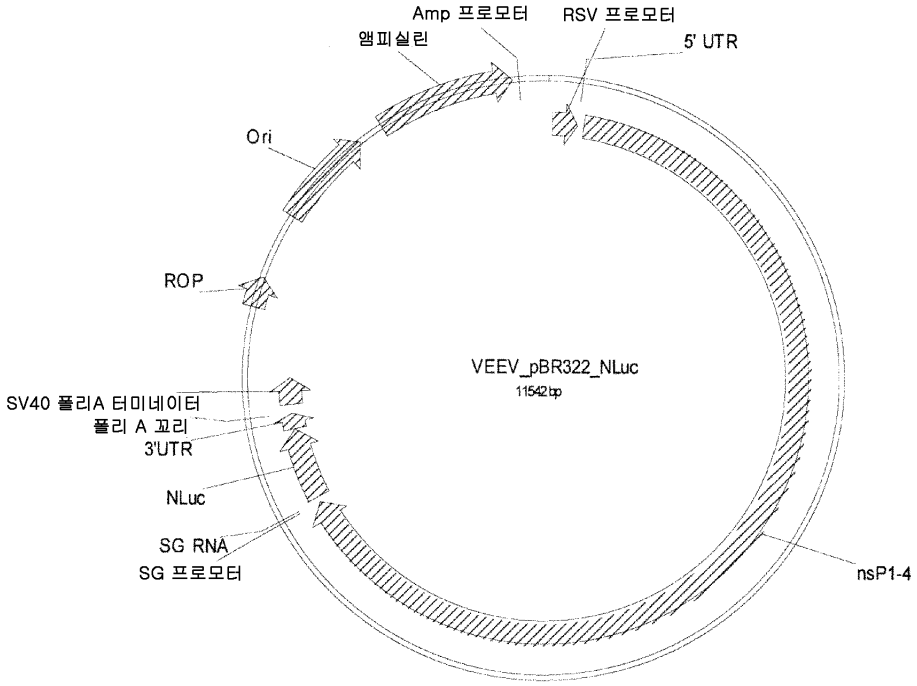
도면1


관심 있는 유전자
26S 프로모터
VEEV 또는 CHIKV nsP1,2,3,4
RSV 또는 CMV 프로모터
캡시드
E3-E2-6K-E1
3개의 DNA
플라스미드
293F 세포를
공-형질감염시킨다
관심 있는 유전자를
가진 픽키징된
레플리콘 입자
단일 라운드의
감염에 의한
표적 세포로의
유전자 전달
융합
바이러스
RNA의 방출
nsP1-4의
번역
nsP1-4
복합체에 의한
관심 있는
유전자의 전사
관심 있는
단백질의 발현

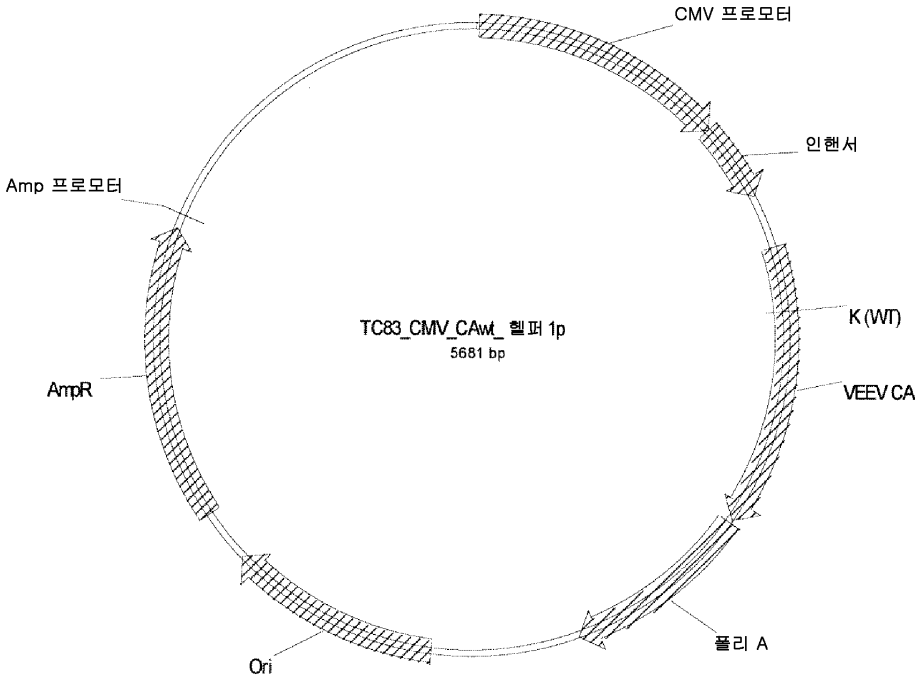
도면2


VEEV TC83 레플리콘 플라스미드
하위게놈 프로모터
26Sp
TC83 팩키징 신호
ψ
RSVp
5' UTR
nsp1
nsp2
nsp3
nsp4
Nano 루시퍼라제
3' UTR
AAAA(n=55)
SV40 pA
pBR322 골격
"관심 있는 유전자"
TC83 폴리A 신호
복제효소
헬퍼 플라스미드 (분할-헬퍼 시스템)
CMVp/R
TC83 CA K>N
SV40 pA
CMVp/R-CMV 즉시 초기 프로모터/인핸서
CMVp/R
TC83 당단백질
E3
E2
6K
E1
SV40 pA
플라스미드 1:1:1 비율
형질감염 PEI
293T 세포
팩키징 세포주
바이러스 레플리콘 입자 (VRP)
형질감염 후 48시간 또는 72시간
VRP 수확 (배양 상청액)
0.45 ㎛ 필터를 통한 여과

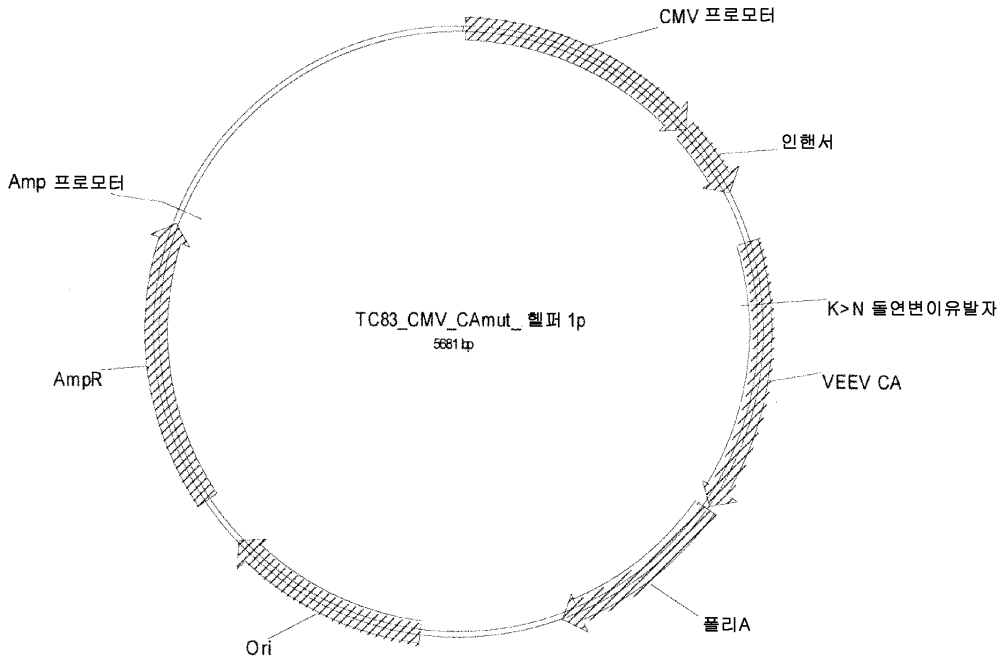
도면3


Amp 프로모터
앰피실린
RSV 프로모터
5' UTR
Ori
ROP
VEEV_pBR322_NLuc
11542bp
SV40 폴리A 터미네이터
폴리 A 꼬리
3'UTR
NLuc
SG RNA
SG 프로모터
nsP1-4

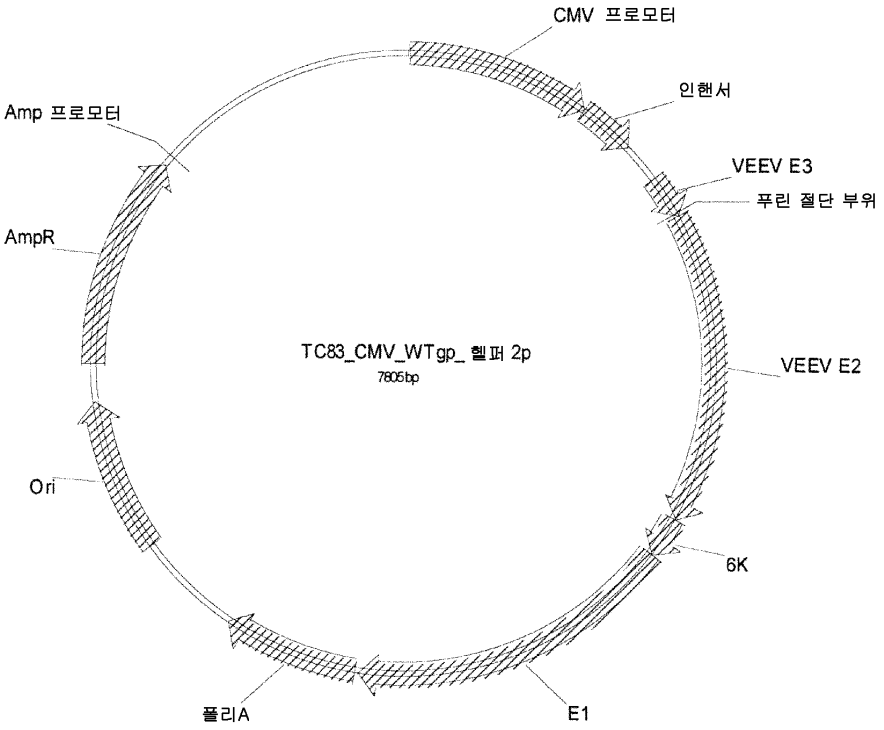
도면4


CMV 프로모터
인핸서
Amp 프로모터
K (WT)
TC83_CMV_CAwt_ 헬퍼 1p
5681 bp
AmpR
VEEV CA
폴리 A
Ori

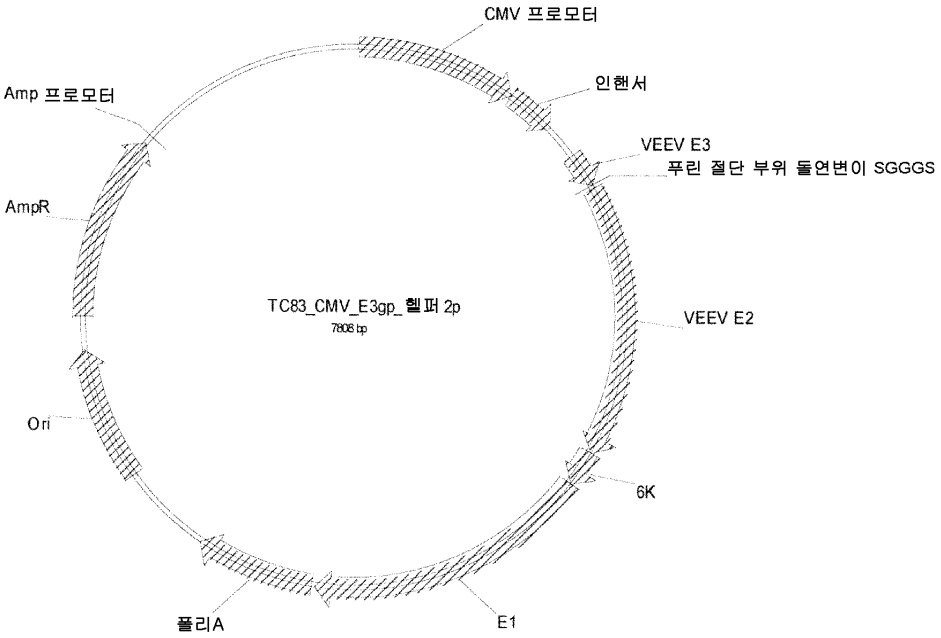
도면5


CMV 프로모터
인핸서
K>N 돌연변이유발자
VEEV CA
폴리A
Ori
AmpR
Amp 프로모터
TC83_CMV_CAmut_ 헬퍼 1p
5681bp

