(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0021626
(43) 공개일자 2015년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0098778
(22) 출원일자 2013년08월20일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
박인호
서울 서초구 효령로 59-8, 502호 (방배동, 강남아트빌)
김경효
서울 양천구 목동동로 391, 901호 (목동, 현대파크빌아파트)
(74) 대리인
이원희

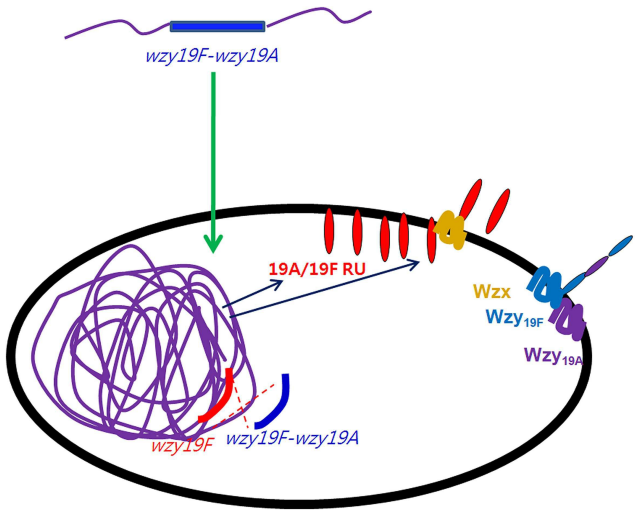
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **하이브리드 다혈청형 피막 다당체 생산 폐렴구균 및 상기 균주로부터 생산된 하이브리드 다혈청형 피막 다당체**

(57) 요 약

본 발명은 하이브리드(hybrid) 다혈청형(polyserotype) 피막 다당체(capsular polysaccharide)를 생산하는 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*) 균주 및 상기 균주로부터 생산된 하이브리드 다혈청형 피막 다당체에 관한 것으로, 구체적으로 혈청형 19A 폐렴구균의 반복단위체 중합효소의 *wzy*19A 유전자 및 혈청형 19F 폐렴구균의 반복단위체 중합효소의 *wzy*19F를 연결하여 제조한 폐렴구균은 19A 및 19F의 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 효과적으로 생산하는 것을 확인함으로써, 상기 폐렴구균 및 이로부터 생산된 하이브리드 다혈청형 피막 다당체는 폐렴구균에 대한 백신으로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도9



형질전환체 (혈청형 19F)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012R1A1A2005675
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-일반연구자지원사업-기본연구
연구과제명 폐구균 협막 다당체의 생합성 기전을 이용한 협막 다당 백신 유도체 개발
기 여 율 1/1
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

스트렙토코커스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*) 유래의 동일 반복 단위체 중합효소의 *wzy*19A 및 *wzy*19F 유전자가 연결된 병렬 유전자를 포함하는 유전자 카세트가 폐렴구균에 형질전환된 19A 및 19F 하이브리드(hybrid) 다혈청형(polyserotype) 피막 다당체(capsule polysaccharide) 생산용 형질전환 폐렴구균 균주.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유전자 카세트는 도 7의 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 하이브리드 다혈청형 피막 다당체 생산용 형질전환 폐렴구균 균주.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 *wzy*19A 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체 생산용 형질전환 폐렴구균 균주.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 *wzy*19F 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체 생산용 형질전환 폐렴구균 균주.

청구항 5

제 1항의 폐렴구균에 의해 생산되는 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체.

청구항 6

제 5항의 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 포함하는 폐렴구균 예방 및 치료용 백신 조성물.

청구항 7

1) *S. 뉴모니아에 wzy*19A 및 *wzy*19F 유전자가 연결된 병렬 유전자를 포함하는 유전자 카세트를 제조하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 유전자 카세트를 피막 다당체 비생산 폐렴구균, 또는 *wzy*19A 또는 *wzy*19F 폐렴구균에서 각각 *wzy*19A 또는 *wzy*19F 유전자가 제거된 폐렴구균에 형질전환하는 단계를 포함하는, 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체 생산용 형질전환 폐렴구균의 제조 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 *wzy*19A 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체 생산용 형질전환 폐렴구균의 제조 방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 *wzy*19F 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체 생산용 형질전환 폐렴구균의 제조 방법.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 단계 2)의 형질전환은 리포펙타민(Lipofectamine), 도진도(Dojindo)사의 힐리맥스(Hilymax), 퓨젠(Fugene), 제트 피이아이(jetPEI), 이펙텐(Effectene) 및 드림펙트(DreamFect)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 상용화된 형질도입용 시약을 이용하는 방법; 칼슘-인산(calcium-phosphate), 양전하성 고분자, 리포좀, 나노입자, 뉴클레오펙션(nucleofection), 전기 천공법(electroporation), 열 충격(heat shock), 마그네토펙션(magnetofection)을 이용하는 방법; 레트로 바이러스(retrovirus)를 이용하는 방법; 및 수용능 자극 펩티드(competence stimulatory peptide)를 이용하는 방법으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체 생산용 형질전환 폐렴구균의 제조 방법.

청구항 11

제 7항에 있어서, 상기 유전자 제거는 야누스 카세트(Janus cassette)를 제조하는 방법 또는 pVA891 플라스미드 벡터와 같은 벡터 삽입에 의한 유전자 불활성 (insertional gene inactivation) 기법 중 어느 하나로 수행되는 것을 특징으로 하는 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체 생산용 형질전환 폐렴구균의 제조 방법.

청구항 12

1) 제 1항의 폐렴구균 균주를 배양하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 배양액으로부터 19A 및 19F의 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 수득하는 단계를 포함하는 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체의 제조 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 하이브리드(hybrid) 다혈청형(polyserotype) 피막 다당체(capsular polysaccharide)를 생산하는 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*) 균주 및 상기 균주로부터 생산된 하이브리드 다혈청형 피막 다당체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 스트렙토코커스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*)는 폐구균 또는 폐렴구균으로도 잘 알려진 사람의 병원체이며 어린이와 노인에게서 주로 폐렴(pneumonia), 수막염(meningitis), 패혈증(sepsis) 및 중이염(otitis media)을 유발한다. *S. 뉴모니아에*(*S. pneumoniae*)에는 피막 다당체(capsular polysaccharide; capsular PS)의 혈청학적 특성에 따라 94가지 혈청형으로 분류된다.

[0003] 상기 피막 다당체에 대한 항체는 혈청형 피막을 발현하는 폐렴구균에 대한 방어 기작을 가질 수 있다. 따라서, 현재 개발되어 사용되는 폐렴구균의 백신은 다양한 혈청형의 피막 다당체의 혼합물을 포함한다. 예를 들면, PS 백신이라 불리는 다당체 백신은 흔하게 발견되는 23가지 혈청형의 피막 다당체를 포함하며, 최근에 개발된 폐렴구균 결합백신(pneumococcal conjugate vaccine, PCV)은 여러 가지 혈청형의 피막 다당체가 단백질 분자와 결합된 형태를 가진다. 초기의 PCV는 7가지 혈청형의 피막을 포함하여 개발되었으나(PCV7), 현재는 10가지(PCV10) 또는 13가지(PCV13)의 혈청형 피막 다당체를 포함한 백신이 개발되어 사용되고 있다. 2000년에 미국에서 처음 사용된 PCV7의 보급을 통해, 어린이와 성인에게서 침습성 폐렴구균성 감염이 크게 감소하였다.

[0004] 최근, 효과적인 폐렴구균 백신이 개발됨에 따라, 백신에서 포함하는 혈청형의 폐렴구균에 의한 감염률이 크게 감소하였으나, 백신에서 포함하지 않는 비백신 혈청형의 폐렴구균에 의한 감염은 여전히 계속되고 있다. 이에, 종래의 백신 혈청형에 대한 백신의 개발 대신에, 비백신 혈청형의 폐렴구균, 특히 6A 및 19A와 같은 혈청형 폐렴구균에 의한 감염을 예방 및 치료하기 위한 비백신 혈청형의 폐렴구균에 대한 백신의 개발 및 보급이 요구되고 있다.

[0005] 이러한 현상에 대한 대책으로 폐렴구균 혈청형에 대한 모니터링이 현재에도 지속적으로 진행되고 있으며, 현재 PCV7을 개선하기 위한 백신으로서 백신 혈청형(4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F)이외에도, 추가적으로 혈청형 1, 5 및 7F을 포함한 PCV10이 개발되었고, 이에 혈청형 6B 및 19F의 교차 혈청형인 6A 및 19A을 추가로 포함하는 PCV13이 개발되어 전 세계 여러 나라에서 사용되고 있다. 아울러, 현재 PCV13의 13가지 혈청형 이외에 두 가지 혈청형인 22F 및 33F를 포함한 PCV15 백신이 개발중에 있다.

[0006] 아울러, 다혈청형 피막 다당체를 생산하는 폐렴구균을 제조하여 이를 포함하는 백신의 개발이 이루어지고 있다. 국제특허 WO 2008/138120 A1은 혈청형 6B 폐렴구균의 갈락토오즈 전달효소(wciNa)를 포도당 전달효소(wciNb)로 치환하여 혈청형 6B를 혈청형 6D로 전환된 폐렴구균에 관하여 개시하고 있으며, Carmen L. 등의 연구에서는 혈청형 6의 *wciP* 유전자 염기서열의 변형에 따른 다형성(polymorphism)에 의하여 6A 및 6B의 두 가지 혈청형을 가지는 폐렴구균에 대하여 개시(Clin. Vaccine Immunol. 2010, 17(11):1820)하고 있으나, 피막 다당체의 반복단위체 중합효소를 플라스미드 운반체 또는 병렬유전자 서열의 형태로 폐렴구균에 도입하여 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 생산하는 폐렴구균에 대하여는 알려진 바가 없다.

