



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년01월05일  
(11) 등록번호 10-1005630  
(24) 등록일자 2010년12월27일

- (51) Int. Cl.  
C12N 15/863 (2006.01) A61K 35/76 (2006.01)  
A61K 39/285 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2004-7018293
- (22) 출원일자(국제출원일자) 2003년05월14일  
심사청구일자 2008년03월24일
- (85) 번역문제출일자 2004년11월12일
- (65) 공개번호 10-2004-0108809
- (43) 공개일자 2004년12월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2003/005047
- (87) 국제공개번호 WO 2003/097846  
국제공개일자 2003년11월27일
- (30) 우선권주장  
PA200200753 2002년05월16일 덴마크(DK)  
PA200200752 2002년05월16일 덴마크(DK)
- (56) 선행기술조사문헌  
US05744141 A1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
버베리안 노딕 에이/에스  
덴마크, 디케이-3490, 크비스트가르드, 비요게스  
코브베이 9
- (72) 발명자  
하울리, 폴  
오스트레일리아 빅토리아주 3150 글렌 웨이벌리  
로즈 애비뉴 60  
리레르, 손자  
독일 81377 뮌헨 푸르스텐리에데르스트라췌 272
- (74) 대리인  
남상선

전체 청구항 수 : 총 31 항

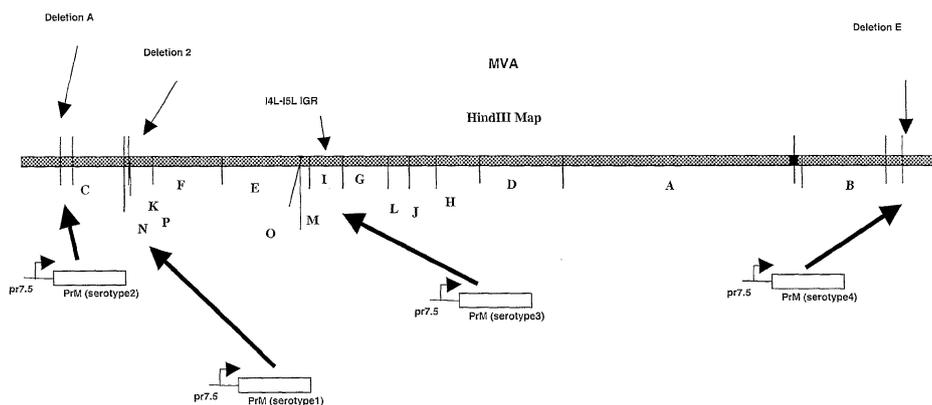
심사관 : 김용태

(54) 수두 바이러스 게놈내로 삽입된 상동 유전자를 발현하는 재조합 수두 바이러스

(57) 요약

본 발명은 미생물의 상이한 변이체로부터 유도되며 50% 또는 그 이상의 상동성을 갖는 두개 이상의 상동 외래 서열을 발현할 수 있는 재조합 수두 바이러스 벡터에 관한 것이다. 본 발명은 또한 그러한 재조합 수두 바이러스의 제조방법 및 의약 또는 백신으로서 상기 재조합 수두 바이러스의 용도에 관한 것이다. 부가적으로, 사람을 비롯한 살아있는 동물에서 면역반응에 영향을 미치는, 바람직하게는 면역반응을 유도하기 위한 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

50-100 %의 상동성을 갖는 2개 이상의 상동 외래 유전자를 포함하며, 상기 유전자 각각이, 수두바이러스 계놈의 비필수 영역인, 상이한 삽입 부위내로 삽입된 재조합 수두바이러스.

**청구항 2**

60-100 %의 상동성을 갖는 2개 이상의 상동 외래 유전자를 포함하는 재조합 수두바이러스.