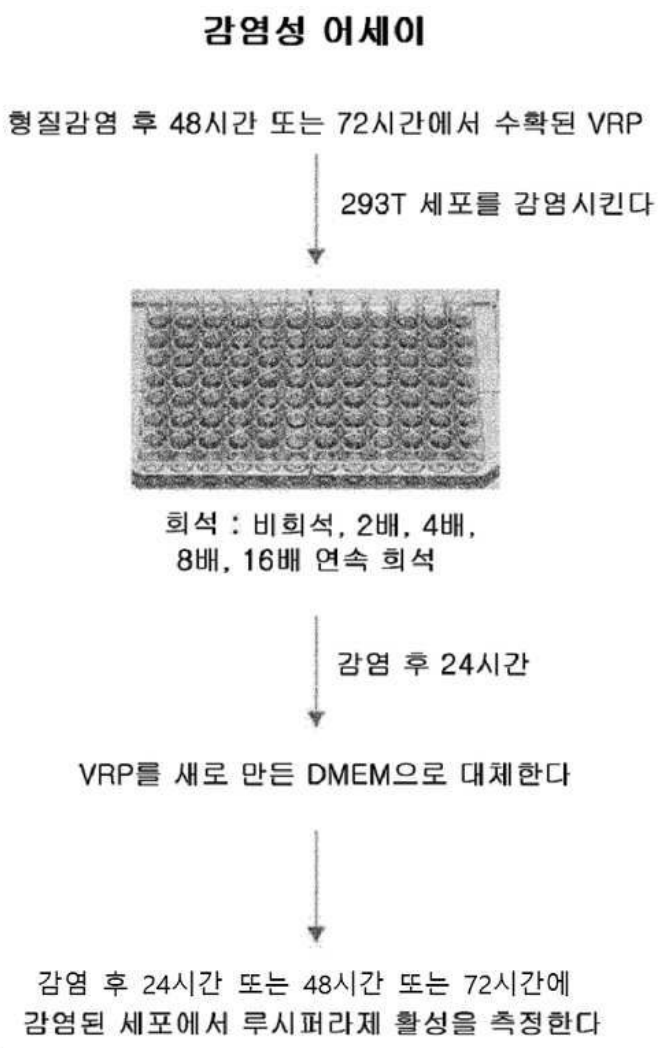
도면6


CMV 프로모터
인핸서
VEEV E3
푸린 절단 부위
VEEV E2
6K
E1
폴리A
Ori
AmpR
Amp 프로모터
TC83_CMV_WTgp_ 헬퍼 2p
7805bp

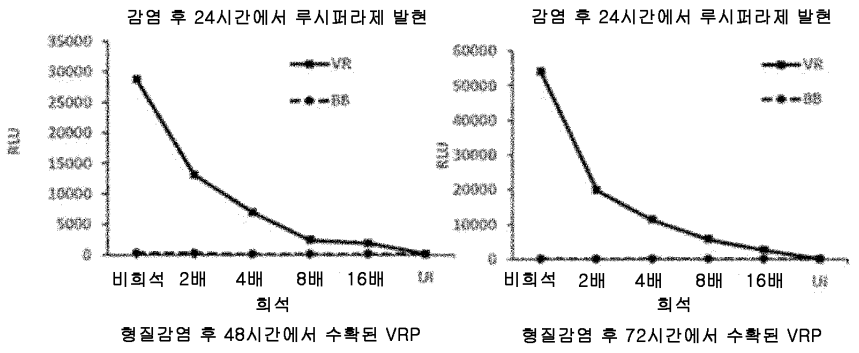
도면7


CMV 프로모터
인핸서
VEEV E3
푸린 절단 부위 돌연변이 SGGGS
VEEV E2
6K
E1
폴리A
Ori
AmpR
Amp 프로모터
TC83_CMV_E3gp_헬퍼 2p
7808 bp

도면8


감염성 어세이
형질감염 후 48시간 또는 72시간에서 수확된 VRP
293T 세포를 감염시킨다
희석 : 비희석, 2배, 4배,
8배, 16배 연속 희석
감염 후 24시간
VRP를 새로 만든 DMEM으로 대체한다
감염 후 24시간 또는 48시간 또는 72시간에
감염된 세포에서 루시퍼라제 활성을 측정한다

도면9

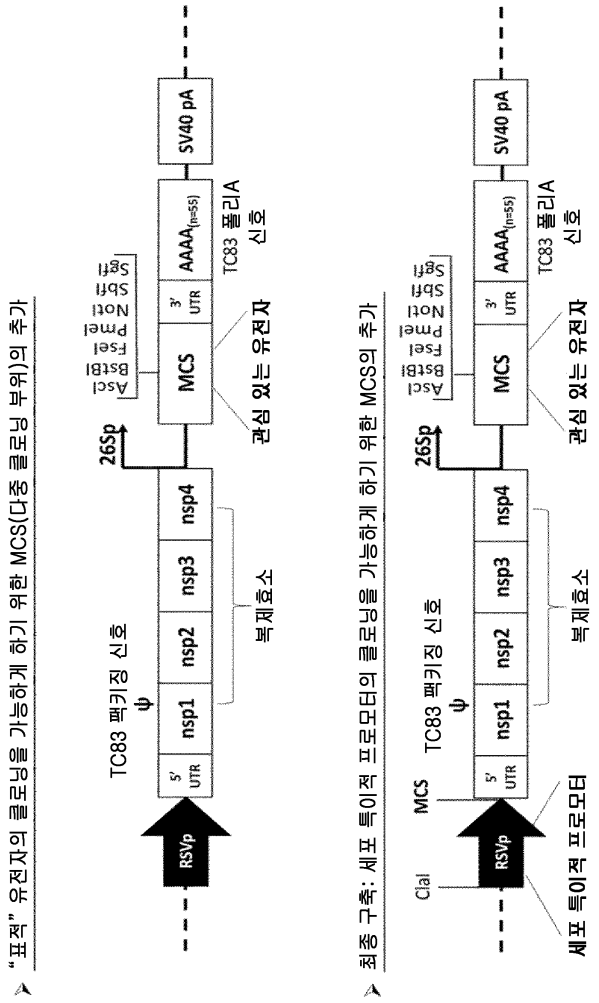


형질감염 후 48시간에서 수확된 VRP

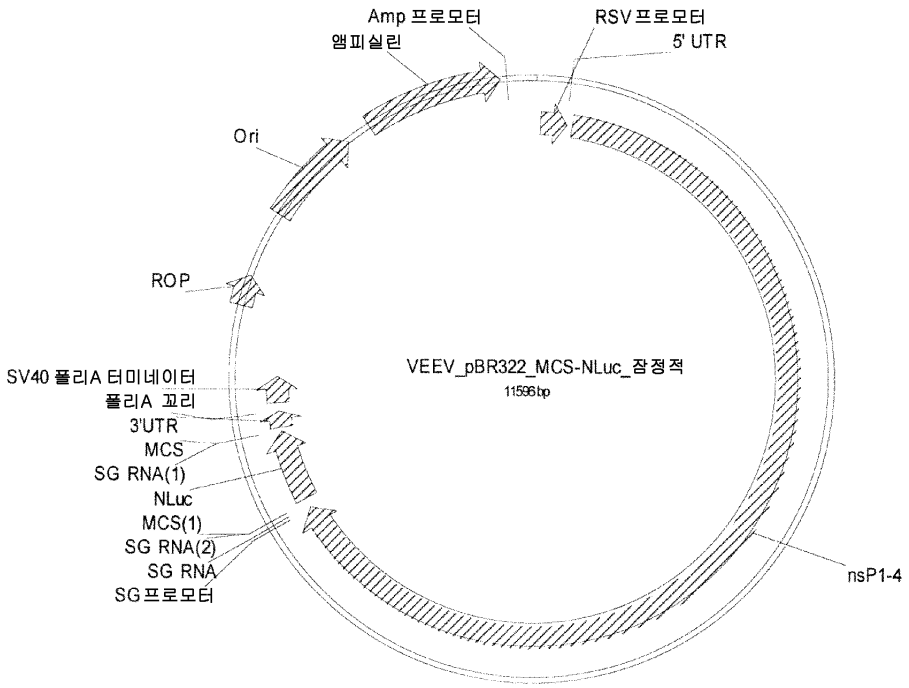
형질감염 후 72시간에서 수확된 VRP

BB – nsp1-4를 갖지 않으나, RSVp, 26S 프로모터, Nluc ORF 및 SV40 pA를 가진 골격 (음성 대조군)

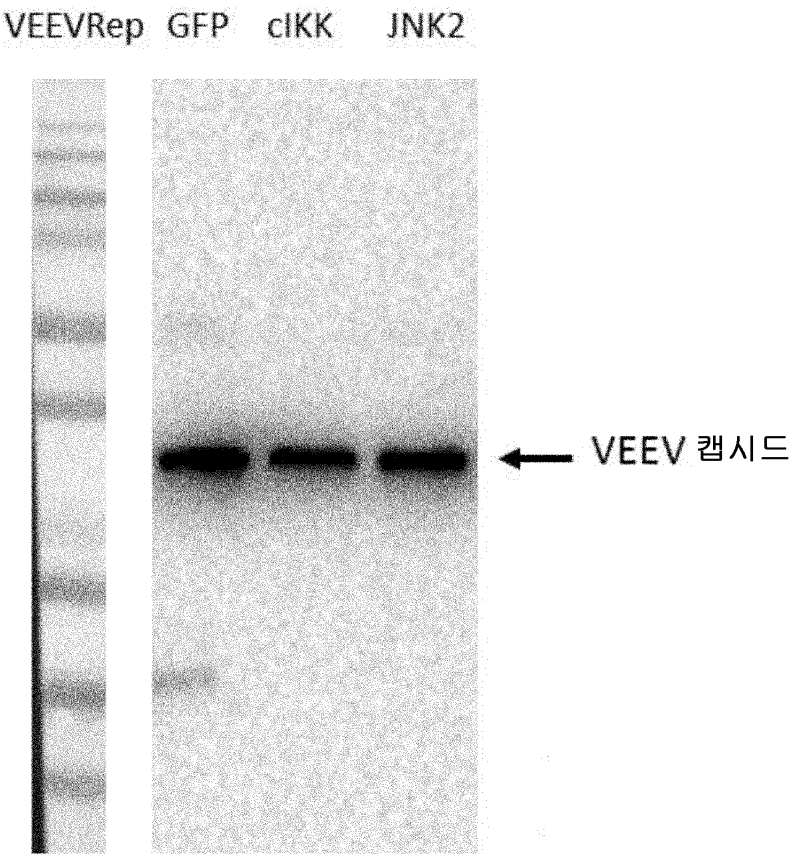
도면10



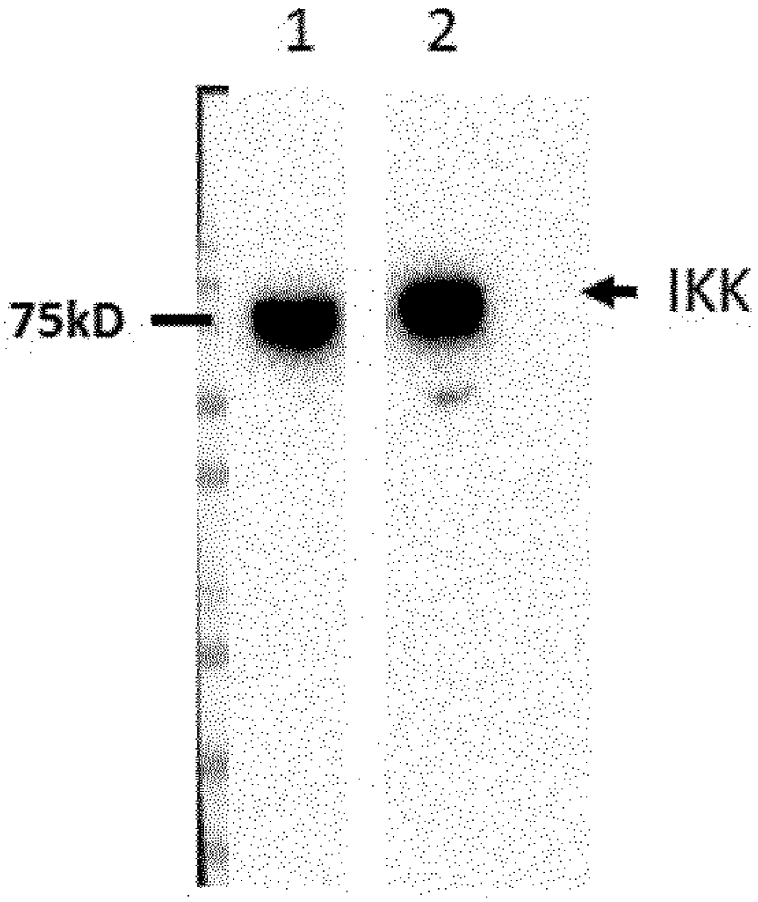
도면11


Amp 프로모터
앰피실린
RSV 프로모터
5' UTR
Ori
ROP
VEEV_pBR322_MCS-NLuc_잠정적
11596bp
SV40 폴리A 터미네이터
폴리A 꼬리
3'UTR
MCS
SG RNA(1)
NLuc
MCS(1)
SG RNA(2)
SG RNA
SG 프로모터
nsP1-4