[0007] 따라서, 본 발명자들은 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 생산하는 폐렴구균을 제조하기 위해 노력한 결과, 혈청형 19A 폐렴구균의 반복단위체 중합효소인 *wzy*19A 유전자 및 혈청형 19F 폐렴구균의 반복단위체 중합효소인 *wzy*19F 유전자를 연결하여 제조한 폐렴구균은 19A 및 19F의 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 효과적으로 생산하므로, 상기 폐렴구균 및 이로부터 생산된 하이브리드 다혈청형 피막 다당체는 폐렴구균에 대한 백신으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 하이브리드(hybrid) 다혈청형(poly serotype) 피막 다당체(capsular polysaccharide)를 생산하는 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*) 균주 및 상기 균주로부터 생산된 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 스트렙토코커스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*) 유래의 동일 반복 단위체 중합효소의 *wzy*19A 및 *wzy*19F 유전자가 연결된 병렬 유전자를 포함하는 유전자 카세트가 폐렴구균에 형질전환된 19A 및 19F 하이브리드(hybrid) 다혈청형(polyserotype) 피막 다당체(capsule polysaccharide) 생산용 형질전환 폐렴구균 균주를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 폐렴구균에 의해 생산되는 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 포함하는 폐렴구균 예방 및 치료용 백신 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은

[0013] 1) *S. 뉴모니아에 wzy*19A 및 *wzy*19F 유전자가 연결된 병렬 유전자를 포함하는 유전자 카세트를 제조하는 단계;

및

[0014] 2) 상기 단계 1)의 유전자 카세트를 피막 다당체 비생산 폐렴구균, 또는 *wzy*19A 또는 *wzy*19F 폐렴구균에서 각각 *wzy*19A 또는 *wzy*19F 유전자가 제거된 폐렴구균에 형질전환하는 단계를 포함하는, 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체 생산용 형질전환 폐렴구균의 제조 방법을 제공한다.

[0015] 아울러, 본 발명은

[0016] 1) 상기 폐렴구균 균주를 배양하는 단계; 및

[0017] 2) 상기 단계 1)의 배양액으로부터 혈청형 19A 및 19F의 하이브리드 피막 다당체를 수득하는 단계를 포함하는 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체의 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 혈청형 19A 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)의 반복단위체 중합효소의 *wzy*19A 유전자 및 혈청형 19F 폐렴구균의 반복단위체 중합효소의 *wzy*19F 유전자를 연결하여 제조한 폐렴구균은 19A 및 19F의 하이브리드 다혈청형 피막 다당체(capsule polysaccharide)를 효과적으로 생산하므로, 상기 폐렴구균 및 이로부터 생산된 하이브리드 다혈청형 피막 다당체는 폐렴구균에 대한 백신으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 혈청형 19A 폐렴구균 균주인 스트렙토코커스 뉴모니아에 TREP19A(*Streptococcus pneumoniae* TREP19A)의 피막 합성 유전자좌 모식도를 나타내는 도이다.

도 2는 혈청형 19F 폐렴구균 균주인 스트렙토코커스 뉴모니아에 EF3030(*Streptococcus pneumoniae* EF3030) 내에 플라스미드 운반체를 통해 *wzy*19A 유전자를 도입하여 합성한 하이브리드(hydrid) 피막 다당체(capsule polysaccharide)의 형성을 보이는 모식도이다.

도 3는 샌드위치 효소면역측정법(sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay; sandwich ELISA)의 양성 및 음성 반응에 따른 피막 다당체 생성 결과를 예상하는 도이다.

도 4은 샌드위치 효소면역측정법을 통한 하이브리드 피막 다당체의 혈청형 분석을 나타내는 도이다.

도 5은 *S. 뉴모니아에* EF3030의 피막 합성 유전자좌 모식도를 나타내는 도이다.

도 6는 *wzy*19F 유전자를 제거하기 위해 제조한 야누스 카세트(Janus cassette)의 구조를 나타내는 도이다.

도 7는 wzy19F-wzy19A 중합효소의 유전자를 연결하여 제조한 병렬유전자 카세트의 구조를 나타내는 도이다.

도 8은 야누스 카세트를 이용하여 혈청형 19F 폐렴구균의 피막 다당체 합성 유전자좌 안으로 *wzy*19F-*wzy*19A 병렬유전자 카세트를 도입하는 과정을 나타내는 모식도이다.

도 9은 야누스 카세트를 통해 *wzy*19F-*wzy*19A 유전자를 도입하여 합성한 하이브리드 피막 다당체의 형성을 보이는 모식도이다.

도 10는 유동 혈구 혈청형 분석법(Flow cytometric serotyping assay; FCSA)을 통한 하이브리드 피막 다당체의 혈청형 분석을 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명은 스트렙토코커스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*) 유래의 동일 반복 단위체 중합효소의 *wzy*19A 및 *wzy*19F 유전자가 연결된 병렬 유전자를 포함하는 유전자 카세트가 폐렴구균에 형질전환된 19A 및 19F 하이브리드(hybrid) 다혈청형(polyserotype) 피막 다당체(capsule polysaccharide) 생산용 형질전환 폐렴구균 균주를 제공한다.

[0022] 상기 유전자 카세트는 도 7의 구조를 가지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다(도 7 참조).

[0023] 상기 *wzy*19A 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 구성되고 상기 *wzy*19F 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 구성되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 플라스미드 형질전환체를 이용한 하이브리드 피막 다당체를 발현하는 폐렴구균을 제조하기 위하여, 혈청형 19A 폐렴구균 균주인 *S. 뉴모니아에* TREP19A로부터 반복단위체 중합효소인 *wzy*19A 유전자를 수득한 다음(도 1 참조), pVPT-T7 벡터에 삽입하여 pIH12_02 플라스미드를 제조하였고, 상기 플라스미드를 혈청형 19F인 *S. 뉴모니아에* EF3030 폐렴구균에 형질전환하여 배양한 결과(도 2 참조), 혈청형 19A 및 19F 피막 다당체를 동시에 발현하는 폐렴구균 균주가 제조된 것을 확인하였다(도 3 및 4 참조).

[0025] 또한, 본 발명자들은 폐렴구균의 DNA 형질전환을 이용한 하이브리드 피막 다당체를 발현하는 폐렴구균을 제조하기 위하여, 혈청형 19F 피막 다당체를 발현하는 *S. 뉴모니아에* TIGR19F 균주의 유전자에서 반복단위체 중합효소의 *wzy*19F 유전자를 제거하기 위한 야누스 카세트를 제조하였고(도 5 및 도 6, 및 표 1 참조), 이를 이용하여 *wzy*19F-*wzy*19A 유전자를 병렬로 연결한 병렬유전자 카세트 DNA를 제조한 다음(도 7 및 도 8, 및 표 2 참조), 상기 카세트 DNA를 피막 다당체를 발현하지 않는 *S. 뉴모니아에* TIGH19X에 형질전환하여 배양한 결과(도 9 참조), 19A 및 19F의 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 발현하는 폐렴구균 균주가 제조된 것을 확인하였다(도 10 참조).

[0026] 따라서, 본 발명의 *wzy*19A 및 *wzy*19F 유전자를 연결하여 제조한 병렬유전자 카세트가 형질전환된 폐렴구균은 19A 및 19F의 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 효과적으로 생산하므로, 상기 폐렴구균 및 이로부터 생산된 하이브리드 다혈청형 피막 다당체는 폐렴구균에 대한 예방 및 치료용 백신 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 폐렴구균에 의해 생산되는 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 포함하는 폐렴구균 예방 및 치료용 백신 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명의 19A 및 19F의 하이브리드 다혈청형 피막 다당체는 19A 및 19F의 혈청형 피막 다당체를 동시에 나타내므로, 상기 하이브리드 다혈청형 피막 다당체는 폐렴구균에 대한 예방 및 치료용 백신 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 포함하는 폐렴구균 예방 및 치료용 백신 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0031] 상기 백신 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성화합물과 결합하여 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 포함하는 백신 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 들의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0033] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크

같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명의 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 포함하는 백신 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으나, 0.1 내지 1000 mg/kg의 양을 1주에 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한, 그 투여량은 투여경로, 질환의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0035] 또한, 본 발명은

[0036] 1) *S. 뉴모니아에 wzy*19A 및 *wzy*19F 유전자가 연결된 병렬 유전자를 포함하는 유전자 카세트를 제조하는 단계; 및

[0037] 2) 상기 단계 1)의 유전자 카세트를 피막 다당체 비생산 폐렴구균, 또는 wzy19A 또는 wzy19F를 발현하는 폐렴구균에서 각각 *wzy*19A 또는 *wzy*19F 유전자가 제거된 폐렴구균에 형질전환하는 단계를 포함하는, 혈청형 19A 및 19F의 하이브리드 피막 다당체 생산용 형질전환 폐렴구균의 제조 방법을 제공한다.

[0038] 아울러, 본 발명은

[0039] 1) 본 발명의 폐렴구균 균주를 배양하는 단계; 및

[0040] 2) 상기 단계 1)의 배양액으로부터 19A 및 19F의 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 수득하는 단계를 포함하는 19A 및 19F 하이브리드 다혈청형 피막 다당체의 제조 방법을 제공한다.

[0041] 상기 *wzy*19A 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 구성되고 상기 *wzy*19F 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 구성되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0042] 상기 형질전환은 리포펙타민(Lipofectamine), 도진도(Dojindo)사의 힐리맥스(Hilymax), 퓨젠(Fugene), 제트 피이아이(jetPEI), 이펙텐(Effectene) 및 드림펙트(DreamFect)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 상용화된 형질도입용 시약을 이용하는 방법; 칼슘-인산(calcium-phosphate), 양전하성 고분자, 리포좀, 나노입자, 뉴클레오펙션(nucleofection), 전기 천공법(electroporation), 열 충격(heat shock), 마그네토펙션(magnetofection)을 이용하는 방법; 레트로 바이러스(retrovirus)를 이용하는 방법; 및 수용능 자극 펩티드(competence stimulatory peptide)를 이용하는 방법으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법인 것이 바람직하며, 구체적으로는 전기 천공법 또는 수용능 자극 펩티드을 이용하는 방법이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로는 수용능 자극 펩티드를 이용하는 방법이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0043] 상기 유전자 제거는 야누스 카세트(Janus cassette)를 제조하는 방법 또는 pVA891 플라스미드 벡터와 같은 벡터 삽입에 의한 유전자 불활성 (insertional gene inactivation) 기법 중 어느 하나로 수행되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0044] 본 발명의 제조 방법으로 생산된 폐렴구균은 19A 및 19F의 하이브리드 다혈청형 피막 다당체를 효과적으로 생산하므로, 상기 제조 방법을 통해 폐렴구균 및 이로부터 생산된 하이브리드 다혈청형 피막 다당체는 폐렴구균에 대한 백신으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0045] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0046] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0047] **<실시예 1> 플라스미드 형질전환체를 이용한 하이브리드(hybrid) 피막 다당체(capsule polysaccharide) 발현 폐**

렴구균의 제조

[0048] **<1-1> 스트렙토코커스 뉴모니아에 TREP19A(*Streptococcus pneumoniae* TREP19A)의 분해액 제조**

[0049] 혈청형 19A 폐렴구균 균주인 *S. 뉴모니아에* TREP19A로부터 동일한 반복단위체 중합효소의 *wzy*19A 유전자를 수득하기 위해, *S. 뉴모니아에* TREP19A 균주로부터 전체 유전체를 분리하였다.