**청구항 3**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 유전자가 65-75 %의 상동성을 갖는 재조합 수두바이러스.

**청구항 4**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 유전자가 플라비바이러스(*flavivirus*)로부터 유래된 재조합 수두바이러스.

**청구항 5**

제 4항에 있어서, 상기 플라비바이러스가 멧기 바이러스인 재조합 수두바이러스.

**청구항 6**

제 4항에 있어서, 상기 유전자가 바이러스의 2개 이상의 상이한 혈청형으로부터 유래된 2개 이상의 상동 유전자인 재조합 수두바이러스.

**청구항 7**

제 4항에 있어서, 상기 유전자가 2개 이상의 PrM 유전자인 재조합 수두바이러스.

**청구항 8**

제 4항에 있어서, 상기 유전자가 4개의 PrM 유전자인 재조합 수두바이러스.

**청구항 9**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 수두바이러스가 백시니아 바이러스인 재조합 수두바이러스.

**청구항 10**

제 9항에 있어서, 상기 백시니아 바이러스가 변형된 백시니아 안카라(MVA) 바이러스인 재조합 수두바이러스.

**청구항 11**

제 10항에 있어서, 상기 MVA가 European Collection of Animal Cell Culture(ECACC)에 기탁번호 V00083008에 기탁된 MVA-BN인 재조합 수두바이러스.

**청구항 12**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 수두바이러스가 사람을 비롯한 포유류 세포에서 복제 결함이 있거나 또는 복제 능력이 없는 재조합 수두바이러스.

**청구항 13**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 유전자가 바이러스 계놈의 천연 산출 결실부위, 유전자 내 영역 또는 양쪽 모두로 삽입되는 재조합 수두바이러스.

**청구항 14**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 의약 또는 백신으로서 사용되는 재조합 수두바이러스.

**청구항 15**

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 수두바이러스를 포함하는 백신.

**청구항 16**

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 수두바이러스 및 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 보조제, 첨가제 또는 이들의 조합물을 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 17**

사람을 비롯한 동물 생체의 면역반응에 영향을 미치기 위한 제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 수두바이러스.

**청구항 18**

제 15항에 있어서, 사람을 비롯한 동물 생체의 면역반응에 영향을 미치기 위한 백신.

**청구항 19**

제 16항에 있어서, 사람을 포함하는 동물 생체의 면역 반응에 영향을 미치기 위한 약제 조성물.

**청구항 20**

치료 유효량의 제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 수두바이러스를 치료할 동물의 생체에 투여하는 것을 포함하는, 사람을 제외한 동물에서 면역반응에 영향을 미치기 위한 방법.

**청구항 21**

- 수두바이러스로 세포를 감염시키는 단계;
- 수두바이러스 게놈에 이중인 유전자 및 수두바이러스 게놈의 삽입 부위내로 이중 유전자를 통합시킬 수 있는 수두바이러스 게놈 서열을 포함하는 제 1 벡터 작제물로, 상기 감염된 세포를 형질감염시키는 단계;
- 생성된 재조합 수두바이러스를 확인 및 분리하는 단계;
- 세포를 감염시키기 위한 이전의 단계로부터 얻은 재조합 수두바이러스 및 수두바이러스 게놈에 이중이며 제 1 벡터 작제물의 유전자에 상동인 다른 유전자를 포함하는 추가 벡터 작제물을 사용함으로써 상기 단계를 반복하는 단계를 포함하는, 제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 수두바이러스의 제조 방법.

**청구항 22**

- 수두바이러스 발현 조절 요소의 전사 조절하에 있는 유전자를 포함하는 2개 이상의 벡터 작제물로서, 여기서 상기 각각의 벡터 작제물내에 포함된 유전자가 50-100%의 상동성을 갖는 상동 유전자이며, 상기 유전자 각각이 한쪽 또는 양쪽 말단에서 해당 유전자를 수두바이러스 게놈내로 통합시킬 수 있는 수두바이러스 DNA 서열과 측면을 접하고 있는 것을 특징으로 하는, 2개 이상의 벡터 작제물 및
- 재조합 수두바이러스의 게놈내로 통합된 상기 상동 유전자를 지니는 재조합 수두바이러스를 확인, 선택 또는 확인 및 선택하기 위한 핵산(nucleic acids)을 포함하는, 키트.