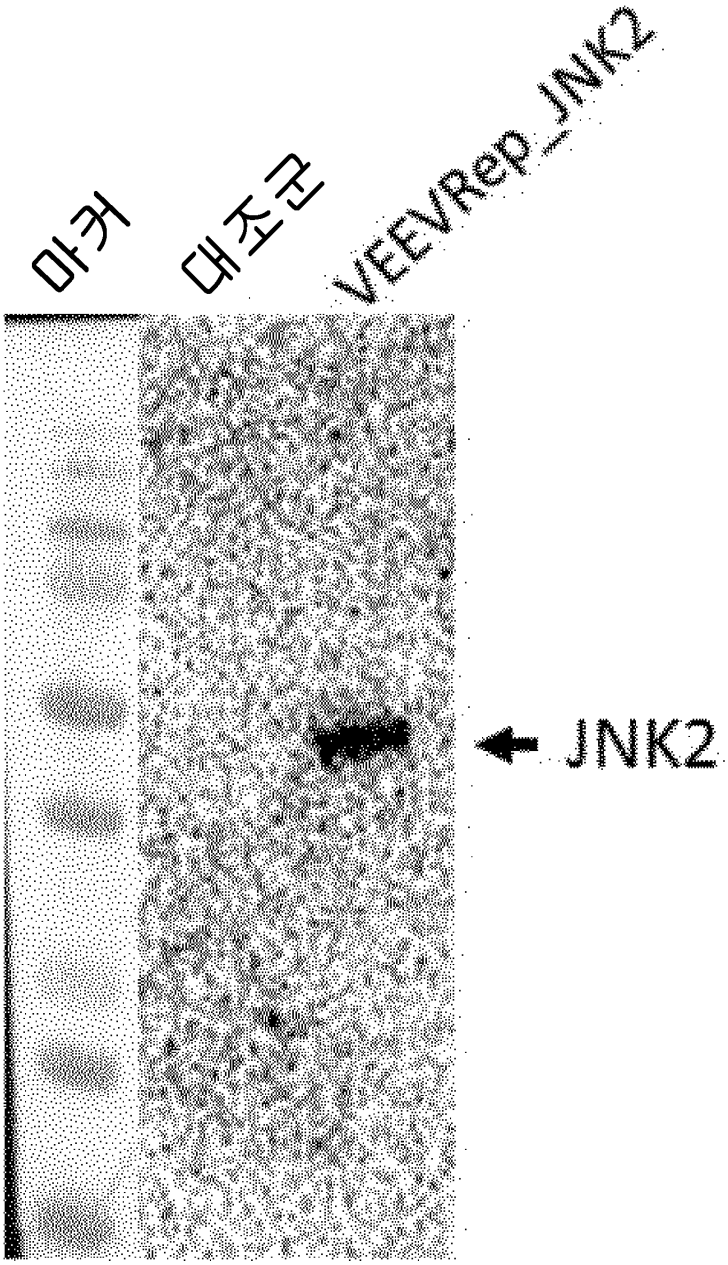
도면12


VEEVRep
GFP
cIKK
JNK2
VEEV 캡시드

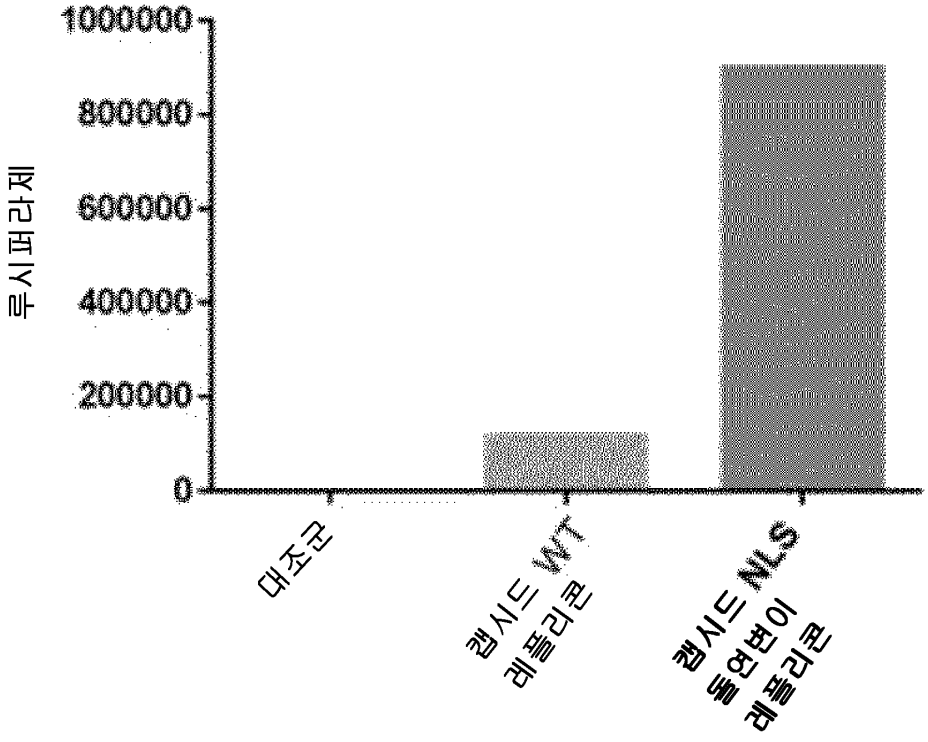
도면13



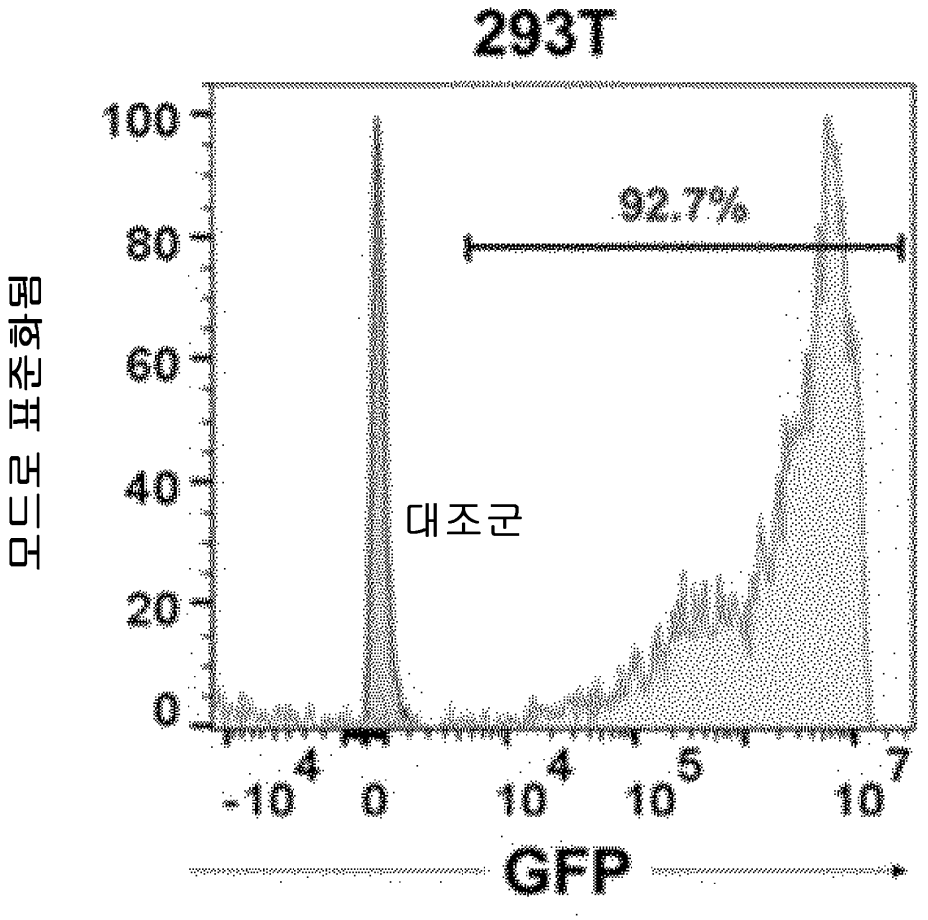
도면14



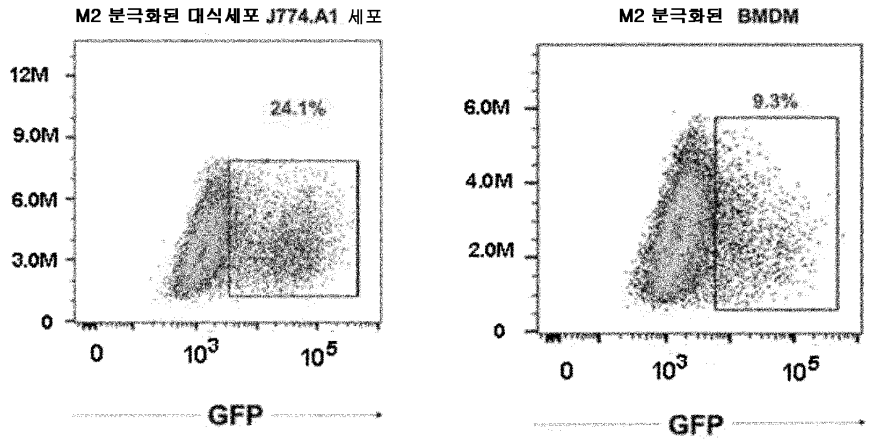
도면15


1000000
800000
600000
400000
200000
0
루시퍼라제
대조군
캡시드 WT 레플리콘
캡시드 NLS 돌연변이 레플리콘

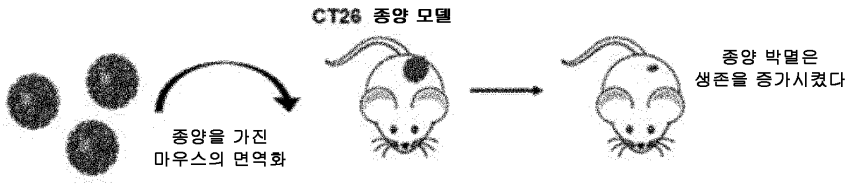
도면16


293T
100
80
60
40
20
0
모드로 표준화됨
92.7%
대조군
-10^4
0
10^4
10^5
10^7
GFP

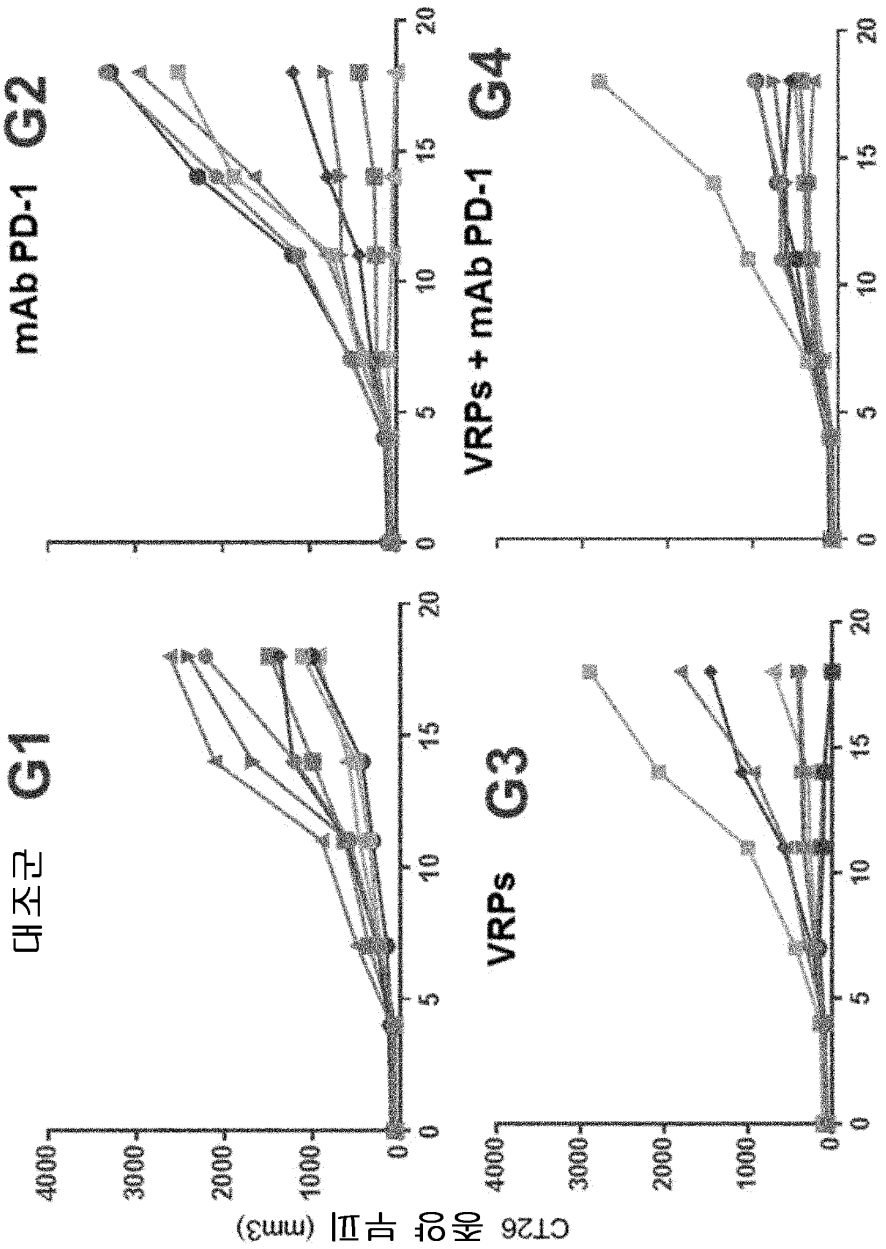
도면17


M2 분극화된 대식세포 J774.A1 세포
12M
9.0M
6.0M
3.0M
0
24.1%
0
10^3
10^5
GFP
M2 분극화된 BMDM
6.0M
4.0M
2.0M
0
9.3%
0
10^3
10^5
GFP

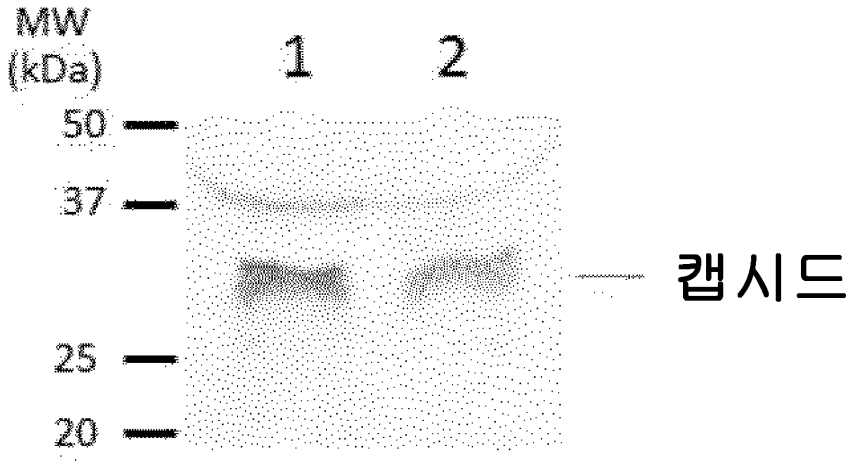
도면18


CT26 종양 모델
종양을 가진
마우스의 면역화
종양 박멸은
생존을 증가시켰다

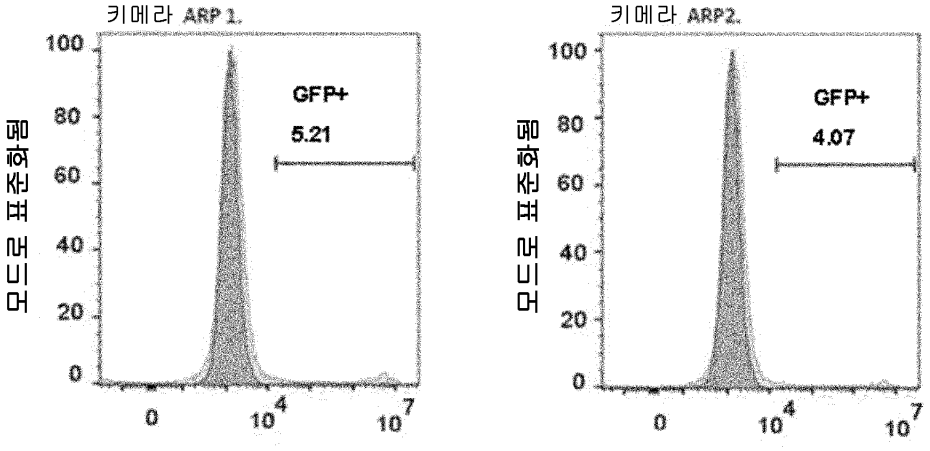
도면19


대조군 G1
mAb PD-1 G2
VRPs G3
VRPs + mAb PD-1 G4
CT26 종양 부피 (mm3)
0
1000
2000
3000
4000
0
5
10
15
20

도면20



도면21



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> VLP Therapeutics, LLC

<120> ALPHAVIRUS REPLICON PARTICLE

<130> 674559

<150> US62/608,213

<151> 2017-12-20

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 275

<212> PRT

<213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus

<400> 1

Met Phe Pro Phe Gln Pro Met Tyr Pro Met Gln Pro Met Pro Tyr Arg
1 5 10 15

Asn Pro Phe Ala Ala Pro Arg Arg Pro Trp Phe Pro Arg Thr Asp Pro
20 25 30

Phe Leu Ala Met Gln Val Gln Glu Leu Thr Arg Ser Met Ala Asn Leu
35 40 45

Thr Phe Lys Gln Arg Arg Asp Ala Pro Pro Glu Gly Pro Ser Ala Lys
50 55 60

Lys Pro Lys Lys Glu Ala Ser Gln Lys Gln Lys Gly Gly Gly Gln Gly
65 70 75 80

Lys Lys Lys Lys Asn Gln Gly Lys Lys Lys Ala Lys Thr Gly Pro Pro
85 90 95

Asn Pro Lys Ala Gln Asn Gly Asn Lys Lys Lys Thr Asn Lys Lys Pro
100 105 110

Gly Lys Arg Gln Arg Met Val Met Lys Leu Glu Ser Asp Lys Thr Phe
115 120 125

Pro Ile Met Leu Glu Gly Lys Ile Asn Gly Tyr Ala Cys Val Val Gly
130 135 140

Gly Lys Leu Phe Arg Pro Met His Val Glu Gly Lys Ile Asp Asn Asp
145 150 155 160

Val Leu Ala Ala Leu Lys Thr Lys Lys Ala Ser Lys Tyr Asp Leu Glu
165 170 175

Tyr Ala Asp Val Pro Gln Asn Met Arg Ala Asp Thr Phe Lys Tyr Thr
180 185 190

His Glu Lys Pro Gln Gly Tyr Tyr Ser Trp His His Gly Ala Val Gln
195 200 205

Tyr Glu Asn Gly Arg Phe Thr Val Pro Lys Gly Val Gly Ala Lys Gly
210 215 220

Asp Ser Gly Arg Pro Ile Leu Asp Asn Gln Gly Arg Val Val Ala Ile
225 230 235 240

Val Leu Gly Gly Val Asn Glu Gly Ser Arg Thr Ala Leu Ser Val Val
245 250 255
Met Trp Asn Glu Lys Gly Val Thr Val Lys Tyr Thr Pro Glu Asn Cys
260 265 270
Glu Gln Trp
275
<210> 2
<211> 275
<212> PRT
<213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus
<400
> 2
Met Phe Pro Phe Gln Pro Met Tyr Pro Met Gln Pro Met Pro Tyr Arg
1 5 10 15
Asn Pro Phe Ala Ala Pro Arg Arg Pro Trp Phe Pro Arg Thr Asp Pro