[0050] 구체적으로, *S. 뉴모니아에* TREP19A(Burton *et al.*, 2006**; 상기 문헌의 출처를 구체적으로 기재하여 주시기 바랍니다.)** 균주를 트립신 소이 액체배지(Tryptic soy broth; TSB), 1.5% 한천(agar) 및 5% 면양 적혈구(Sheep red blood cell; SRBC)를 포함하는 혈액한천배지(blood agar medium; 한일 코메드 사)에 접종하여 5% 이산화탄소 배양기를 사용해 37℃에서 하룻밤 동안 배양한 다음, 생성된 2 내지 3개의 균집락(colony)을 선별하여 토드 헤위트(Todd Hewitt) 액체 배지(BD Bioscience에서 구입) 및 0.5% 효모 추출물(Yeast extract; BD Bioscience 사에서 구입)을 포함하는 THY 배지에 현탁한 후, 600 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였을 때 0.6이 될 때까지 37℃에서 배양하였다. 그런 다음, 배지를 원심분리하여 상층액을 제거하여 균체를 수득하였으며, 0.1% 소듐 디옥시콜레이트(sodium deoxycholate), 0.01% 도데실황산나트륨(sodium dodecyl sulfate) 및 0.15 M 초산나트륨(sodium acetate)을 포함하는 균분해 완충용액(cell-lysis buffer)를 0.1 ㎖ 첨가하여 현탁하고, 37℃에서 10분간 반응하였다. 반응 후, 0.15 M 염화나트륨 및 0.015 M 구연산나트륨(sodium citrate)을 포함하는 살리신-구연산 나트륨 완충용액(saline-sodium citrate buffer; SSC buffer) 0.9 ㎖을 첨가하여 65℃에서 15 분간 반응하였다.

[0051] 그 결과, *S. 뉴모니아에* TREP19A 균주의 전체 유전체(genome)을 포함하는 균주 분해액을 제조하였으며, 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

[0052] **<1-2> *wzy*19A 유전자 클로닝을 위한 벡터의 제조**

[0053] *wzy*19A 유전자를 클로닝하기 위한 벡터를 제조하기 위해서, pVPT-T7 벡터(Zuou, M *et al.*, 2008. J Microbiol Methods 72(3):249-56)를 증폭하였다.

[0054] 구체적으로, 대장균 TOP10(*E. coli* TOP10; 인비트로젠 사)에 pVPT-T7 플라스미드 10 ng를 첨가하고 얼음 위에서 30 분간 방치한 다음, 42℃의 항온 수조에서 1 분간 반응하여 열충격(heat-shock)을 주어 상기 플라이스미드가 대장균 내로 삽입되도록 유도하였다. 반응 후에는 대장균을 즉시 얼음으로 옮겨 신속하게 냉각하고, 초최적 액체배지(Super Optimal Broth, SOB; 인비트로젠 사) 1 ㎖을 상기 대장균에 첨가한 다음, 200 rpm의 37℃ 배양기에서 40 분간 진탕배양하였다. 그런 다음, 300 ㎍/㎖ 에리스로마이신(erythromycin; 시그마-알드리치 사)를 항생제로 포함하는 LB 평판배지에 도말하여 37℃에서 하룻밤 동안 배양한 다음, 명확하게 생성된 균집락(colony)을 선별하여 에리스로마이신을 포함하는 50 ㎖ LB 액체 배지에 접종하여 진탕 배양하였다. 배양한 배지를 수득하여 미디 플라스미드 정제 키트(Midi plasmid purification Kit; Qiagen 사에서 구입)을 사용하여 pVPT-T7 벡터를 정제한 다음, *Kpn*I 제한 효소를 처리하여 선형의 DNA를 준비하였다.

[0055] **<1-3> *wzy*19A 유전자의 클로닝**

[0056] 혈청형 19A인 폐렴구균 균주의 도 1로 구성되는 피막 합성 유전자좌로부터 동일한 반복단위체 중합효소의 *wzy*19A 유전자를 수득하기 위해, *S. 뉴모니아에* TREP19A의 전체 유전체로부터 *wzy*19A 유전자를 클로닝하여 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 pVPT-T7 플라스미드에 삽입하였다.

[0057] 구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에서 수득한 균주 분해액을 주형으로 하고, P5109 정방향 프라이머(서열번호 5: AAAGGTACCATGACTTATTTATTTTTACTCTG) 및 P3109 역방향 프라이머(서열번호 6: AAGGATCCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGTTTTCCGATTTAATACTTGTGTCAGAG)를 사용해 서열번호 1의 염기서열로 구성된 *wzy*19A 유전자를 Taq DNA 중합 효소(TaKaRa Ex Taq 사에서 구입; 제품 번호: TaKaRa Code RR001AM)을 이용한 PCR로 증폭하였고, 증폭된 DNA의 염기서열을 분석하여 확인한 후, *Kpn*I 제한 효소를 처리하여 절단ㅎ한 선형(linear form)의 *wzy*19A 절편 DNA을 준비하였다. 그런 다음, *wzy*19A DNA 및 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 pVPT-T7 벡터를 정량하여 동량의 비율로 혼합한 후, RBC 래피드 라이게이션 키트(RBC rapid ligation kit, Real Biotech Co.에서 구입; 제품번호: RC001)를 사용하여 T4 연결효소(T4 ligase)로 상기 플라스미드 및 DNA를 연결하였고, 이를 5730 정방향 프라이머(서열번호 7: ATGGCTAGTATGACAGGAGGTCAACAAATGGGATAG) 및 P3107 역방향 프라이머(서열번호 8: aAAggatccTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGG)와 함께 PCR하여 선형 DNA 산물을 증폭하

였다. 상기 선형 DNA 산물은 다시 *Bam*HI 제한효소를 처리하여 양 단면을 절단한 다음, 위자드 SV 젤 및 PCR 클린-업 키트(Wizard SV Gel and PCR clean-up kit; 프로메가 사)를 사용하여 정제하였으며, T4 연결효소로 환형(circular form)의 플라스미드 DNA를 제조하였다. 제조된 플라스미드 DNA는 상기 실시예 <1-2>와 동일한 방법으로 대장균 TOP10 숙주에 형질전환하여 에리스로마이신으로 선별한 후, 5730 정방향 프라이머(서열번호 7) 및 P3107 역방향 프라이머(서열번호 8)를 사용한 PCR을 재수행하여 *wzy*19A 유전자의 도입을 확인하였다.

[0058] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 서열목록 1로 구성되는 1362 bp 길이의 *wzy*19A 유전자가 7287 bp의 pVPT-T7 벡터로 삽입되어 제조된 8608 bp의 길이를 가지는 플라스미드를 확인하였으며, 상기 플라스미드를 pIH12_02로 명명하였다(도 2).

[0059] **<1-4> 형질전환용 세포(competent cell)의 준비**

[0060] 상기 실시예 <1-3>에서 제조한 pIH12_02 플라스미드를 혈청형 19F인 *S. 뉴모니아에* EF3030 폐렴구균 균주에 형질전환(tranformation)하기 위해, *S. 뉴모니아에* EF3030 균주의 형질전환용 세포를 준비하였다.

[0061] 구체적으로, *S. 뉴모니아에* EF3030(Dr. David E. Briles) 폐렴구균을 혈액 한천 배지에 접종하여 5% 이산화탄소 배양기를 사용해 37℃에서 하룻밤 동안 배양한 다음, 생성된 2 내지 3개의 균집락을 선별하여 THY 배지에 현탁한 후, 600 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였을 때, 흡광도가 0.6이 될 때까지 37℃에서 배양하였다. 그런 다음, 배지를 100 ㎕ 수득하여 0.2% 소혈청알부민(bovine serum albumin; BSA) 및 0.02% 염화칼슘($CaCl_2$)을 포함하는 THY 액체배지인 pH 7.2의 형질전환용 배지(competent media) 10 ㎖에 1:100의 비율로 희석하였고, 1.5 ㎖ 마이크로튜브에 200 ㎕씩 분주한 후, 80% 글리세롤(glycerol)을 50 ㎕ 씩 첨가하였다.

[0062] 그 결과, 형질전환용 세포를 제조하였으며, 상기 세포는 영하 80℃에서 냉동보관하거나 또는 바로 신선한 상태에서 형질전환에 사용하였다.

[0063] **<1-5> *S. 뉴모니아에* EF3030 폐렴구균 균주로 pIH12_02 플라스미드의 형질전환**

[0064] 혈청형 19F의 *S. 뉴모니아에* EF3030에서 wzy19A에 의해 합성되는 피막 다당체를 발현하기 위해, 상기 실시예 <1-3>에서 제조한 pIH12_02 플라스미드를 *S. 뉴모니아에* EF3030 폐렴구균 균주에 형질전환하였다.

[0065] 구체적으로, 상기 실시예 <1-4>에서 제조한 *S. 뉴모니아에* EF3030 형질전환용 세포 100 ㎕에 수소-Glu-Met-Arg-Ile-Ser-Arg-Ile-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu의 서열로 구성되는 수용능 자극 펩티드 2형(Competence stimulatory peptide type 2, CSP-2; 하나스펙 사, 제품 번호 ANA63877) 250 ng을 첨가하여 37℃에서 14 분간 반응한 후, 상기 실시예 <1-4>에서 제조한 pIH12_02 플라스미드 1 ㎍을 첨가하여 37℃에서 2 시간 동안 반응하였다. 반응 후, 0.5 ug/㎖의 젠타마이신(gentamicin; 시그마-알드리치 사) 및 5 ug/㎖의 에리스로마이신을 포함하는 혈액한천배지에 도말하여 37℃에서 하룻밤 동안 배양한 다음, 알파-용균(α-lysis)이 일어난 균집락(colony)을 선별하여 1 ㎖ THY 액체 배지에 접종하였고, 600 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 OD값이 0.5가 될 때까지 진탕 배양하였다. 배양 후, 배지를 수득하여 동량의 THY 액체 배지를 첨가하여 희석한 다음, 80% 글리세롤 500 ㎕를 첨가였고, 500 ㎕ 씩 분주하여 영하 80℃에서 폐렴구균을 보관하였다.