**청구항 23**

제 22항에 있어서, 상기 각각의 상동 유전자는 한쪽 또는 양쪽 말단에서 각각의 벡터 작제물의 상동 유전자를 수두바이러스 게놈의 상이한 삽입 부위내로 통합시킬 수 있는 수두바이러스 DNA 서열과 측면을 접하고 있는 것을 특징으로 하는, 키트.

**청구항 24**

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 수두바이러스의 재조합 수두바이러스 게놈으로부터 유래되거나 재조합 수두 바이러스 게놈에 상동이며, 2개 이상의 상동 유전자 및 수두바이러스 게놈 서열의 일부 또는 전부를 포함하는, 핵산(nucleic acids).

**청구항 25**

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 수두바이러스에 의해 감염된 세포를 검출하는 방법으로서, 제 24항에 따른 핵산(nucleic acids)을 상기 세포에 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 26**

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 수두바이러스를 확인하는 방법으로서, 제 24항에 따른 핵산(nucleic acids)을 상기 바이러스에 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 27**

상동 외래 유전자, 상동 외래 유전자의 삽입부위와 관련된 측면 서열, 또는 상기 상동 외래 유전자와 상기 측면 서열 둘 모두를 선택적으로 증폭시키는 프라이머와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 수두바이러스로 감염된 세포의 검출 방법.

**청구항 28**

상동 외래 유전자, 상동 외래 유전자의 삽입부위와 관련된 측면 서열, 또는 상기 상동 외래 유전자와 상기 측면 서열 둘 모두를 선택적으로 증폭시키는 프라이머와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 수두바이러스로 감염된 세포의 확인 방법.

**청구항 29**

치료 유효량의 제 15항에 따른 백신을 치료할 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 사람을 제외한 동물 생체에서 면역반응에 영향을 미치기 위한 방법.

**청구항 30**

치료 유효량의 제 16항에 따른 약제 조성물을 치료할 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 사람을 제외한 동물의 생체에서 면역반응에 영향을 미치기 위한 방법.

**청구항 31**

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 수두바이러스를 포함하는 세포.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 두개 이상의 상동 외래 유전자를 발현할 수 있는 재조합 수두 바이러스에 관한 것이다. 상기 유전자는 바이러스 게놈에 이중이지만 상호 비교할 때 상동이다. 상기 유전자는 미생물의 특히 밀접하게 연관된 변이체 또는 서브타입으로부터 유도된다. 본 발명은 또한 그러한 재조합 수두 바이러스의 제조방법 및 그러한 재조합 수두 바이러스의 의약 또는 백신으로서 재조합 수두 바이러스의 용도에 관한 것이다. 부가적으로, 사람을 비롯한 살아있는 동물에서 면역반응에 영향을 미치는, 바람직하게는 면역반응을 유도하기 위한 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 모든 살아있는 생물은 박테리아, 바이러스, 진균류 또는 기생충과 같은 전염성 또는 병원성 물질에 의해 끊임 없이 침입받는다. 소위 면역계는 그러한 물질에 의해 유발되는 영구적인 감염, 질환 또는 독성으로부터 생물을 보호한다.