20 25 30
Phe Leu Ala Met Gln Val Gln Glu Leu Thr Arg Ser Met Ala Asn Leu
35 40 45
Thr Phe Lys Gln Arg Arg Asp Ala Pro Pro Glu Gly Pro Ser Ala Asn
50 55 60

Lys Pro Lys Lys Glu Ala Ser Gln Lys Gln Lys Gly Gly Gly Gln Gly
65 70 75 80
Lys Lys Lys Lys Asn Gln Gly Lys Lys Lys Ala Lys Thr Gly Pro Pro
85 90 95
Asn Pro Lys Ala Gln Asn Gly Asn Lys Lys Lys Thr Asn Lys Lys Pro
100 105 110
Gly Lys Arg Gln Arg Met Val Met Lys Leu Glu Ser Asp Lys Thr Phe
115 120 125

Pro Ile Met Leu Glu Gly Lys Ile Asn Gly Tyr Ala Cys Val Val Gly
130 135 140
Gly Lys Leu Phe Arg Pro Met His Val Glu Gly Lys Ile Asp Asn Asp
145 150 155 160
Val Leu Ala Ala Leu Lys Thr Lys Lys Ala Ser Lys Tyr Asp Leu Glu

165 170 175

Tyr Ala Asp Val Pro Gln Asn Met Arg Ala Asp Thr Phe Lys Tyr Thr

180 185 190

His Glu Lys Pro Gln Gly Tyr Tyr Ser Trp His His Gly Ala Val Gln

195 200 205

Tyr Glu Asn Gly Arg Phe Thr Val Pro Lys Gly Val Gly Ala Lys Gly

210 215 220

Asp Ser Gly Arg Pro Ile Leu Asp Asn Gln Gly Arg Val Val Ala Ile

225 230 235 240

Val Leu Gly Gly Val Asn Glu Gly Ser Arg Thr Ala Leu Ser Val Val

245 250 255

Met Trp Asn Glu Lys Gly Val Thr Val Lys Tyr Thr Pro Glu Asn Cys

260 265 270

Glu Gln Trp

275

<210> 3

<211> 980

<212> PRT

<213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus

<400> 3

Ser Leu Val Thr Thr Met Cys Leu Leu Ala Asn Val Thr Phe Pro Cys

1 5 10 15

Ala Gln Pro Pro Ile Cys Tyr Asp Arg Lys Pro Ala Glu Thr Leu Ala

20 25 30

Met Leu Ser Val Asn Val Asp Asn Pro Gly Tyr Asp Glu Leu Leu Glu

35 40 45

Ala Ala Val Lys Cys Pro Gly Arg Lys Arg Arg Ser Thr Glu Glu Leu

50 55 60

Phe Asn Glu Tyr Lys Leu Thr Arg Pro Tyr Met Ala Arg Cys Ile Arg

65 70 75 80

Cys Ala Val Gly Ser Cys His Ser Pro Ile Ala Ile Glu Ala Val Lys

85 90 95

Ser Asp Gly His Asp Gly Tyr Val Arg Leu Gln Thr Ser Ser Gln Tyr
100 105 110
Gly Leu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Lys Gly Arg Thr Met Arg Tyr Asp
115 120 125
Met His Gly Thr Ile Lys Glu Ile Pro Leu His Gln Val Ser Leu Tyr
130 135 140
Thr Ser Arg Pro Cys His Ile Val Asp Gly His Gly Tyr Phe Leu Leu
145 150 155 160

Ala Arg Cys Pro Ala Gly Asp Ser Ile Thr Met Glu Phe Lys Lys Asp
165 170 175
Ser Val Arg His Ser Cys Ser Val Pro Tyr Glu Val Lys Phe Asn Pro
180 185 190
Val Gly Arg Glu Leu Tyr Thr His Pro Pro Glu His Gly Val Glu Gln
195 200 205
Ala Cys Gln Val Tyr Ala His Asp Ala Gln Asn Arg Gly Ala Tyr Val
210 215 220

Glu Met His Leu Pro Gly Ser Glu Val Asp Ser Ser Leu Val Ser Leu
225 230 235 240
Ser Gly Ser Ser Val Thr Val Thr Pro Pro Asp Gly Thr Ser Ala Leu
245 250 255
Val Glu Cys Glu Cys Gly Gly Thr Lys Ile Ser Glu Thr Ile Asn Lys
260 265 270
Thr Lys Gln Phe Ser Gln Cys Thr Lys Lys Glu Gln Cys Arg Ala Tyr
275 280 285