[0066] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 *wzy*19A 및 19F 피막 다당체를 동시에 발현하는 폐렴구균을 제조하였다(도 2).

[0067] **<1-6> *wzy*19A 및 19F 피막 다당체의 발현 확인**

[0068] 혈청형 19F의 *S. 뉴모니아에* EF3030에서 *wzy*19A 및 19F 피막 다당체의 발현을 확인하기 위해, 샌드위치 효소면역측정법(sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay; sandwich ELISA)을 수행하였다.

[0069] 구체적으로, 상기 실시예 <1-5>에서 배양 후 배지를 수득하거나 또는 영하 80℃에서 보관한 폐렴구균을 실온에서 녹인 후, 7×균분해 완충용액(cell-lysis buffer)을 첨가하여 37℃에서 15 분간 반응하여 폐렴구균 분해액을 준비하였다. 그런 다음, 캡쳐 항체(Capture antibody)로 400 ㎍/㎖의 항-마우스 IgG 항체 50 ㎕를 PBS에 첨가하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응하여 ELISA 플레이트에 고정하였다. 고정 후, 흡출기(Aspirator)로 상기 PBS를 제거하고, 0.05% 트윈20(Tween20)을 포함하는 PBS 용액(PBS-T 용액)으로 3 회 세척한 다음, 1% BSA를 포함하는

PBS 용액(PBS-BSA 용액)으로 19A 피막 다당체에 특이적인 IgG 이소타입(isotype)의 Hyp19AG1 항체(알라바마 주립대학 Moon H. Nahm 박사 제공)를 1:100의 비율로 희석하여 상기 ELISA 플레이트에 50 ㎕를 첨가하고, 37℃에서 1 시간 동안 반응하였다. 반응 후, PBS-T 용액으로 5 회 세척하여 상기 준비한 폐렴구균 분해액을 1:10, 1:100, 1:1000 및 1:10000의 비율로 희석해 ELISA 플레이트의 각 웰에 50 ㎕ 씩 첨가하여 37℃에서 1 시간 동안 반응하고, PBS-T 용액으로 5 회 세척하였다. 그런 다음, PBS-BSA 용액으로 19F 피막 다당체에 특이적인 IgG 이소타입(isotype)의 Hyp19FM1 항체(알라바마 주립대학 Moon H. Nahm 박사 제공)를 1:100의 비율로 희석하여 상기 ELISA 플레이트에 50 ㎕를 첨가하고, 37℃에서 1 시간 동안 반응한 후, PBS-T 용액으로 5 회 세척하였다. 2차 컨쥬게이트(conjugate) 항체로 항-마우스 IgM-겨자무과산화효소(horseradish peroxidase;HRP) 항체(시그마-알드리치 사)를 PBS-BSA로 희석하여 ELISA 플레이트의 각 웰에 50 ㎕ 씩 첨가하고, 37℃에서 1 시간 동안 반응한 후, 흡출기로 반응액을 제거하여 PBS-T 용액으로 5 회 세척하였다. 그런 다음, 3,3'5,5-테트라메틸벤지딘(3,3'5,5--tetramethylbenzidine; TMB) 기질반응액을 50 ㎕ 씩 첨가하여 30 분간 반응하고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0070] 그 결과, 도 3 및 4에서 나타난 바와 같이 제조된 폐렴구균에서 19A 및 19F의 다혈청형 피막 다당체가 발현되는 것을 확인하였다(도 3 및 도 4).

[0071] **<실시예 2> 폐렴구균 DNA 형질전환을 이용한 하이브리드 피막 발현 폐렴구균의 제조**

[0072] **<2-1> 비피막 다당체 생성 균주에서 19F 피막 다당체를 발현하는 동질유전자(isogenic) 균주의 제조**

[0073] 피막 다당체를 생성하지 않는 폐렴구균 균주인 스트렙토코커스 뉴모니아에 TIGR4-JS(*Streptococcus pneumoniae* TIGR4-JS)에서 19F 피막 다당체의 발현하는 동질유전자 균주를 제조하기 위해서, *S. 뉴모니아에* EF3030 균주의 유전체를 *S. 뉴모니아에* TIGR4-JS 균주에 형질전환하였다.

[0074] 구체적으로, *S. 뉴모니아에* EF3030 균주를 상기 실시예 <1-1>과 동일한 방법을 사용하여 전체 유전체를 포함하는 균주 분해액을 준비한 다음, 상기 실시예 <1-4>과 동일한 방법으로 *S. 뉴모니아에* TIGR4-JS 균주의 형질전환용 세포를 제조하였고, 상기 실시예 <1-5>와 동일한 방법으로 형질전환하여 0.5 ug/㎖의 젠타마이신 및 300 ug/㎖의 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함하는 혈액한천배지에서 선별하여 배양하였고, 상기 실시예 <1-6>와 동일한 방법으로 샌드위치-ELISA를 수행하여 19F 피막 다당체의 발현을 확인하였다.

[0075] 그 결과, 19F 피막 다당체의 발현하는 *S. 뉴모니아에* TIGR4-JS 동질유전자 균주를 확인하였으며, 상기 동질유전자 균주를 TIGR19F로 명명하였다.

[0076] **<2-2> *wzy*19F 유전자를 제거하기 위한 야누스 카세트(Janus cassette)의 제조**

[0077] *wzy*19F-*wzy*19A 하이브리드 피막 다당체 발현하는 병렬 유전자카세트 DNA를 재조합하기 위해 도 5로 나타내어지는 *S. 뉴모니아에* TIGR19F 균주의 피막 합성 유전자좌에서 *wzy*19F를 제거하기 위한 야누스 카세트를 제조하였다.

[0078] 구체적으로, *S. 뉴모니아에* TIGR4-JS 균주를 상기 실시예 <1-1>과 동일한 방법을 사용하여 전체 유전체를 포함하는 균주 분해액을 준비하여 이를 주형으로 하고, 하기 [표 1]에 나타난 프라이머를 사용하여 상기 실시예 <1-3>과 동일한 방법으로 PCR을 수행하여 야누스 카세트를 증폭하였다. 아울러, 상기 실시예 <2-1>에서 제조한 *S. 뉴모니아에* EF3030 균주 분해액을 주형으로 하고, 하기 [표 1]에 나타난 프라이머를 사용하여 상기 실시예 <1-3>과 동일한 방법으로 PCR을 수행하여 혈청형 19F 폐렴구균의 피막 합성 유전자좌로부터 *wchQ*19f 및 *wzx*19F 유전자 단편을 증폭하였다. 그런 다음, 각각의 PCR 산물을 하기 [표 1]에서 나타난 제한효소를 사용하여 제한효소 절단부위를 자른 후, PCR 클린-업 키트를 사용하여 정제하였으며, T4 연결효소로 세 절편을 서로 연결하였다. 그런 다음, P5007 정방향 프라이머(서열번호 15: GTCTTAGAAGAAACTATTTC) 및 P3005 역방향 프라이머(서열번호 16: TTTATTGCTTCTGGACGTGTA)를 사용한 PCR을 재수행하여 야누스 카세트의 완성을 확인하였다.

[0079] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열로 구성되는 *S. 뉴모니아에* EF3030 균주의 피막 합성 유전자좌에서 *wzy*19F를 제거하기 위한 약 3.5 kb 크기의 야누스 카세트를 제조하였다(도 6).

표 1

[0080] *wzy*19F를 제거용 야누스 카세트를 제조하기 위한 PCR 조건

주형 DNA 균주	PCR 산물 (증폭 길이)	프라이머			제한효소
		이름	방향	서열	
EF3030	*wchQ*19f (약 1 kb)	P5003 (서열번호: 9)	F	CGAGGGTGTGTAAATGACTTA	
		P3006 (서열번호: 10)	R	CAAACTCTAGACTAGTTAAACATCCTCG	*Xba*I
	*wzx*19f (약 1 kb)	P5006 (서열번호: 11)	F	GGGGCCCGGATCCGCGACAGAATGTATA	*Bam*HI
		P3003 (서열번호: 12)	R	TTTGACAAAGGCTGAAACACA	
TIGR4-JS	야누스카세트 (약 1.3 kb)	5112 (서열번호: 13)	F	CTAGTCTAGAGTTTGATTTTTAATGG	*Xba*I
		3112 (서열번호: 14)	R	CGCGGATCCGGGCCCCTTTCCTTATGCTTTTGG	*Bam*HI

[0081] * EF3030는 *S. 뉴모니아에* EF3030 균주를 나타내며, TIGR4-JS는 *S. 뉴모니아에* TIGR4-JS 균주를 나타낸다.

[0082] * F는 정방향 프라이머를 나타내며, R은 역방향 프라이머를 나타낸다.

[0083] **<2-3> 야누스 카세트를 이용한 *wzy*19F 유전자의 제거**

[0084] *wzy*19F-*wzy*19A 하이브리드 피막 다당체 발현하는 병렬 유전자카세트 DNA를 재조합하기 위해, 야누스 카세트를 이용하여 *S. 뉴모니아에* TIGR19F 균주의 피막 합성 유전자좌에서 *wzy*19F를 제거하였다.

[0085] 구체적으로, 상기 실시예 <1-4>과 동일한 방법을 사용하여 *S. 뉴모니아에* TIGR19F 균주의 형질전환용 세포를 제조하였고, 상기 실시예 <2-2>에서 제조한 야누스 카세트 DNA 1 ㎍을 상기 실시예 <1-5>와 동일한 방법으로 형질전환하여 0.5 ug/㎖의 젠타마이신 및 100 ug/㎖의 카나마이신(kanamycin)을 포함하는 혈액한천배지에서 선별하여 배양한 다음, 상기 실시예 <1-6>와 동일한 방법으로 샌드위치-ELISA를 수행하여 19F 피막 다당체의 발현을 확인하였다.

[0086] 그 결과, *S. 뉴모니아에* TIGR19F 균주에서 19F 피막 다당체가 발현되지 않는 것을 확인하였으며, 상기 균주를 TIGR19X로 명명하였다.

[0087] **<2-4> *wzy*19F-*wzy*19A 병렬유전자 카세트 DNA의 제조**

[0088] *wzy*19F-*wzy*19A 하이브리드 피막 다당체를 발현하기 위해서, *wzy*19F-*wzy*19A 병렬유전자 카세트 DNA를 제조하였다.