[0003] 포유류의 면역계는 특이적 및 비 특이적 부분으로 나누어지지만 양쪽 부분은 밀접하게 상호 연관되어 있다. 비 특이적 면역반응은 다양한 병원성 물질 또는 전염성 물질에 대하여 즉각적인 방어를 할 수 있다. 특이적 면역

반응은 생물체가 처음으로 물질에 의해 침입받을 때 지연단계 후에 시작된다. 특이적 면역반응은 항원-특이 항체의 생성 및 마크로파지 및, 예를 들면, 세포독성 T-세포(CTL)와 같은 림프구의 발생을 주 토대로 한다. 특이적 면역반응은 특이적 감염으로부터 회복된 환자를 특이적 감염에 대하여 보호하지만 여전히 다른 전염성 질환에는 취약하다는 것이다. 일반적으로, 동일한 또는 아주 유사한 전염성 물질에 의한 두번째 감염은 더욱 완화된 증상 또는 아무런 증상을 초래하지 않는다. 소위 면역성은 아주 오랫동안, 일부 경우에는 평생동안 지속된다. 이러한 근원적인 효과는 백신접종 계획에 사용될 수 있는 면역학적 메모리로서 종종 언급된다.

[0004] 백신접종이라는 용어와 함께, 무해한, 일부 또는 비활성 형태의 전염성 물질에 의해 감염되는 개체가 그 개체내에서 특정 감염성 물질에 대하여 평생은 아니지만 오랫동안 지속되는 면역반응에 영향을 미치는, 바람직하게는 면역반응을 유도하기 위한 방법이 개시된다.

[0005] 사람의 천연두 질환은 바리올라(*Variola*) 바이러스에 의해 유도된다. 바리올라 바이러스는 척추동물 및 무척추동물 세포의 세포질에서 복제하는 복합 DNA 바이러스의 과에 속하는 포스비리대(*Poxviridae*)의 과에 속한다.

[0006] 포스비리대(*Poxviridae*) 과는 척추 및 곤충 숙주 범위를 토대로 2개의 아과(subfamily) 코르도포스비리내(*Chordopoxvirinae*) 및 엔토모포스비리내(*Entomopoxvirinae*)로 나뉜다. 코르도포스비리내(*Chordopoxvirinae*)는 오르쏘포스바이러스(*Orthopoxvirus*)의 다른 속 외에 아비포스바이러스(*Avipoxvirus*)를 포함한다(Fields Virology, ed. by Fields B.N., Lippincott-raven Publishers, 3<sup>rd</sup> edition 1996, ISBN: 0-7817-0253-4, Chapter 83).

[0007] 오르쏘포스바이러스(*Orthopoxvirus*) 속은 인간 천연두의 유발 물질인 바리올라 바이러스 및 낙타 수두, 우두, 양 수두, 염소 수두, 원숭이 수두와 같이 경제적으로 중요한 다른 바이러스 및 백시니아 바이러스를 포함한다. 이들 속의 모든 종류는 유전학적으로 관련되어 있으며 유사한 형태 및 숙주 범위를 갖는다. 엔도뉴클레아제 제한효소지도는 오르쏘포스바이러스(*Orthopoxvirus*)의 상이한 구성원 사이에 90%까지의 높은 서열 일치율을 나타냈다(Mackett & Archard, [1979], J Gen Virol, 45: 683-701).

[0008] 백시니아 바이러스(VV)는 지난 백년 이상 동안 천연두에 대한 백신접종에 사용된 물질에게 붙여진 이름이다. VV가 지금은 멸종한 바이러스의 살아있는 표본인 장기간의 연속적인 과정에 의해 우두 또는 바리올라 바이러스로부터 유도된 신규한 종인지 유전자 재조합의 생성물인지 여부는 알려져 있지 않다. 부가적으로, VV 역사에 있어서 많은 백시니아의 균주가 발생하였다. 이들 상이한 균주는 다양한 면역원성을 나타내고 가장 심각한 것이 후-우두 뇌염인 다양한 정도의 잠재적 합병증도나타낸다. 그러나, 이들 균주의 다수는 천연두에 대하여 백신접종으로 사용되었다. 예를들면, 균주 NYCBOH, 웨스턴 리저브(Western Reserve) 또는 웨쓰(Wyeth)는 주로 미국에서 백신접종에 사용된 반면, 균주 안카라(Ankara), 베른(Bern), 코펜하겐(Copenhagen), 리스터(Lister) 및 MVA는 유럽에서 백신접종으로 사용되었다. 이러한 상이한 균주 VV를 사용한 전세계적인 백신접종 프로그램의 결과로 1980년도에 WHO는 마침내 바리올라 바이러스의 성공적인 박멸을 선언하였다.