Arg Leu Gln Asn Asp Lys Trp Val Tyr Asn Ser Asp Lys Leu Pro Lys
290 295 300
Ala Ala Gly Ala Thr Leu Lys Gly Lys Leu His Val Pro Phe Leu Leu
305 310 315 320
Ala Asp Gly Lys Cys Thr Val Pro Leu Ala Pro Glu Pro Met Ile Thr
325 330 335

Phe Gly Phe Arg Ser Val Ser Leu Lys Leu His Pro Lys Asn Pro Thr
340 345 350

Tyr Leu Ile Thr Arg Gln Leu Ala Asp Glu Pro His Tyr Thr His Glu
355 360 365
Leu Ile Ser Glu Pro Ala Val Arg Asn Phe Thr Val Thr Glu Lys Gly
370 375 380
Trp Glu Phe Val Trp Gly Asn His Pro Pro Lys Arg Phe Trp Ala Gln
385 390 395 400
Glu Thr Ala Pro Gly Asn Pro His Gly Leu Pro His Glu Val Ile Thr
405 410 415

His Tyr Tyr His Arg Tyr Pro Met Ser Thr Ile Leu Gly Leu Ser Ile
420 425 430
Cys Ala Ala Ile Ala Thr Val Ser Val Ala Ala Ser Thr Trp Leu Phe
435 440 445
Cys Arg Ser Arg Val Ala Cys Leu Thr Pro Tyr Arg Leu Thr Pro Asn
450 455 460
Ala Arg Ile Pro Phe Cys Leu Ala Val Leu Cys Cys Ala Arg Thr Ala
465 470 475 480

Arg Ala Glu Thr Thr Trp Glu Ser Leu Asp His Leu Trp Asn Asn Asn
485 490 495
Gln Gln Met Phe Trp Ile Gln Leu Leu Ile Pro Leu Ala Ala Leu Ile
500 505 510
Val Val Thr Arg Leu Leu Arg Cys Val Cys Cys Val Val Pro Phe Leu
515 520 525
Val Met Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Tyr Glu His Ala Thr Thr
530 535 540

Met Pro Ser Gln Ala Gly Ile Ser Tyr Asn Thr Ile Val Asn Arg Ala
545 550 555 560
Gly Tyr Ala Pro Leu Pro Ile Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Lys Leu
565 570 575
Ile Pro Thr Val Asn Leu Glu Tyr Val Thr Cys His Tyr Lys Thr Gly

580 585 590

Met Asp Ser Pro Ala Ile Lys Cys Cys Gly Ser Gln Glu Cys Thr Pro

595 600 605

Thr Tyr Arg Pro Asp Glu Gln Cys Lys Val Phe Thr Gly Val Tyr Pro

610 615 620

Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys Asp Thr Glu Asn Thr Gln

625 630 635 640

Val Ser Lys Ala Tyr Val Met Lys Ser Asp Asp Cys Leu Ala Asp His

645 650 655

Ala Glu Ala Tyr Lys Ala His Thr Ala Ser Val Gln Ala Phe Leu Asn

660 665 670

Ile Thr Val Gly Glu His Ser Ile Val Thr Thr Val Tyr Val Asn Gly

675 680 685

Glu Thr Pro Val Asn Phe Asn Gly Val Lys Ile Thr Ala Gly Pro Leu

690 695 700

Ser Thr Ala Trp Thr Pro Phe Asp Arg Lys Ile Val Gln Tyr Ala Gly

705 710 715 720

Glu Ile Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala Gly Gln Pro Gly

725 730 735

Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Val Ser Ser Ser Asp Leu Tyr

740 745 750

Ala Asn Thr Asn Leu Val Leu Gln Arg Pro Lys Ala Gly Ala Ile His

755 760 765

Val Pro Tyr Thr Gln Ala Pro Ser Gly Phe Glu Gln Trp Lys Lys Asp

770 775 780

Lys Ala Pro Ser Leu Lys Phe Thr Ala Pro Phe Gly Cys Glu Ile Tyr

785 790 795 800

Thr Asn Pro Ile Arg Ala Glu Asn Cys Ala Val Gly Ser Ile Pro Leu

805 810 815

Ala Phe Asp Ile Pro Asp Ala Leu Phe Thr Arg Val Ser Glu Thr Pro

820 825 830

Thr Leu Ser Ala Ala Glu Cys Thr Leu Asn Glu Cys Val Tyr Ser Ser
835 840 845
Asp Phe Gly Gly Ile Ala Thr Val Lys Tyr Ser Ala Ser Lys Ser Gly
850 855 860

Lys Cys Ala Val His Val Pro Ser Gly Thr Ala Thr Leu Lys Glu Ala
865 870 875 880
Ala Val Glu Leu Thr Glu Gln Gly Ser Ala Thr Ile His Phe Ser Thr
885 890 895
Ala Asn Ile His Pro Glu Phe Arg Leu Gln Ile Cys Thr Ser Tyr Val
900 905 910
Thr Cys Lys Gly Asp Cys His Pro Pro Lys Asp His Ile Val Thr His
915 920 925

Pro Gln Tyr His Ala Gln Thr Phe Thr Ala Ala Val Ser Lys Thr Ala
930 935 940
Trp Thr Trp Leu Thr Ser Leu Leu Gly Gly Ser Ala Val Ile Ile Ile
945 950 955 960
Ile Gly Leu Val Leu Ala Thr Ile Val Ala Met Tyr Val Leu Thr Asn
965 970 975
Gln Lys His Asn
980

<210> 4
<211> 981
<212> PRT
<213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus

<400> 4
Ser Leu Val Thr Thr Met Cys Leu Leu Ala Asn Val Thr Phe Pro Cys
1 5 10 15
Ala Gln Pro Pro Ile Cys Tyr Asp Arg Lys Pro Ala Glu Thr Leu Ala
20 25 30
Met Leu Ser Val Asn Val Asp Asn Pro Gly Tyr Asp Glu Leu Leu Glu
35 40 45
Ala Ala Val Lys Cys Pro Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Thr Glu Glu

50 55 60

Leu Phe Asn Glu Tyr Lys Leu Thr Arg Pro Tyr Met Ala Arg Cys Ile
65 70 75 80
Arg Cys Ala Val Gly Ser Cys His Ser Pro Ile Ala Ile Glu Ala Val
85 90 95
Lys Ser Asp Gly His Asp Gly Tyr Val Arg Leu Gln Thr Ser Ser Gln
100 105 110
Tyr Gly Leu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Lys Gly Arg Thr Met Arg Tyr
115 120 125

Asp Met His Gly Thr Ile Lys Glu Ile Pro Leu His Gln Val Ser Leu
130 135 140
Tyr Thr Ser Arg Pro Cys His Ile Val Asp Gly His Gly Tyr Phe Leu
145 150 155 160
Leu Ala Arg Cys Pro Ala Gly Asp Ser Ile Thr Met Glu Phe Lys Lys
165 170 175
Asp Ser Val Arg His Ser Cys Ser Val Pro Tyr Glu Val Lys Phe Asn
180 185 190

Pro Val Gly Arg Glu Leu Tyr Thr His Pro Pro Glu His Gly Val Glu
195 200 205
Gln Ala Cys Gln Val Tyr Ala His Asp Ala Gln Asn Arg Gly Ala Tyr
210 215 220
Val Glu Met His Leu Pro Gly Ser Glu Val Asp Ser Ser Leu Val Ser
225 230 235 240
Leu Ser Gly Ser Ser Val Thr Val Thr Pro Pro Asp Gly Thr Ser Ala
245 250 255

Leu Val Glu Cys Glu Cys Gly Gly Thr Lys Ile Ser Glu Thr Ile Asn
260 265 270
Lys Thr Lys Gln Phe Ser Gln Cys Thr Lys Lys Glu Gln Cys Arg Ala
275 280 285
Tyr Arg Leu Gln Asn Asp Lys Trp Val Tyr Asn Ser Asp Lys Leu Pro
290 295 300

Lys Ala Ala Gly Ala Thr Leu Lys Gly Lys Leu His Val Pro Phe Leu
305 310 315 320

Leu Ala Asp Gly Lys Cys Thr Val Pro Leu Ala Pro Glu Pro Met Ile
325 330 335
Thr Phe Gly Phe Arg Ser Val Ser Leu Lys Leu His Pro Lys Asn Pro
340 345 350
Thr Tyr Leu Ile Thr Arg Gln Leu Ala Asp Glu Pro His Tyr Thr His
355 360 365
Glu Leu Ile Ser Glu Pro Ala Val Arg Asn Phe Thr Val Thr Glu Lys
370 375 380

Gly Trp Glu Phe Val Trp Gly Asn His Pro Pro Lys Arg Phe Trp Ala
385 390 395 400
Gln Glu Thr Ala Pro Gly Asn Pro His Gly Leu Pro His Glu Val Ile
405 410 415
Thr His Tyr Tyr His Arg Tyr Pro Met Ser Thr Ile Leu Gly Leu Ser
420 425 430
Ile Cys Ala Ala Ile Ala Thr Val Ser Val Ala Ala Ser Thr Trp Leu
435 440 445

Phe Cys Arg Ser Arg Val Ala Cys Leu Thr Pro Tyr Arg Leu Thr Pro
450 455 460
Asn Ala Arg Ile Pro Phe Cys Leu Ala Val Leu Cys Cys Ala Arg Thr
465 470 475 480
Ala Arg Ala Glu Thr Thr Trp Glu Ser Leu Asp His Leu Trp Asn Asn
485 490 495
Asn Gln Gln Met Phe Trp Ile Gln Leu Leu Ile Pro Leu Ala Ala Leu
500 505 510

Ile Val Val Thr Arg Leu Leu Arg Cys Val Cys Cys Val Val Pro Phe
515 520 525
Leu Val Met Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Tyr Glu His Ala Thr
530 535 540
Thr Met Pro Ser Gln Ala Gly Ile Ser Tyr Asn Thr Ile Val Asn Arg

545 550 555 560

Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Pro Ile Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Lys

565 570 575

Leu Ile Pro Thr Val Asn Leu Glu Tyr Val Thr Cys His Tyr Lys Thr

580 585 590

Gly Met Asp Ser Pro Ala Ile Lys Cys Cys Gly Ser Gln Glu Cys Thr

595 600 605

Pro Thr Tyr Arg Pro Asp Glu Gln Cys Lys Val Phe Thr Gly Val Tyr

610 615 620

Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys Asp Thr Glu Asn Thr

625 630 635 640

Gln Val Ser Lys Ala Tyr Val Met Lys Ser Asp Asp Cys Leu Ala Asp

645 650 655

His Ala Glu Ala Tyr Lys Ala His Thr Ala Ser Val Gln Ala Phe Leu

660 665 670

Asn Ile Thr Val Gly Glu His Ser Ile Val Thr Thr Val Tyr Val Asn

675 680 685

Gly Glu Thr Pro Val Asn Phe Asn Gly Val Lys Ile Thr Ala Gly Pro

690 695 700

Leu Ser Thr Ala Trp Thr Pro Phe Asp Arg Lys Ile Val Gln Tyr Ala

705 710 715 720

Gly Glu Ile Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala Gly Gln Pro

725 730 735

Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Val Ser Ser Ser Asp Leu

740 745 750

Tyr Ala Asn Thr Asn Leu Val Leu Gln Arg Pro Lys Ala Gly Ala Ile

755 760 765

His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Pro Ser Gly Phe Glu Gln Trp Lys Lys

770 775 780

Asp Lys Ala Pro Ser Leu Lys Phe Thr Ala Pro Phe Gly Cys Glu Ile

785 790 795 800

Tyr Thr Asn Pro Ile Arg Ala Glu Asn Cys Ala Val Gly Ser Ile Pro
805 810 815
Leu Ala Phe Asp Ile Pro Asp Ala Leu Phe Thr Arg Val Ser Glu Thr
820 825 830

Pro Thr Leu Ser Ala Ala Glu Cys Thr Leu Asn Glu Cys Val Tyr Ser
835 840 845
Ser Asp Phe Gly Gly Ile Ala Thr Val Lys Tyr Ser Ala Ser Lys Ser
850 855 860
Gly Lys Cys Ala Val His Val Pro Ser Gly Thr Ala Thr Leu Lys Glu
865 870 875 880
Ala Ala Val Glu Leu Thr Glu Gln Gly Ser Ala Thr Ile His Phe Ser
885 890 895