[0089] 구체적으로, 상기 실시예 <1-1> 또는 <2-1>에서 제조한 S. 뉴모니아에 TREP19A 또는 *S. 뉴모니아에* EF3030 균주 분해액을 주형으로 하고, 하기 [표 2]에 나타난 프라이머를 사용하여 상기 실시예 <1-3>과 동일한 방법으로 PCR을 수행하여 혈청형 19A 폐렴구균의 *wzy*19A 유전자 단편 또는 혈청형 19F 폐렴구균의 *wchQ*19f-*wzy*19F 및 *wzx*19F 유전자 단편을 증폭하였다. 그런 다음, 상기 세 유전자 단편을 주형으로 하고, P5007 정방향 프라이머(서열 번호 15) 및 P3003 역방향 프라이머(서열 번호 12)를 사용하는 오버랩 PCR(overlap PCR)을 수행하여 세 단편을 서로 연결하였다. 그런 다음, 상기 오버랩 PCR에서 사용한 프라이머를 사용하여 PCR을 재수행하고 염기서열을 분석하여 병렬유전자 카세트 DNA의 완성을 확인하였다.

[0090] 그 결과, 도 7 및 8에 나타난 바와 같이 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열로 구성되는 *wzy*19F-*wzy*19A 하이브리드 피막 다당체를 발현하기 위한 약 4.5 kb 크기의 *wzy*19F-*wzy*19A 병렬유전자 카세트를 제조하였다(도 7 및 8).

표 2

[0091] *wzy*19F-*wzy*19A 병렬유전자 카세트를 제조하기 위한 PCR 조건

주형 DNA 균주	PCR 산물 (증폭 길이)	프라이머		
		이름	방향	서열
TREP19A	*wzy*19A (약 1.37 kb)	P5002 (서열 번호: 17)	F	ATGTATAGGAGAGGGTAGATGACTTATTTATTTTT
		P3004 (서열 번호: 18)	R	TTAGTATTCATCAACTATCCTCTCTA
EF3030	*wchQ*19f-*wzy*19F (약 2.2 kb)	P5007 (서열 번호: 15)	F	GTCTTAGAAGAAACTATTTC
		P3002 (서열 번호: 19)	R	AAAAATAAATAAGTCATCTACCCTCTCCTATACAT
	*wzx*19f (약 1.0 kb)	P5004 (서열 번호: 20)	F	TAGAGAGGATAGTTGATGAATACTAA
		P3003 (서열 번호: 12)	R	TTTGACAAAGGCTGAAACACA

[0092] * TREP19A는 *S. 뉴모니아에* TREP19A 균주를 나타내며, EF3030는 *S. 뉴모니아에* EF3030 균주를 나타낸다.

[0093] * F는 정방향 프라이머를 나타내며, R은 역방향 프라이머를 나타낸다.

[0094] **<2-5> *wzy*19F-*wzy*19A 하이브리드 피막 다당체 발현 폐렴구균 제조**

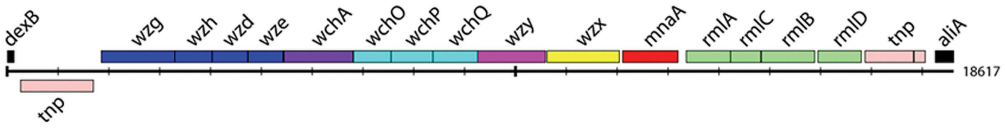
[0095] 19F-19A 하이브리드 피막 다당체를 발현하는 폐렴구균을 제조하기 위해서, *wzy*19F-*wzy*19A 병렬유전자 카세트를 폐렴구균으로 형질전환하고 유동 혈구 혈청형 분석법(Flow cytometric serotyping assay; FCSA)을 수행하여 발현을 확인하였다.

[0096] 구체적으로, 상기 실시예 <1-4>과 동일한 방법을 사용하여 TIGR19X 균주의 형질전환용 세포를 제조하였고, 상기 실시예 <2-4>에서 제조한 *wzy*19F-*wzy*19A 병렬유전자 카세트 DNA 1 ㎍을 상기 실시예 <1-5>와 동일한 방법으로 형질전환하여 0.5 ug/㎖의 젠타마이신 및 300 ug/㎖의 스트렙토마이신을 포함하는 혈액한천배지에서 선별하여 배양한 다음, 배지를 수득하여 13,000 rpm에서 2 분간 원심분리하고 상층액을 제거하여 균체를 수득한 후, 인산완충식염수(phosphate buffered saline; PBS), 5% 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 0.1% 아지드화나트륨(sodium azide)을 포함하는 FACS 완충액 1 ㎖로 완전히 현탁한 다음, FACS 완충액 10 ㎖을 첨가해 1:10의 비율로 희석하여, V형 플레이트(V-bottom plate)에 상기 희석한 FACS 완충액 50 ㎕을 첨가하였다. 그런 다음, 1 차 항체로 19A 피막 다당체에 특이적인 Dob1 단일클론 항체(Park et al., Infect Immun. 77(8):3374-9, 2009; 알라바마 주립대학, Moon H. Nahm 박사 제공) 및 19F 피막 다당체에 특이적인 Hyp19FM1 단일클론 항체(알라바마 주립대학, Moon H. Nahm 박사 제공)를 각각 1:4,000 및 1:100의 비율로 희석하여 상기 V형 플레이트에 50 ㎕씩 첨가하였고, 4℃에 정치하여 30 분간 반응한 후, FACS 완충액 100 ㎕를 첨가하여 2,500 rpm에서 5 분간 원심분리하고 플레이트를 뒤집어 신속하게 상층액을 제거하였다. 2 차 항체인 항-사람-IgG-PE 항체(서던 바이오테크 사) 및 항-마우스-Ig-PE 항체(BD 바이오사이언스 사) 희석액을 첨가하여 침전된 폐렴구균을 현탁한 다음, 4℃에 정치하여 30 분간 반응한 후, FACS 완충액 100 ㎕를 첨가하여 2,500 rpm에서 5 분간 원심분리하고 플레이트를 뒤집어 신속하게 상층액을 제거하였다. 그런 다음, 200 내지 300 ㎕의 FACS 완충액을 첨가하여 침전된 폐렴구균을 현탁하여 형광활성화세포분류기(fluorescence-activated cell sorter; FACS) 튜브에 옮겨 FACS 완충액을 700 ㎕ 첨가하였고, FACS 캘리버(FACS caliber; BD 사)를 통해 결합한 항체의 신호를 분석하였다.

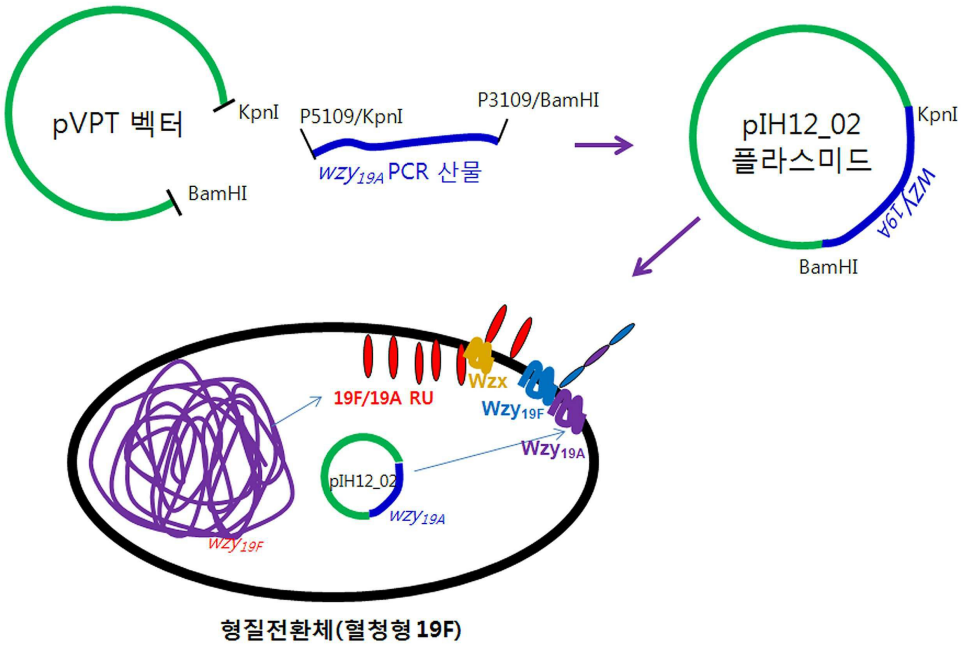
[0097] 그 결과, 도 10에서 나타나는 바와 같이 폐렴구균에서 19A 및 19F의 하이브리드 다혈청형 피막 다당체가 발현되는 것을 확인하였다(도 10).