[0009] 오늘날, VV는 주로 실험실 균주로서 사용되지만, 이외에도 오르쏘포스바이러스(*Orthopoxvirus*)의 원형으로서 여전히 고려되며, 이것이 VV가 가장 집중적으로 특징화된 바이러스중의 하나가 된 이유이다(Fields Virology, ed. by Fields B.N., Lippincott-raven Publishers, 3<sup>rd</sup> edition 1996, ISBN: 0-7817-0253-4, Chapter 83 and 84).

[0010] VV 및 최근의 다른 수두 바이러스는 외래 유전자의 삽입 및 발현에 사용되었다. 외래 유전자를 살아있는 전염성 수두 바이러스내로 삽입하기 위한 기본적인 수법은 공여자 플라스미드내의 외래 유전요소에 측면에 위치한 수두 DNA 서열과 구조하는 수두 바이러스내에 존재하는 상동 서열간의 재조합을 포함한다. 일반적으로 유전자 재조합은 DNA의 두개의 사슬간의 DNA의 상동부분의 교환이다. 특정 바이러스에서 RNA는 DNA를 대체할 수 있다. 핵산의 상동 부분은 뉴클레오티드 염기의 동일한 서열을 갖는 핵산(DNA 또는 RNA)의 부분이다. 유전자 재조합은 감염된 숙주세포내에서 신규한 바이러스 게놈의 복제 또는 제조중에 자연적으로 발생할 수 있다. 따라서, 바이러스 유전자간의 유전자 재조합은 두개 이상의 상이한 바이러스 또는 다른 유전자 작제물에 의해 공동-감염된 숙주세포에서 발생하는 바이러스 복제중에 발생할 수 있다. 첫번째 게놈으로부터의 DNA 부분은 DNA가 첫번째 바이러스 게놈과 상동인 두번째 공동-감염 바이러스 게놈의 부분을 작제하는데 있어서 상호 교환적으로 사용된다.

[0011] 변형된 전염성 바이러스에 의해 삽입된 DNA 유전자 서열의 성공적인 발현은 두가지 조건을 필요로 한다. 첫째, 변형된 바이러스가 생존가능하도록 삽입은 바이러스의 비필수적 영역내이어야 한다. 삽입된 DNA의 발현을 위한 두번째 조건은 삽입된 DNA와의 적절한 관계로 프로모터가 존재하는 것이다. 규칙적으로, 프로모터는 발현될

DNA 서열로부터 상류에 위치한다.