Thr Ala Asn Ile His Pro Glu Phe Arg Leu Gln Ile Cys Thr Ser Tyr
900 905 910
Val Thr Cys Lys Gly Asp Cys His Pro Pro Lys Asp His Ile Val Thr
915 920 925
His Pro Gln Tyr His Ala Gln Thr Phe Thr Ala Ala Val Ser Lys Thr
930 935 940
Ala Trp Thr Trp Leu Thr Ser Leu Leu Gly Gly Ser Ala Val Ile Ile
945 950 955 960

Ile Ile Gly Leu Val Leu Ala Thr Ile Val Ala Met Tyr Val Leu Thr
965 970 975
Asn Gln Lys His Asn
980

<210> 5
<211> 11542
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Genomic RNA expression Vector including Luciferase gene
nucleotide
<400> 5
ttctcatgtt tgacagctta tcatcgatgc accgtgcatg ccgattggtg gaagtaaggt 60

ggtacgatcg tgccttatta ggaaggcaac agacaggtct gacatggatt ggacgaacca 120

ctgaattccg cattgcagag ataattgtat ttaagtgcct agctcgatac aataaacgcc 180

atttgaccat tcaccacatt ggtgtgcacc tccaataggc ggcgcatgag agaagcccag 240

accaattacc tacccaaaat ggagaaagtt cacgttgaca tcgaggaaga cagcccattc 300

ctcagagctt tgcagcggag cttcccgcag tttgaggtag aagccaagca ggtcactgat 360

aatgaccatg ctaatgccag agcgttttcg catctggctt caaaactgat cgaaacggag 420

gtggacccat ccgacacgat ccttgacatt ggaagtgcgc ccgcccgcag aatgtattct 480

aagcacaagt atcattgtat ctgtccgatg agatgtgcgg aagatccgga cagattgtat 540

aagtatgcaa ctaagctgaa gaaaaactgt aaggaaataa ctgataagga attggacaag 600

aaaatgaagg agctcgccgc cgtcatgagc gaccctgacc tggaaactga gactatgtgc 660

ctccacgacg acgagcgtgt cgctacgaag ggcaagtcgc tgtttaccag gatgtatacg 720

cggttgacgg accgacaagt ctctatcacc aagccaataa gggagttaga gtcgcctact 780

ggataggctt tgacaccacc ccttttatgt ttaagaactt ggctggagca tatccatcat 840

actctaccaa ctgggccgac gaaaccgtgt taacggctcg taacataggc ctatgcagct 900

ctgacgttat ggagcggtca cgtagaggga tgtccattct tagaaagaag tatttgaaac 960

catccaacaa tgttctattc tctgttggct cgaccatcta ccacgagaag agggacttac 1020

tgaggagctg gcacctgccg tctgtatttc acttacgtgg caagcaaaat tacacatgtc 1080

ggtgtgagac tatagttagt tgcgacgggt acgtcgttaa aagaatagct atcagtccag 1140

gcctgtatgg gaagccttca ggctatgctg ctacgatgca ccgcgaggga ttcttgtgct 1200

gcaaagtgac agacacattg aacggggaga gggtctcttt tcccgtgtgc acgtatgtgc 1260

cagctacatt gtgtgaccaa atgactggca tactggcaac agatgtcagt gcggacgacg 1320

cgcaaaaact gctggttggg ctcaaccagc gtatagtcgt caacggtcgc acccagagaa 1380

acaccaatac catgaaaaat taccttttgc ccgtagtggc ccaggcattt gctaggtggg 1440

caaaggaata taaggaagat caagaagatg aaaggccact aggactacga gatagacagt 1500

tagtcatggg gtgttgttgg gcttttagaa ggcacaagat aacatctatt tataagcgcc 1560

cggataccca aaccatcatc aaagtgaaca gcgatttcca ctcattcgtg ctgcccagga 1620

taggcagtaa cacattggag atcgggctga gaacaagaat caggaaaatg ttagaggagc 1680

acaaggagcc gtcacctctc attaccgccg aggacgtaca agaagctaag tgcgcagccg 1740

atgaggctaa ggaggtgcgt gaagccgagg agttgcgcgc agctctacca cctttggcag 1800

ctgatgttga ggagcccact ctggaagccg atgtcgactt gatgttacaa gaggctgggg 1860

ccggctcagt ggagacacct cgtggcttga taaaggttac cagctacgat ggcgaggaca 1920
agatcggctc ttacgctgtg ctttctccgc aggctgtact caagagtgaa aaattatctt 1980
gcatccaccc tctcgctgaa caagtcatag tgataacaca ctctggccga aaagggcgtt 2040
atgccgtgga accataccat ggtaaagtag tggtgccaga gggacatgca atacccgtcc 2100
aggactttca agctctgagt gaaagtgcca ccattgtgta caacgaacgt gagttcgtaa 2160
acaggtacct gcaccatatt gccacacatg gaggagcgct gaacactgat gaagaatatt 2220
acaaaactgt caagcccagc gagcacgacg gcgaatacct gtacgacatc gacaggaaac 2280

agtgcgtcaa gaaagaacta gtcactgggc tagggctcac aggcgagctg gtggatcctc 2340
ccttccatga attcgcctac gagagtctga gaacacgacc agccgctcct taccaagtac 2400
caaccatagg ggtgtatggc gtgccaggat caggcaagtc tggcatcatt aaaagcgcag 2460
tcaccaaaaa agatctagtg gtgagcgcca agaaagaaaa ctgtgcagaa attataaggg 2520
acgtcaagaa aatgaaaggg ctggacgtca atgccagaac tgtggactca gtgctcttga 2580
atggatgcaa acaccccgta gagaccctgt atattgacga agcttttgct tgtcatgcag 2640
gtactctcag agcgctcata gccattataa gacctaaaaa ggcagtgctc tgcggggatc 2700

ccaaacagtg cggttttttt aacatgatgt gcctgaaagt gcattttaac cacgagattt 2760
gcacacaagt cttccacaaa agcatctctc gccgttgcac taaatctgtg acttcggtcg 2820
tctcaacctt gttttacgac aaaaaaatga gaacgacgaa tccgaaagag actaagattg 2880
tgattgacac taccggcagt accaaaccta agcaggacga tctcattctc acttgtttca 2940
gagggtgggt gaagcagttg caaatagatt acaaaggcaa cgaaataatg acggcagctg 3000
cctctcaagg gctgacccgt aaaggtgtgt atgccgttcg gtacaaggtg aatgaaaatc 3060
ctctgtacgc acccacctca gaacatgtga acgtcctact gacccgcacg gaggaccgca 3120

tcgtgtggaa aacactagcc ggcgacccat ggataaaaac actgactgcc aagtaccctg 3180
ggaatttcac tgccacgata gaggagtggc aagcagagca tgatgccatc atgaggcaca 3240
tcttggagag accggaccct accgacgtct tccagaataa ggcaaacgtg tgttgggcca 3300
aggctttagt gccggtgctg aagaccgctg gcatagacat gaccactgaa caatggaaca 3360
ctgtggatta ttttgaaacg gacaaagctc actcagcaga gatagtattg aaccaactat 3420
gcgtgaggtt ctttggactc gatctggact ccggtctatt ttctgcaccc actgttccgt 3480
tatccattag gaataatcac tgggataact ccccgtcgcc taacatgtac gggctgaata 3540