도면

도면1

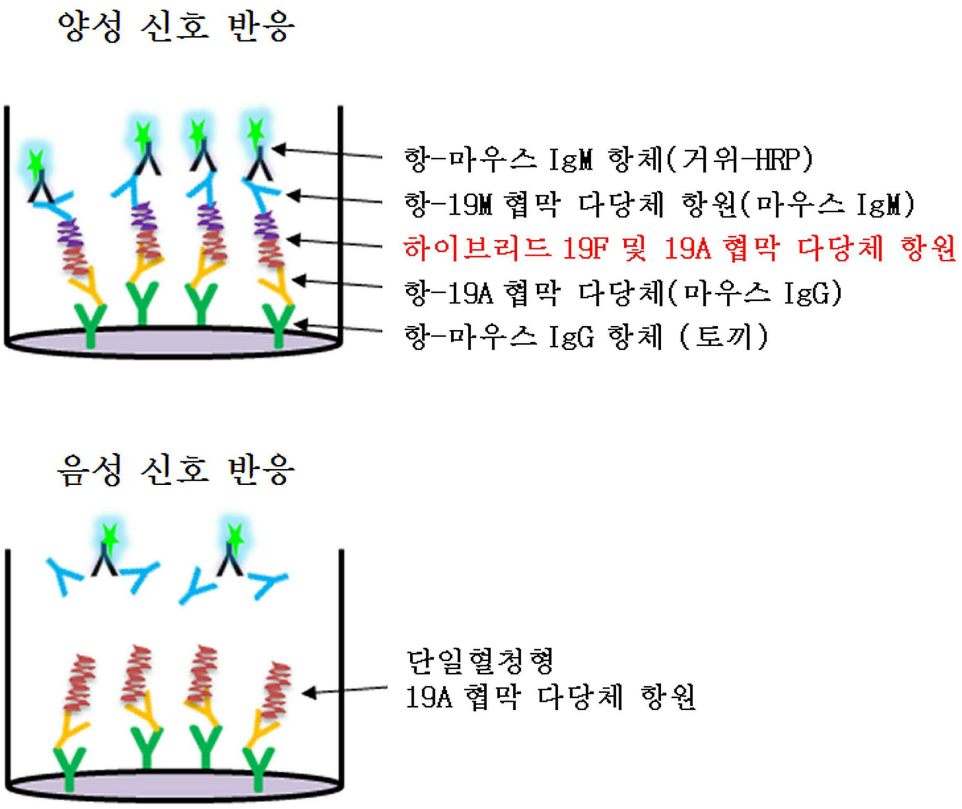


도면2

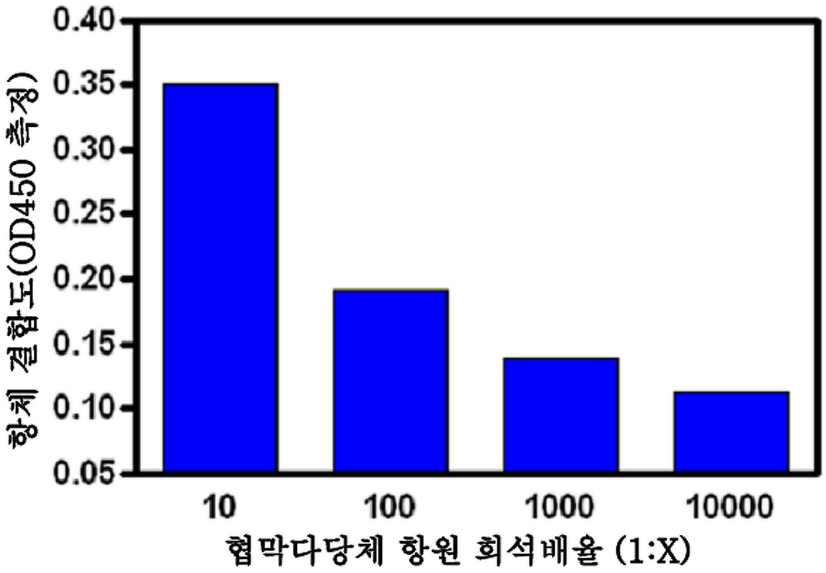


형질전환체(혈청형 19F)

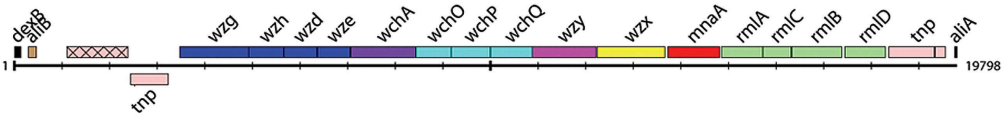
도면3


양성 신호 반응
항-마우스 IgM 항체(거위-HRP)
항-19M 협막 다당체 항원(마우스 IgM)
하이브리드 19F 및 19A 협막 다당체 항원
항-19A 협막 다당체(마우스 IgG)
항-마우스 IgG 항체 (토끼)
음성 신호 반응
단일혈청형
19A 협막 다당체 항원

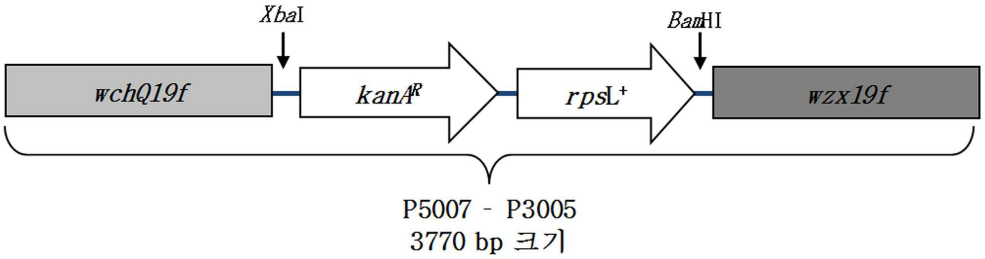
도면4


0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
항체 결합도(OD450 측정)
10
100
1000
10000
협막다당체 항원 희석배율 (1:X)

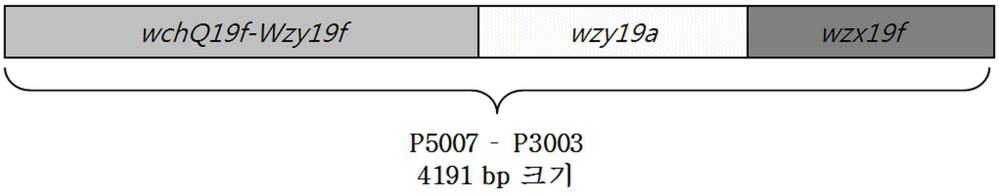
도면5



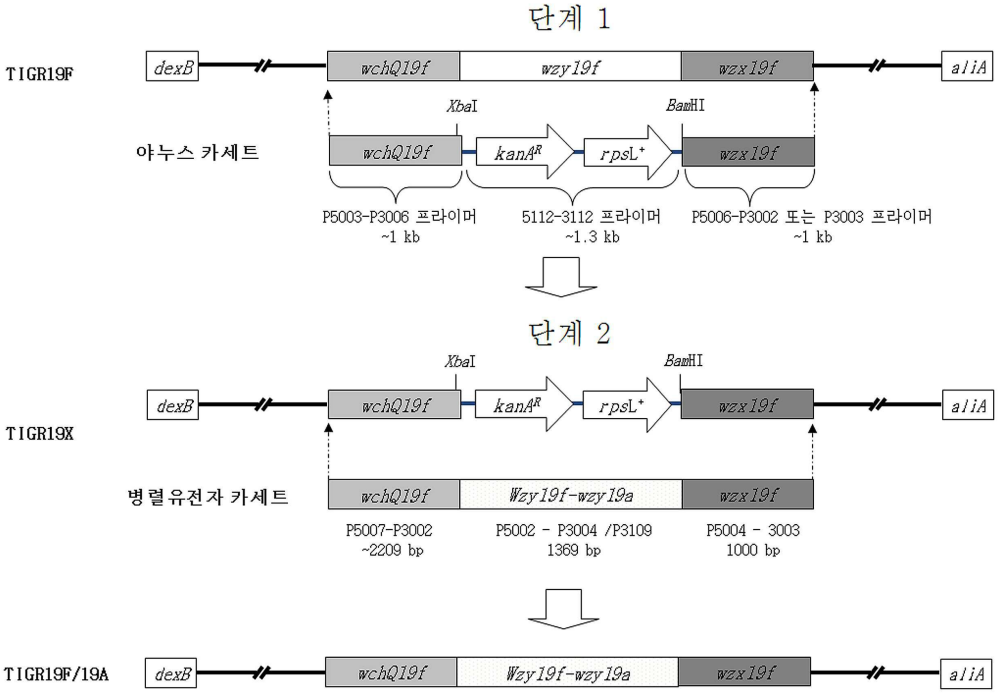
도면6



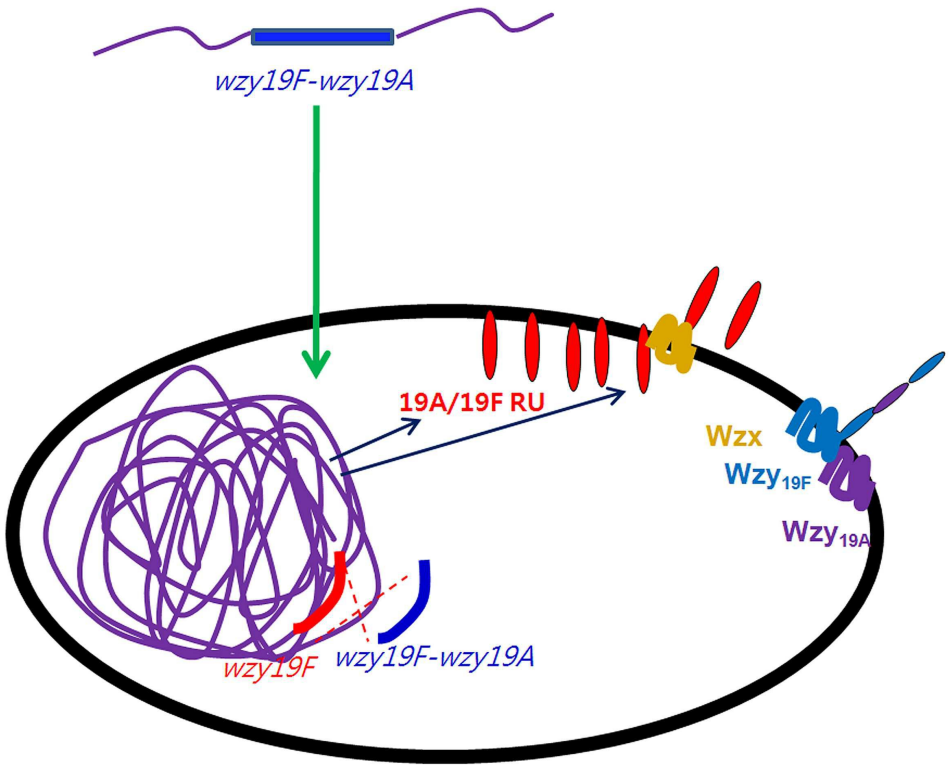
도면7



도면8

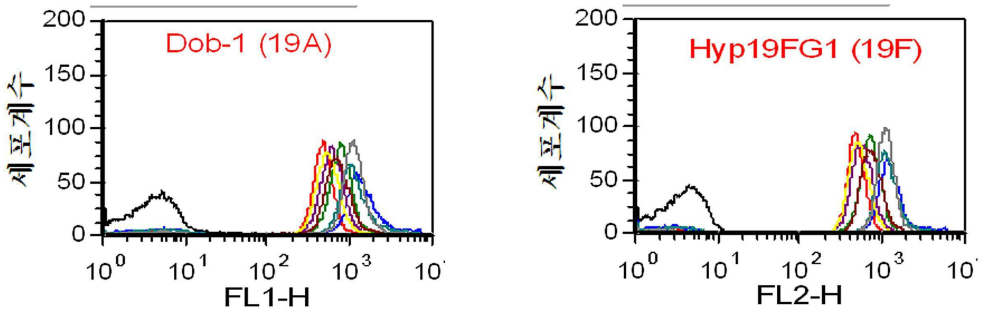


도면9



형질전환체 (혈청형 19F)

도면10



서 열 목 록

<110> EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION

<120> Streptococcus pneumoniae producing hybrid polyserotype capsular polysaccharide and hybrid polyserotype capsular polysaccharide produced therefrom

<130> 13P-06-009

<160> 20

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1362

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 1

atgacttatt tatttttact ctgcctgacc ttattcttat taactttctt ctatttttt 60

gctttcaatc aagatttgat agctccgcca gttgtcatgt ctgttatgtt tctcattagt 120

tctgtatttg cccttattaa tgtgcaaaac tggaatattg agtatagtgg tttagcttat 180

cttttgatta ttagtggcat tattgttttt tcaatgcctc tcttggctct taattcgcct 240

agtctaaata ccaagattaa agtgacggat cggctcattg atatccaatt ctggaaaata 300

gctcttacta ttatagttga cctcattatt ctatatcttt ataggagaga gattcataat 360

cttgcactta gccatggtta tacgggttca aattttcagt ggttctttag aaatgctacc 420

agttatgaag gtgagctaac agtgcgaact tcgattcggg tcctcattcg tatcattgac 480

gtatctgctt atatttttgg atatactttt attaataatt tcttcattta tagtcataaa 540

cgctctaaag atttactgct cttagttcca ttcttgattt ttatttctaa aaccttatta 600

tctgggggta gattggatat tataaaaatt ttaattgcgt atgttgtaat ggcctatatt 660

cagcaaaaac gaaaagttgg ctgggataag gtcatctccc ataaatatat gagacttggt 720

tttgtaggct tgatagctgg gattcctacc ttttactatt ctttattctt atctggacgt 780

tctacgacta gaactgtatt tgaaagtatt tcaacctatt taggaggttc gattcagcat 840

tttaatcagt atattcaaaa tcctattgga gtagctgagg tttttggcga tgagtcattt 900

gtagctatta tgaatatttt gggtaatctt ggctttgtca attacaatag taccgttcac 960

ttagaatttc ggcagttagg gattactatg ggtaacgttt atactttctt tagaagaccc 1020

tggcatgact ttgggttagt cggtatgtat atcttttcct ttgttgtcgg tgtgtttttt 1080

gctatttttt atttgaaatt aagaaagagc cgtgctggtt ttaaattgga tattcataca 1140

attatttact cttatttctt ttattggatt tttttatcgt ccattgagca atactcgttt 1200

acaacaatca gtttgtttac acttgtattt atagtcttgg tttacctaat ggctttcttc 1260

tattggaatt tggatttcca cagaggaaaa ctagtaatta aactctctga cacaagtatt 1320

aaatcggaaa actacccata cgatgttcca gattacgctt aa 1362

<210> 2

<211> 1366

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 2

atgagttatt tatttttact ttgccttaca ttattcttat tgactatatt ctatttcttt 60

gcttttattc aagatttaat tgctcctcca gtagttatgt ctgtaatgtt tctaattagt 120

tcagtatttg cactggttaa ttcaaaaaac tggaatattg aatatagtgg aatagcctat 180

attctcataa ttagtggtat tattatattt tcgattcctt taatggcatt aaaatcacct 240

aattttaata ctgaggttaa gattgctgat cgattaattg atatccaatt ttggaaaatt 300

gctctaacta ttataattga tctctttatt ttgtatcttt acaggaagga aatatacaac 360

cttgttctta gtaatggata tacggggtca aatattcagt ggtttttag aaatgcaacg 420

agttatgaag gtgaattgac agtgcgaact tttattcgag ttctcattcg tgttattgac 480

gtatctgctt atatttttgg atatactttt attaataatt ttcttatcta tcgccataaa 540

cgccctaaag acatattact tttagtacct ttattaatat ttatttcaaa aactttaata 600

tcaggaggcc ggcaagatat tattaaaatt ctgattgcct atgtaatcat gatgtatatc 660

caacaaaaac ggaaagttgg atggaataga gtcatatctc ataaatatat tcaccttgga 720

tttgttggtt taatagcagg tattccagca ttttactact ctttgttttt agccggtcgt 780

tcaacgacta ggacgctatt tgagagtgtt tcgacctatc taggaggctc aattcagcat 840

tttaatcagt atattgaaaa tccattagat cctggtgaag tttttggcag tgaaacattg 900

gtgcctatat taaatatatt aggggaaatg ggcctagtta attatcgtag tacaattcat 960

ttagaatttc ggacactagg agttactgta ggaaatgttt atacttttt tagaagaccc 1020

ttgcatgatt ttggtctagt tggtatgtat gtatttgtct ttgctgtagg tgctttttt 1080

gctatttatt atttagttct gagaaagaaa caggttggtt ttaatttgga tattcatacc 1140

attatttatt cttatgtctt ttattggatt tttttatcat caatcgagca atactcgttc 1200

acaatgatta gtctatatac acttgtattt attgtgttgg tttactttat ggctatcttt 1260

tactggtgta cagattttaa aagaggaaaa ctgattttta aaatttctga ctcaagtatc 1320

aaattaaaag aagaataaca gaatgtatag gagagggtag gggtag 1366

<210> 3

<211> 3770

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Janus cassette for removing wzy19f

<400> 3

gtcttagaag aaactatttc ttgtgttaaa tctataaaag aaggcaatta taatgcaaag 60

caaatcgtta ttattgataa tttctctaat aatggtactg gtgaaaaact acaagagctt 120

tatgaatcag atttagaaat tgatgttttg attaaccatg aaaatgctgg ttttgctcgt 180

ggaaataatg tggcttatca atttgctaag gaaaagtata accccgattt catggttatc 240

atgaataacg atattgagat agaaacagaa aattttgaaa aaattgtgac agatatctat 300

cgtgaggaaa aattccattt gctcgggcca gatatcttct cgactactta ccaacttcac 360

caaaacccaa aacggttgac acattatact tatggagaag ttaaagctct aaatgaaaaa 420

tttaaaaaag ggagccaagt tagtctagct ttaaaaatca aatgttggtt gaaagctagt 480

aaagttcttc gaacagcaat ctatcaaaat agacgtaaaa aaggatcagt agactataga 540

aaacaggtag aaaacccaat tcttcatggt tcttttattg tatattcgag agattttatc 600

gaaaaagagg agtatgcttt taaccctaac accttctttt actatgaaac agagatatta 660

gattatgaag ctgaattaaa aggatacaag agaatttata cacctaaaat tagagttttg 720

caccatcaaa atgttgcaac taatcaagtt tacacgaact tgttagaaaa aaccttgttt 780

tcaaataaat gcaactttaa atccaccagt tatttttga agttgatgaa agaaaacgag 840

gatgtttaac tagtctagag tttgattttt aatggataat gtgatataat ctttaaatac 900

tgtagaaaag aggaaggaaa taataaatgg ctaaaatgag aatatcaccg gaattgaaaa 960

aactgatcga aaaataccgc tgcgtaaaag atacggaagg aatgtctcct gctaaggtat 1020

ataagctggt gggagaaaat gaaaacctat atttaaaaat gacggacagc cggtataaag 1080

ggaccaccta tgatgtggaa cgggaaaagg acatgatgct atggctggaa ggaaagctgc 1140

ctgttccaaa ggtcctgcac tttgaacggc atgatggctg gagcaatctg ctcatgagtg 1200

aggccgatgg cgtcctttgc tcggaagagt atgaagatga acaaagccct gaaaagatta 1260

tcgagctgta tgcggagtgc atcaggctct ttcactccat cgacatatcg gattgtccct 1320

atacgaatag cttagacagc cgcttagccg aattggatta cttactgaat aacgatctgg 1380

ccgatgtgga ttgcgaaaac tgggaagaag acactccatt taaagatccg cgcgagctgt 1440

atgatttttt aaagacggaa aagcccgaag aggaacttgt cttttcccac ggcgacctgg 1500

gagacagcaa catctttgtg aaagatggca aagtaagtgg ctttattgat cttgggagaa 1560

gcggcagggc ggacaagtgg tatgacattg ccttctgcgt ccggtcgatc agggaggata 1620

tcggggaaga acagtatgtc gagctatttt ttgacttact ggggatcaag cctgattggg 1680

agaaaataaa atattatatt ttactggatg aattgtttta gtacctagaa ttcaccaaaa 1740

ataaaaaaac acaggagaat gtagatgcct acaattaacc aattggttcg caaaccgcgt 1800

aaatcaaaag tagaaaaatc taaatcacca gctttgaacg ttggttacaa tagtcataaa 1860
aaagttcaaa caaacgtttc ttcaccacaa aaacgtggtg ttgcaactcg tgttggaaca 1920
atgacaccta aaaaacctaa ctcagccctt cgtaaattcg ctcgtgtacg tttgagcaac 1980
cttatcgaag ttactgccta catcccaggt atcggacaca acttgcaaga gcacagcgtg 2040
gtgcttcttc gcggtggacg tgtaaaagac cttccagggg tacgttacca tatcgtccgt 2100
ggtgcacttg atactgcagg tgttaacgat cgtaaacaag gccgttctaa atacggtact 2160
aaacgtccaa aagcataagg aaaggggccc ggatccgcga attaaaagaa gaataacaga 2220

atgtatagga gagggtagat gaatactaaa attaaaaata taataactag tttttcttat 2280
gttatttctt caaatctgct catagtttta acctcatcac tagttgtttt gatttttcct 2340
aaaataatgg gggtaactga gtacagttac tggcaacttt atatttttta tctgacctat 2400
atcggttttt tccacttggg ttggattgat gggatttatc tcaaatatgg tggcttagaa 2460
tatacaaatt tagatagaaa acagttttat tctcagatga ttctattttc tagtttctta 2520
atgctaatct cgctggtatt atttactttg aacctaataa ctgtaaggga tgaaaacgca 2580
agatatattt ataatatggc tatcattagc atgatagtca caaacttaag aacactctat 2640

gtttatatct tgcagatgac aaatcgcttg aaggatagtt cagtcattct aattagtgat 2700
cgcgttttat atgtactcct tttattcatg tttattgtat ttggatggca tgagtacaag 2760
gtcatgattt gggctgatat tctaggtcga acattttctc tcatgctttc cttctggatt 2820
tgtaaagata ttgtgtttca gcctttgtca aaatttatct tagatttcaa ggagtccctt 2880
gataatatcc gtgttggaat caatttaatg ctatctaaca ttgcgagtag catgattata 2940
ggcattgttc gtatgggaat tcaatggaat tggaatattg aaacattcgg gaaagtgtca 3000
ttaactttga gtatatctaa tttattaatg acttttatta atgccattgg attagttatc 3060