aagaagtggt ccgtcagctc tctcgcaggt acccacaact gcctcgggca gttgccactg 3600

gaagagtcta tgacatgaac actggtacac tgcgcaatta tgatccgcgc ataaacctag 3660

tacctgtaaa cagaagactg cctcatgctt tagtcctcca ccataatgaa cacccacaga 3720

gtgacttttc ttcattcgtc agcaaattga agggcagaac tgtcctggtg gtcggggaaa 3780

agttgtccgt cccaggcaaa atggttgact ggttgtcaga ccggcctgag gctaccttca 3840

gagctcggct ggatttaggc atcccaggtg atgtgcccaa atatgacata atatttgtta 3900

atgtgaggac cccatataaa taccatcact atcagcagtg tgaagaccat gccattaagc 3960

ttagcatgtt gaccaagaaa gcttgtctgc atctgaatcc cggcggaacc tgtgtcagca 4020

taggttatgg ttacgctgac agggccagcg aaagcatcat tggtgctata gcgcggcagt 4080

tcaagttttc ccgggtatgc aaaccgaaat cctcacttga agagacggaa gttctgtttg 4140

tattcattgg gtacgatcgc aaggcccgta cgcacaatcc ttacaagctt tcatcaacct 4200

tgaccaacat ttatacaggt tccagactcc acgaagccgg atgtgcaccc tcatatcatg 4260

tggtgcgagg ggatattgcc acggccaccg aaggagtgat tataaatgct gctaacagca 4320

aaggacaacc tggcggaggg gtgtgcggag cgctgtataa gaaattcccg gaaagcttcg 4380

atttacagcc gatcgaagta ggaaaagcgc gactggtcaa aggtgcagct aaacatatca 4440

ttcatgccgt aggaccaaac ttcaacaaag tttcggaggt tgaaggtgac aaacagttgg 4500

cagaggctta tgagtccatc gctaagattg tcaacgataa caattacaag tcagtagcga 4560

ttccactgtt gtccaccggc atcttttccg ggaacaaaga tcgactaacc caatcattga 4620

accatttgct gacagcttta gacaccactg atgcagatgt agccatatac tgcagggaca 4680

agaaatggga aatgactctc aaggaagcag tggctaggag agaagcagtg gaggagatat 4740

gcatatccga cgactcttca gtgacagaac ctgatgcaga gctggtgagg gtgcatccga 4800

agagttcttt ggctggaagg aagggctaca gcacaagcga tggcaaaact ttctcatatt 4860

tggaagggac caagtttcac caggcggcca aggatatagc agaaattaat gccatgtggc 4920

ccgttgcaac ggaggccaat gagcaggtat gcatgtatat cctcggagaa agcatgagca 4980

gtattaggtc gaaatgcccc gtcgaagagt cggaagcctc cacaccacct agcacgctgc 5040

cttgcttgtg catccatgcc atgactccag aaagagtaca gcgcctaaaa gcctcacgtc 5100

cagaacaaat tactgtgtgc tcatcctttc cattgccgaa gtatagaatc actggtgtgc 5160

agaagatcca atgctcccag cctatattgt tctcaccgaa agtgcctgcg tatattcatc 5220

caaggaagta tctcgtggaa acaccaccgg tagacgagac tccggagcca tcggcagaga 5280

accaatccac agaggggaca cctgaacaac caccacttat aaccgaggat gagaccagga 5340

ctagaacgcc tgagccgatc atcatcgaag aggaagaaga ggatagcata agtttgctgt 5400

cagatggccc gacccaccag gtgctgcaag tcgaggcaga cattcacggg ccgccctctg 5460

tatctagctc atcctggtcc attcctcatg catccgactt tgatgtggac agtttatcca 5520

tacttgacac cctggaggga gctagcgtga ccagcggggc aacgtcagcc gagactaact 5580

cttacttcgc aaagagtatg gagtttctgg cgcgaccggt gcctgcgcct cgaacagtat 5640

tcaggaaccc tccacatccc gctccgcgca caagaacacc gtcacttgca cccagcaggg 5700

cctgctcgag aaccagccta gtttccaccc cgccaggcgt gaatagggtg atcactagag 5760

aggagctcga ggcgcttacc ccgtcacgca ctcctagcag gtcggtctcg agaaccagcc 5820

tggtctccaa cccgccaggc gtaaataggg tgattacaag agaggagttt gaggcgttcg 5880

tagcacaaca acaatgacgg tttgatgcgg gtgcatacat cttttcctcc gacaccggtc 5940

aagggcattt acaacaaaaa tcagtaaggc aaacggtgct atccgaagtg gtgttggaga 6000

ggaccgaatt ggagatttcg tatgccccgc gcctcgacca agaaaaagaa gaattactac 6060

gcaagaaatt acagttaaat cccacacctg ctaacagaag cagataccag tccaggaagg 6120

tggagaacat gaaagccata acagctagac gtattctgca aggcctaggg cattatttga 6180

aggcagaagg aaaagtggag tgctaccgaa ccctgcatcc tgttcctttg tattcatcta 6240

gtgtgaaccg tgccttttca agccccaagg tcgcagtgga agcctgtaac gccatgttga 6300

aagagaactt tccgactgtg gcttcttact gtattattcc agagtacgat gcctatttgg 6360

acatggttga cggagcttca tgctgcttag acactgccag tttttgccct gcaaagctgc 6420

gcagctttcc aaagaaacac tcctatttgg aacccacaat acgatcggca gtgccttcag 6480

cgatccagaa cacgctccag aacgtcctgg cagctgccac aaaaagaaat tgcaatgtca 6540

cgcaaatgag agaattgccc gtattggatt cggcggcctt taatgtggaa tgcttcaaga 6600

aatatgcgtg taataatgaa tattgggaaa cgtttaaaga aaaccccatc aggcttactg 6660

aagaaaacgt ggtaaattac attaccaaat taaaaggacc aaaagctgct gctctttttg 6720

cgaagacaca taatttgaat atgttgcagg acataccaat ggacaggttt gtaatggact 6780

taaagagaga cgtgaaagtg actccaggaa caaaacatac tgaagaacgg cccaaggtac 6840

aggtgatcca ggctgccgat ccgctagcaa cagcgtatct gtgcggaatc caccgagagc 6900

tggttaggag attaaatgcg gtcctgcttc cgaacattca tacactgttt gatatgtcgg 6960

ctgaagactt tgacgctatt atagccgagc acttccagcc tggggattgt gttctggaaa 7020

ctgacatcgc gtcgtttgat aaaagtgagg acgacgccat ggctctgacc gcgttaatga 7080

ttctggaaga cttaggtgtg gacgcagagc tgttgacgct gattgaggcg gctttcggcg 7140

aaatttcatc aatacatttg cccactaaaa ctaaatttaa attcggagcc atgatgaaat 7200

ctggaatgtt cctcacactg tttgtgaaca cagtcattaa cattgtaatc gcaagcagag 7260

tgttgagaga acggctaacc ggatcaccat gtgcagcatt cattggagat gacaatatcg 7320

tgaaaggagt caaatcggac aaattaatgg cagacaggtg cgccacctgg ttgaatatgg 7380
aagtcaagat tatagatgct gtggtgggcg agaaagcgcc ttatttctgt ggagggttta 7440
ttttgtgtga ctccgtgacc ggcacagcgt gccgtgtggc agacccccta aaaaggctgt 7500
ttaagcttgg caaacctctg gcagcagacg atgaacatga tgatgacagg agaagggcat 7560
tgcatgaaga gtcaacacgc tggaaccgag tgggtattct ttcagagctg tgcaaggcag 7620
tagaatcaag gtatgaaacc gtaggaactt ccatcatagt tatggccatg actactctag 7680
ctagcagtgt taaatcattc agctacctga gaggggcccc tataactctc tacggctaac 7740

ctgaatggac tacgacatag tctagtccgc caagatggtc ttcacactcg aagatttcgt 7800
tggggactgg cgacagacag ccggctacaa cctggaccaa gtccttgaac agggaggtgt 7860
gtccagtttg tttcagaatc tcggggtgtc cgtaactccg atccaaagga ttgtcctgag 7920
cggtgaaaat gggctgaaga tcgacatcca tgtcatcatc ccgtatgaag gtctgagcgg 7980
cgaccaaatg ggccagatcg aaaaaatttt taaggtggtg taccctgtgg atgatcatca 8040
ctttaaggtg atcctgcact atggcacact ggtaatcgac ggggttacgc cgaacatgat 8100
cgactatttc ggacggccgt atgaaggcat cgccgtgttc gacggcaaaa agatcactgt 8160

aacagggacc ctgtggaacg gcaacaaaat tatcgacgag cgcctgatca accccgacgg 8220
ctccctgctg ttccgagtaa ccatcaacgg agtgaccggc tggcggctgt gcgaacgcat 8280
tctggcgtaa atacagcagc aattggcaag ctgcttacat agaactcgcg gcgattggca 8340
tgccgcctta aaatttttat tttatttttc ttttcttttc cgaatcggat tttgttttta 8400
atatttcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 8460
aatcgcgaca gacatgataa gatacattga tgagtttgga caaaccacaa ctagaatgca 8520
gtgaaaaaaa tgctttattt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg taaccattat 8580

aagctgcaat aaacaagtta acaacaacaa ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg 8640
ggaggtgtgg gaggtttttt aggacccggc taggctggcg gggttgcctt actggttagc 8700
agaatgaatc accgatacgc gagcgaacgt gaagcgactg ctgctgcaaa acgtctgcga 8760
cctgagcaac aacatgaatg gtcttcggtt tccgtgtttc gtaaagtctg gaaacgcgga 8820
agtcagcgcc ctgcaccatt atgttccgga tctgcatcgc aggatgctgc tggctaccct 8880
gtggaacacc tacatctgta ttaacgaagc gctggcattg accctgagtg atttttctct 8940
ggtcccgccg catccatacc gccagttgtt taccctcaca acgttccagt aaccgggcat 9000

gttcatcatc agtaacccgt atcgtgagca tcctctctcg tttcatcggt atcattaccc 9060

ccatgaacag aaatcccccc tacacggagg catcagtgac caaacaggaa aaaaccgccc 9120

ttaacatggc ccgctttatc agaagccaga cattaacgct tctggagaaa ctcaacgagc 9180

tggacgcgga tgaacaggca gacatctgtg aatcgcttca cgaccacgct gatgagcttt 9240

accgcagctg cctcgcgcgt ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc 9300

cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg 9360

cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggcg cagccatgac ccagtcacgt agcgatagcg 9420

gagtgtatac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatat 9480

gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcatcaggc gctcttccgc 9540

ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 9600

ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 9660

agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 9720

taggctccgc ccccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 9780

cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 9840

tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 9900

gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct 9960

gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 10020

tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 10080

gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggt ggcctaacta 10140

cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 10200

aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt 10260

tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 10320

ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggtcatgag 10380

attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat 10440

ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 10500

tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat 10560

aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc 10620

acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 10680

aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag 10740

agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt gccattgctg caggcatcgt 10800

ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 10860

agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 10920

tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc 10980

tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 11040

attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa cacgggataa 11100

taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg 11160

aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca ctcgtgcacc 11220

caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag 11280

gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 11340

cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 11400

tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc 11460

acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac 11520

gaggcccttt cgtcttcaag aa 11542

<210> 6

<211> 11596

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Genomic RNA expression Vector including Luciferase gene with Multiple cloning sites