tttcctttga taaagcgaac aaagactgag aatttaccta aaatttattc taatttaaga 3120
aatgctttga tgttggttat gttcgcaatc ttgctcttct actatccttt aaaatttatt 3180
cttgatattt ggcttcctgc ttataaggat gccttagttt tcatggccct aatttttcct 3240
atgtcagttt atgaagggaa aatggctttg gtgataaata catatttaaa agcaatgaga 3300
atggaaaaag acattctcaa aattaatgct ttggttatgt taactagtat agtagtgaca 3360
ttagtgacta ctatactact aaataatttg gggctgacag ttgtatctat agttatttta 3420
cttgctttaa gaagtataat agctgaatta attttatcca aaaaactgaa gatatcagtc 3480

aagcaagaca ttgctttaga gttacttatg acgattatat ttatttcttc aagttggtat 3540

ctctctattt ggattgcagt aataatttat ttattggcgt atactttata tttgtattta 3600

aagcacaaag atatcagaat gtatatagaa tactttaaaa atcataaaaa aatatcataa 3660

aaattatata tcaatgaaat ggtagattac atttctacct ttttatccat ttaggaggaa 3720

acgatgaaaa agataatgct agttttcggt acacgtccag aagcaataaa 3770

<210> 4

<211> 4191

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> serial cassette of wzy19F-wzy19A

<400> 4

gtcttagaag aaactatttc ttgtgttaaa tctataaaag aaggcaatta taatgcaaag 60

caaatcgtta ttattgataa tttctctaat aatggtactg gtgaaaaact acaagagctt 120

tatgaatcag atttagaaat tgatgttttg attaaccatg aaaatgctgg ttttgctcgt 180

ggaaataatg tggcttatca atttgctaag gaaaagtata accccgattt catggttatc 240

atgaataacg atattgagat agaaacagaa aattttgaaa aaattgtgac agatatctat 300

cgtgaggaaa aattccattt gctcgggcca gatatcttct cgactactta ccaacttcac 360

caaaacccaa aacggttgac acattatact tatggagaag ttaaagctct aaatgaaaaa 420

tttaaaaaag ggagccaagt tagtctagct ttaaaaatca aatgttggtt gaaagctagt 480

aaagttcttc gaacagcaat ctatcaaaat agacgtaaaa aaggatcagt agactataga 540

aaacaggtag aaaacccaat tcttcatggt tcttttattg tatattcgag agattttatc 600

gaaaaagagg agtatgcttt taaccctaac accttctttt actatgaaac agagatatta 660

gattatgaag ctgaattaaa aggatacaag agaatttata cacctaaaat tagagttttg 720

caccatcaaa atgttgcaac taatcaagtt tacacgaact tgttagaaaa aaccttgttt 780

tcaaataaat gcaactttaa atccaccagt tatttttga agttgatgaa agaaaacgag 840

gatgtttaaa tgagttattt atttttactt tgccttacat tattcttatt gactatattc 900

tatttctttg cttttattca agatttaatt gctcctccag tagttatgtc tgtaatgttt 960

ctaattagtt cagtatttgc actggttaat tcaaaaaact ggaatattga atatagtgga 1020

atagcctata ttctcataat tagtggtatt attatatttt cgattccttt aatggcatta 1080

aaatcaccta attttaatac tgaggttaag attgctgatc gattaattga tatccaattt 1140

tggaaaattg ctctaactat tataattgat ctctttattt tgtatcttta caggaaggaa 1200

atatacaacc ttgttcttag taatggatat acggggtcaa atattcagtg gttttttaga 1260

aatgcaacga gttatgaagg tgaattgaca gtgcgaactt ttattcgagt tctcattcgt 1320
gttattgacg tatctgctta tatttttgga tatactttta ttaataattt tcttatctat 1380
cgccataaac gccctaaaga catattactt ttagtacctt tattaatatt tatttcaaaa 1440
actttaatat caggaggccg gcaagatatt attaaaattc tgattgccta tgtaatcatg 1500
atgtatatcc aacaaaaacg gaaagttgga tggaatagag tcatatctca taaatatatt 1560
caccttggat ttgttggttt aatagcaggt attccagcat tttactactc tttgttttta 1620
gccggtcgtt caacgactag gacgctattt gagagtgttt cgacctatct aggaggctca 1680

attcagcatt ttaatcagta tattgaaaat ccattagatc ctggtgaagt ttttggcagt 1740
gaaacattgg tgcctatatt aaatatatta ggggaaatgg gcctagttaa ttatcgtagt 1800
acaattcatt tagaatttcg gacactagga gttactgtag gaaatgttta tacttttttt 1860
agaagaccct tgcatgattt tggtctagtt ggtatgtatg tatttgtctt tgctgtaggt 1920
gctttttttg ctatttatta tttagttctg agaaagaaac aggttggttt taatttggat 1980
attcatacca ttatttattc ttatgtcttt tattggattt ttttatcatc aatcgagcaa 2040
tactcgttca caatgattag tctatataca cttgtattta ttgtgttggt ttactttatg 2100

gctatctttt actggtgtac agattttaaa agaggaaaac tgatttttaa aatttctgac 2160
tcaagtatca aattaaaaga agaataacag aatgtatagg agagggtagg ggtagatgac 2220
ttatttattt ttactctgcc tgaccttatt cttattaact ttcttctatt tttttgcttt 2280
caatcaagat ttgatagctc cgccagttgt catgtctgtt atgtttctca ttagttctgt 2340
atttgccctt attaatgtgc aaaactggaa tattgagtat agtggtttag cttatctttt 2400
gattattagt ggcattattg ttttttcaat gcctctcttg gctcttaatt cgcctagtct 2460
aaataccaag attaaagtga cggatcggct cattgatatc caattctgga aaatagctct 2520

tactattata gttgacctca ttattctata tctttatagg agagagattc ataatcttgc 2580
acttagccat ggttatacgg gttcaaattt tcagtggttc tttagaaatg ctaccagtta 2640
tgaaggtgag ctaacagtgc gaacttcgat tcgggtcctc attcgtatca ttgacgtatc 2700
tgcttatatt tttggatata cttttattaa taatttcttc atttatagtc ataaacgctc 2760
taaagattta ctgctcttag ttccattctt gatttttatt tctaaaacct tattatctgg 2820
gggtagattg gatattataa aaattttaat tgcgtatgtt gtaatggcct atattcagca 2880
aaaacgaaaa gttggctggg ataaggtcat ctcccataaa tatatgagac ttggttttgt 2940

aggcttgata gctgggattc ctacctttta ctattcttta ttcttatctg gacgttctac 3000

gactagaact gtatttgaaa gtatttcaac ctatttagga ggttcgattc agcattttaa 3060

tcagtatatt caaaatccta ttggagtagc tgaggttttt ggcgatgagt catttgtagc 3120

tattatgaat attttgggta atcttggctt tgtcaattac aatagtaccg ttcacttaga 3180

atttcggcag ttagggatta ctatgggtaa cgtttatact ttctttagaa gaccctggca 3240

tgactttggg ttagtcggta tgtatatctt ttccttttgtt gtcggtgtgt tttttgctat 3300

tttttatttg aaattaagaa agagccgtgc tggttttaaa ttggatattc atacaattat 3360

ttactcttat ttcttttatt ggatttttt atcgtccatt gagcaatact cgtttacaac 3420

aatcagtttg tttacacttg tatttatagt cttggtttac ctaatggctt tcttctattg 3480

gaatttggat ttccacagag gaaaactagt aattaaactc tctgacacaa gtattaaatc 3540

ggaaaactga aaacaataaa aatagagagg atagttgatg aatactaaaa ttaaaaatat 3600

aataactagt ttttcttatg ttatttcttc aaatctgctc atagttttaa cctcatcact 3660

agttgttttg atttttccta aaataatggg ggtaactgag tacagttact ggcaacttta 3720

tatttttat ctgacctata tcggtttttt ccacttgggt tggattgatg ggatttatct 3780

caaatatggt ggcttagaat atacaaattt agatagaaaa cagttttatt ctcagatgat 3840

tctattttct agtttcttaa tgctaatctc gctggtatta tttactttga acctaataac 3900

tgtaagggat gaaaacgcaa gatatattta taatatggct atcattagca tgatagtcac 3960

aaacttaaga acactctatg tttatatctt gcagatgaca aatcgcttga aggatagttc 4020

agtcattcta attagtgatc gcgttttata tgtactcctt ttattcatgt ttattgtatt 4080

tggatggcat gagtacaagg tcatgatttg ggctgatatt ctaggtcgaa cattttctct 4140

catgctttcc ttctggattt gtaaagatat tgtgtttcag cctttgtcaa a 4191

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P5109_F

<400> 5

aaaggtacca tgacttattt atttttactc tg 32

<210> 6

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P3109_R

<400> 6

aaggatcctt aagcgtaatc tggaacatcg tatgggtagt tttccgattt aatacttgtg 60

tcagag 66

<210> 7

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5730_F

<400> 7

atggctagta tgacaggagg tcaacaaatg ggatag 36

<210> 8

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P3107_R

<400> 8

aaaggatcct taagcgtaat ctggaacatc gtatggg 37

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P5003_F

<400> 9

cgagggtgtg taaatgactt a 21

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P3006_R

<400> 10

caaactctag actagttaaa catcctcg 28

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P5006_F

<400> 11

ggggcccgga tccgcgacag aatgtata 28

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P3003_R

<400> 12

tttgacaaag gctgaaacac a 21

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5112_F

<400> 13

ctagtctaga gtttgatttt taatgg 26

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3112_R

<400> 14

cgcggatccg ggccccttc cttatgcttt tgg 33

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P5007_F

<400> 15

gtcttagaag aaactatttc 20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P3005_R

<400> 16

tttattgctt ctggacgtgt a 21

<210> 17

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P5002_F

<400> 17

atgtatagga gagggtagat gacttattta ttttt 35

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P3004_R

<400> 18

ttagtattca tcaactatcc tctcta 26

<210> 19

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P3002_R

<400> 19

aaaaataaat aagtcatcta ccctctccta tacat 35

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P5004_F

<400> 20

tagagaggat agttgatgaa tactaa 26