<400> 6

ttctcatgtt tgacagctta tcatcgatgc accgtgcatg ccgattggtg gaagtaaggt 60

ggtacgatcg tgccttatta ggaaggcaac agacaggtct gacatggatt ggacgaacca 120

ctgaattccg cattgcagag ataattgtat ttaagtgcct agctcgatac aataaacgcc 180

atttgaccat tcaccacatt ggtgtgcacc tccaataggc ggcgcatgag agaagcccag 240

accaattacc tacccaaaat ggagaaagtt cacgttgaca tcgaggaaga cagcccattc 300

ctcagagctt tgcagcggag cttcccgcag tttgaggtag aagccaagca ggtcactgat 360

aatgaccatg ctaatgccag agcgttttcg catctggctt caaaactgat cgaaacggag 420

gtggacccat ccgacacgat ccttgacatt ggaagtgcgc ccgcccgcag aatgtattct 480

aagcacaagt atcattgtat ctgtccgatg agatgtgcgg aagatccgga cagattgtat 540

aagtatgcaa ctaagctgaa gaaaaactgt aaggaaataa ctgataagga attggacaag 600

aaaatgaagg agctcgccgc cgtcatgagc gaccctgacc tggaaactga gactatgtgc 660

ctccacgacg acgagcgtgt cgctacgaag ggcaagtcgc tgtttaccag gatgtatacg 720

cggttgacgg accgacaagt ctctatcacc aagccaataa gggagttaga gtcgcctact 780

ggataggctt tgacaccacc ccttttatgt ttaagaactt ggctggagca tatccatcat 840

actctaccaa ctgggccgac gaaaccgtgt taacggctcg taacataggc ctatgcagct 900

ctgacgttat ggagcggtca cgtagaggga tgtccattct tagaaagaag tatttgaaac 960

catccaacaa tgttctattc tctgttggct cgaccatcta ccacgagaag agggacttac 1020

tgaggagctg gcacctgccg tctgtatttc acttacgtgg caagcaaaat tacacatgtc 1080

ggtgtgagac tatagttagt tgcgacgggt acgtcgttaa aagaatagct atcagtccag 1140

gcctgtatgg gaagccttca ggctatgctg ctacgatgca ccgcgaggga ttcttgtgct 1200

gcaaagtgac agacacattg aacggggaga gggtctcttt tcccgtgtgc acgtatgtgc 1260

cagctacatt gtgtgaccaa atgactggca tactggcaac agatgtcagt gcggacgacg 1320

cgcaaaaact gctggttggg ctcaaccagc gtatagtcgt caacggtcgc acccagagaa 1380

acaccaatac catgaaaaat tacctttgc ccgtagtggc ccaggcattt gctaggtggg 1440

caaaggaata taaggaagat caagaagatg aaaggccact aggactacga gatagacagt 1500

tagtcatggg gtgttgttgg gcttttagaa ggcacaagat aacatctatt tataagcgcc 1560

cggataccca aaccatcatc aaagtgaaca gcgatttcca ctcattcgtg ctgcccagga 1620

taggcagtaa cacattggag atcgggctga gaacaagaat caggaaaatg ttagaggagc 1680

acaaggagcc gtcacctctc attaccgccg aggacgtaca agaagctaag tgcgcagccg 1740

atgaggctaa ggaggtgcgt gaagccgagg agttgcgcgc agctctacca cctttggcag 1800

ctgatgttga ggagcccact ctggaagccg atgtcgactt gatgttacaa gaggctgggg 1860

ccggctcagt ggagacacct cgtggcttga taaaggttac cagctacgat ggcgaggaca 1920

agatcggctc ttacgctgtg ctttctccgc aggctgtact caagagtgaa aaattatctt 1980

gcatccaccc tctcgctgaa caagtcatag tgataacaca ctctggccga aaagggcgtt 2040

atgccgtgga accataccat ggtaaagtag tggtgccaga gggacatgca atacccgtcc 2100

aggactttca agctctgagt gaaagtgcca ccattgtgta caacgaacgt gagttcgtaa 2160

acaggtacct gcaccatatt gccacacatg gaggagcgct gaacactgat gaagaatatt 2220

acaaaactgt caagcccagc gagcacgacg gcgaatacct gtacgacatc gacaggaaac 2280

agtgcgtcaa gaaagaacta gtcactgggc tagggctcac aggcgagctg gtggatcctc 2340

ccttccatga attcgcctac gagagtctga gaacacgacc agccgctcct taccaagtac 2400

caaccatagg ggtgtatggc gtgccaggat caggcaagtc tggcatcatt aaaagcgcag 2460

tcaccaaaaa agatctagtg gtgagcgcca agaaagaaaa ctgtgcagaa attataaggg 2520

acgtcaagaa aatgaaaggg ctggacgtca atgccagaac tgtggactca gtgctcttga 2580

atggatgcaa acaccccgta gagaccctgt atattgacga agcttttgct tgtcatgcag 2640

gtactctcag agcgctcata gccattataa gacctaaaaa ggcagtgctc tgcggggatc 2700

ccaaacagtg cggttttttt aacatgatgt gcctgaaagt gcattttaac cacgagattt 2760

gcacacaagt cttccacaaa agcatctctc gccgttgcac taaatctgtg acttcggtcg 2820

tctcaacctt gttttacgac aaaaaaatga gaacgacgaa tccgaaagag actaagattg 2880

tgattgacac taccggcagt accaaaccta agcaggacga tctcattctc acttgtttca 2940

gagggtgggt gaagcagttg caaatagatt acaaaggcaa cgaaataatg acggcagctg 3000

cctctcaagg gctgacccgt aaaggtgtgt atgccgttcg gtacaaggtg aatgaaaatc 3060

ctctgtacgc acccacctca gaacatgtga acgtcctact gacccgcacg gaggaccgca 3120

tcgtgtggaa aacactagcc ggcgacccat ggataaaaac actgactgcc aagtaccctg 3180

ggaatttcac tgccacgata gaggagtggc aagcagagca tgatgccatc atgaggcaca 3240

tcttggagag accggaccct accgacgtct tccagaataa ggcaaacgtg tgttgggcca 3300

aggctttagt gccggtgctg aagaccgctg gcatagacat gaccactgaa caatggaaca 3360

ctgtggatta ttttgaaacg gacaaagctc actcagcaga gatagtattg aaccaactat 3420

gcgtgaggtt ctttggactc gatctggact ccggtctatt ttctgcaccc actgttccgt 3480

tatccattag gaataatcac tgggataact ccccgtcgcc taacatgtac gggctgaata 3540

aagaagtggt ccgtcagctc tctcgcaggt acccacaact gcctcgggca gttgccactg 3600

gaagagtcta tgacatgaac actggtacac tgcgcaatta tgatccgcgc ataaacctag 3660

tacctgtaaa cagaagactg cctcatgctt tagtcctcca ccataatgaa cacccacaga 3720

gtgacttttc ttcattcgtc agcaaattga agggcagaac tgtcctggtg gtcggggaaa 3780

agttgtccgt cccaggcaaa atggttgact ggttgtcaga ccggcctgag gctaccttca 3840

gagctcggct ggatttaggc atcccaggtg atgtgcccaa atatgacata atatttgtta 3900

atgtgaggac cccatataaa taccatcact atcagcagtg tgaagaccat gccattaagc 3960

ttagcatgtt gaccaagaaa gcttgtctgc atctgaatcc cggcggaacc tgtgtcagca 4020

taggttatgg ttacgctgac agggccagcg aaagcatcat tggtgctata gcgcggcagt 4080

tcaagttttc ccgggtatgc aaaccgaaat cctcacttga agagacggaa gttctgtttg 4140

tattcattgg gtacgatcgc aaggcccgta cgcacaatcc ttacaagctt tcatcaacct 4200

tgaccaacat ttatacaggt tccagactcc acgaagccgg atgtgcaccc tcatatcatg 4260

tggtgcgagg ggatattgcc acggccaccg aaggagtgat tataaatgct gctaacagca 4320

aaggacaacc tggcggaggg gtgtgcggag cgctgtataa gaaattcccg gaaagcttcg 4380

atttacagcc gatcgaagta ggaaaagcgc gactggtcaa aggtgcagct aaacatatca 4440

ttcatgccgt aggaccaaac ttcaacaaag tttcggaggt tgaaggtgac aaacagttgg 4500
cagaggctta tgagtccatc gctaagattg tcaacgataa caattacaag tcagtagcga 4560
ttccactgtt gtccaccggc atcttttccg ggaacaaaga tcgactaacc caatcattga 4620
accatttgct gacagcttta gacaccactg atgcagatgt agccatatac tgcagggaca 4680
agaaatggga aatgactctc aaggaagcag tggctaggag agaagcagtg gaggagatat 4740
gcatatccga cgactcttca gtgacagaac ctgatgcaga gctggtgagg gtgcatccga 4800
agagttcttt ggctggaagg aagggctaca gcacaagcga tggcaaaact ttctcatatt 4860

tggaagggac caagtttcac caggcggcca aggatatagc agaaattaat gccatgtggc 4920
ccgttgcaac ggaggccaat gagcaggtat gcatgtatat cctcggagaa agcatgagca 4980
gtattaggtc gaaatgcccc gtcgaagagt cggaagcctc cacaccacct agcacgctgc 5040
cttgcttgtg catccatgcc atgactccag aaagagtaca gcgcctaaaa gcctcacgtc 5100
cagaacaaat tactgtgtgc tcatcctttc cattgccgaa gtatagaatc actggtgtgc 5160
agaagatcca atgctcccag cctatattgt tctcaccgaa agtgcctgcg tatattcatc 5220
caaggaagta tctcgtggaa acaccaccgg tagacgagac tccggagcca tcggcagaga 5280

accaatccac agaggggaca cctgaacaac caccacttat aaccgaggat gagaccagga 5340
ctagaacgcc tgagccgatc atcatcgaag aggaagaaga ggatagcata agtttgctgt 5400
cagatggccc gacccaccag gtgctgcaag tcgaggcaga cattcacggg ccgccctctg 5460
tatctagctc atcctggtcc attcctcatg catccgactt tgatgtggac agtttatcca 5520
tacttgacac cctggaggga gctagcgtga ccagcggggc aacgtcagcc gagactaact 5580
cttacttcgc aaagagtatg gagtttctgg cgcgaccggt gcctgcgcct cgaacagtat 5640
tcaggaaccc tccacatccc gctccgcgca caagaacacc gtcacttgca cccagcaggg 5700

cctgctcgag aaccagccta gtttccaccc cgccaggcgt gaatagggtg atcactagag 5760
aggagctcga ggcgcttacc ccgtcacgca ctcctagcag gtcggtctcg agaaccagcc 5820
tggtctccaa cccgccaggc gtaaataggg tgattacaag agaggagttt gaggcgttcg 5880
tagcacaaca acaatgacgg tttgatgcgg gtgcatacat cttttcctcc gacaccggtc 5940
aagggcattt acaacaaaaa tcagtaaggc aaacggtgct atccgaagtg gtgttggaga 6000
ggaccgaatt ggagatttcg tatgccccgc gcctcgacca agaaaaagaa gaattactac 6060
gcaagaaatt acagttaaat cccacacctg ctaacagaag cagataccag tccaggaagg 6120

tggagaacat gaaagccata acagctagac gtattctgca aggcctaggg cattatttga 6180

aggcagaagg aaaagtggag tgctaccgaa ccctgcatcc tgttcctttg tattcatcta 6240

gtgtgaaccg tgccttttca agccccaagg tcgcagtgga agcctgtaac gccatgttga 6300

aagagaactt tccgactgtg gcttcttact gtattattcc agagtacgat gcctatttgg 6360

acatggttga cggagcttca tgctgcttag acactgccag tttttgccct gcaaagctgc 6420

gcagctttcc aaagaaacac tcctatttgg aacccacaat acgatcggca gtgccttcag 6480

cgatccagaa cacgctccag aacgtcctgg cagctgccac aaaaagaaat tgcaatgtca 6540

cgcaaatgag agaattgccc gtattggatt cggcggcctt taatgtggaa tgcttcaaga 6600

aatatgcgtg taataatgaa tattgggaaa cgtttaaaga aaaccccatc aggcttactg 6660

aagaaaacgt ggtaaattac attaccaaat taaaaggacc aaaagctgct gctctttttg 6720

cgaagacaca taatttgaat atgttgcagg acataccaat ggacaggttt gtaatggact 6780

taaagagaga cgtgaaagtg actccaggaa caaaacatac tgaagaacgg cccaaggtac 6840

aggtgatcca ggctgccgat ccgctagcaa cagcgtatct gtgcggaatc caccgagagc 6900

tggttaggag attaaatgcg gtcctgcttc cgaacattca tacactgttt gatatgtcgg 6960

ctgaagactt tgacgctatt atagccgagc acttccagcc tggggattgt gttctggaaa 7020

ctgacatcgc gtcgtttgat aaaagtgagg acgacgccat ggctctgacc gcgttaatga 7080

ttctggaaga cttaggtgtg gacgcagagc tgttgacgct gattgaggcg gctttcggcg 7140

aaatttcatc aatacatttg cccactaaaa ctaaatttaa attcggagcc atgatgaaat 7200

ctggaatgtt cctcacactg tttgtgaaca cagtcattaa cattgtaatc gcaagcagag 7260

tgttgagaga acggctaacc ggatcaccat gtgcagcatt cattggagat gacaatatcg 7320

tgaaaggagt caaatcggac aaattaatgg cagacaggtg cgccacctgg ttgaatatgg 7380

aagtcaagat tatagatgct gtggtgggcg agaaagcgcc ttatttctgt ggagggttta 7440

ttttgtgtga ctccgtgacc ggcacagcgt gccgtgtggc agacccccta aaaaggctgt 7500

ttaagcttgg caaacctctg gcagcagacg atgaacatga tgatgacagg agaagggcat 7560

tgcatgaaga gtcaacacgc tggaaccgag tgggtattct ttcagagctg tgcaaggcag 7620

tagaatcaag gtatgaaacc gtaggaactt ccatcatagt tatggccatg actactctag 7680

ctagcagtgt taaatcattc agctacctga gaggggcccc tataactctc tacggctaac 7740

ctgaatggac tacgacatag tctagtccgc caagggcgcg ccttcgaagg ccggccgttt 7800

aaacatggtc ttcacactcg aagatttcgt tggggactgg cgacagacag ccggctacaa 7860

cctggaccaa gtccttgaac agggaggtgt gtccagtttg tttcagaatc tcggggtgtc 7920

cgtaactccg atccaaagga ttgtcctgag cggtgaaaat gggctgaaga tcgacatcca 7980

tgtcatcatc ccgtatgaag gtctgagcgg cgaccaaatg ggccagatcg aaaaaatttt 8040

taaggtggtg taccctgtgg atgatcatca ctttaaggtg atcctgcact atggcacact 8100

ggtaatcgac ggggttacgc cgaacatgat cgactatttc ggacggccgt atgaaggcat 8160

cgccgtgttc gacggcaaaa agatcactgt aacagggacc ctgtggaacg gcaacaaaat 8220

tatcgacgag cgcctgatca accccgacgg ctccctgctg ttccgagtaa ccatcaacgg 8280

agtgaccggc tggcggctgt gcgaacgcat tctggcgtaa gcggccgccc tgcagggcga 8340

tcgcatacag cagcaattgg caagctgctt acatagaact cgcggcgatt ggcatgccgc 8400

cttaaaattt ttattttatt tttcttttct tttccgaatc ggattttgtt tttaatattt 8460

caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaatcgc 8520

gacagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa 8580

aaaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg 8640

caataaacaa gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggaggt 8700

gtgggaggtt ttttaggacc cggctaggct ggcggggttg ccttactggt tagcagaatg 8760

aatcaccgat acgcgagcga acgtgaagcg actgctgctg caaaacgtct gcgacctgag 8820

caacaacatg aatggtcttc ggtttccgtg tttcgtaaag tctggaaacg cggaagtcag 8880

cgccctgcac cattatgttc cggatctgca tcgcaggatg ctgctggcta ccctgtggaa 8940

cacctacatc tgtattaacg aagcgctggc attgaccctg agtgattttt ctctggtccc 9000

gccgcatcca taccgccagt tgtttaccct cacaacgttc cagtaaccgg gcatgttcat 9060

catcagtaac ccgtatcgtg agcatcctct ctcgtttcat cggtatcatt acccccatga 9120

acagaaatcc cccttacacg gaggcatcag tgaccaaaca ggaaaaaacc gcccttaaca 9180

tggcccgctt tatcagaagc cagacattaa cgcttctgga gaaactcaac gagctggacg 9240

cggatgaaca ggcagacatc tgtgaatcgc ttcacgacca cgctgatgag ctttaccgca 9300

gctgcctcgc gcgtttcggt gatgacggtg aaaacctctg acacatgcag ctcccggaga 9360

cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca agcccgtcag ggcgcgtcag 9420

cgggtgttgg cgggtgtcgg ggcgcagcca tgacccagtc acgtagcgat agcggagtgt 9480

atactggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg 9540

tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc aggcgctctt ccgcttcctc 9600

gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcactcaaa 9660

ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 9720

aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 9780

ccgccccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac 9840

aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctcgtgcgct ctcctgttcc 9900

gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc 9960
tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg 10020
tgtgcacgaa ccccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga 10080
gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag 10140
cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtggccta actacggcta 10200
cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag 10260
agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg 10320

caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac 10380
ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagattatc 10440
aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag 10500
tatatatgag taaacttggt ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc 10560
agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac 10620
gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc 10680
accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg 10740

tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag 10800
tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctgcaggca tcgtggtgtc 10860
acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac 10920
atgatccccc atgttgtgca aaaaagcggt tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag 10980
aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcactgcata attctcttac 11040
tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg 11100
agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaacacggg ataataccgc 11160

gccacatagc agaactttaa aagtgctcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact 11220
ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg 11280
atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa 11340
tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttcctttt 11400
tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg 11460
tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga 11520
cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc 11580

ctttcgtctt caagaa 11596

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VEEV_gblock2_fwd primer

<400> 7

tcattcagct acctgagagg g 21

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VEEV_gblock2_rev primer

<400> 8

aaataaaaat tttaaggcgg catgc 25

<210> 9

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VEEV_Oligo1_fwd primer

<400> 9

ttaaaatttt tattttattt ttcttttctt ttccgaatcg gattttgttt ttaatatttc 60

<210> 10

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VEEV_Oligo2_rev primer

<400> 10

catcaatgta tcttatcatg tctgtcgcga ttttttttt ttttttttt ttttttttt 60

ttttttttt ttttttttt tttttgaaat attaaaaaca 100

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 11

ccggcccgga ccgacaagtc tctatcacc 29

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 12

ggccgggggc ccctctcagg tagctgaatg 30