- [0012] 전염성 질환의 예방을 위한 생 백신으로서, B형 간염 바이러스 표면 항원(HBsAg), 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(InfHA) 또는 플라스모디움 노벨시 포자체(sporozoite) 항원을 발현하는 재조합 VV의 유용성은 입증되었고 검토되었다(Smith 등, [1984] *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 2, 383-407).
- [0013] VV의 다른 이점은 단일의 VV 계통내에 다양한 외래 서열, 유전자 또는 항원을 차지하는 능력이다(Smith & Moss [1983], *Gene*, 25(1): 21-28). 또한, 여러균을 혼합한 백신을 일회 접종하는 것으로 다수의 이종 전염성 질환에 대한 면역성을 유도하는 것이 가능하다는 것으로 보고되었다(Perkus 등, [1985], *Science*, Vol. 229, 981-984).
- [0014] 단일 VV에 의한 다양한 항원의 발현의 일례는 Bray 등에 의해 개시되어 있다. 뎅기 바이러스 혈청형 4의 3가지 상이한 구조 단백질 즉, 캡시드(C), prM(membrane), 외피(E) 단백질과 뎅기 바이러스 혈청형 4의 2가지 비-구조 단백질 즉, NS1과 NS2a를 발현할 수 있는 재조합 VV는 상동 뎅기 바이러스 혈청형 4 침입으로부터 마우스를 보호하는 능력이 있다(Bray 등., [1984], *Virology* 2853-2856).
- [0015] 뎅기 바이러스 혈청형 1(Den-1)에서 뎅기 바이러스 혈청형 4(Den-4)의 4개의 혈청형을 갖는 뎅기 바이러스는 인체의 감염과 관련하여 플라비바이러스(*Flavivirus*) 속의 중요한 구성원중의 하나이다. 뎅기 바이러스 감염은 독감-유사 증상에서부터 심각하거나 또는 치명적인 질환, 쇼크 징후(DSS)를 갖는 뎅기 출혈성열(DHF)에 이르는 질환을 유발한다. 뎅기 발병은 모기 운반자가 많은 열대 및 아열대 지역의 인구밀집지역에서 주요한 공중건강 문제가 되어왔다.
- [0016] 세계 각지에서 모기-유도된 플라비바이러스(*Flavivirus*)에 의해 유도되는 뎅기 감염 및 다른 질환의 전파에 대한 관심은 뎅기 열(DF), 및 뎅기 출혈성열(DHF)을 예방할 수 있는 뎅기 백신 및 일부 또는 모든 모기-유래 플라비바이러스(*Flavivirus*)에 의해 유도된 감염에 대하여 백신접종된 환자를 보호하는데 유용한 뎅기 백신의 개발에 대하여 더욱 많은 노력을 하게 되었다.
- [0017] 대부분의 DF 경우가 4개 혈청형중 어느 하나에 의한 첫번째 감염 후 나타나는 반면, DF의 상당한 퍼센트가 뎅기 바이러스의 첫번째 감염된 혈청형과 다른 혈청형에 의해 두번째 감염된 환자에서 발생한다. 이러한 관찰은 상이한 바이러스 혈청형에 의한 하나의 뎅기 혈청형에 대하여 항체를 갖는 개체를 적절한 간격으로 계속 감염시키면 특정한 경우에서 DHF를 초래할 수 있다는 가설을 발생시킨다.
- [0018] 따라서, 하나의 혈청형에 대한 백신접종은 뎅기 바이러스로부터 완벽한 보호를 제공하지 않지만 동일한 뎅기 바이러스 균주에 의한 감염에 대해서만 완벽한 보호를 제공한다. 더욱 중요한 것은, 하나의 혈청형에 대하여 백신접종된 환자는, 상이한 혈청형의 뎅기 바이러스 균주에 감염될 때 뎅기 출혈성열과 같은 심각한 합병증을 나타내는 위험이 증가된다.
- [0019] 따라서, 모든 4개의 뎅기 바이러스 혈청형으로부터의 항원을 함유하는 다가(polyvalent) 백신이 바람직하다.
- [0020] 상이한 바이러스를 암호화하는 재조합 VV를 혼합함으로써 다가 백신을 제조하는 것이 지금까지는 제안되어져 왔다(Moss, [1990] *Immunology*, 2, 317-327). 그러나, 그러한 다가 백신은 여러가지 결점을 포함한다. 첫째로, 몇몇의 독립된 재조합 VV를 생성하는 것이 성가시다. 독립된 제조과정 외에도, 품질 관리 및 품질 보증이 매우 시간 소모적이다. 두번째로, 상이한 서열을 발현하는 재조합 바이러스의 혼합물에 의한 감염은 그러한 감염이 특히 잘 균형을 이루지 못 할 위험을 항상 안고 있다. 주 위험은 다가 백신에 포함된 모든 상이한 재조합물이 아닌 개별적인 재조합물만이 표적 세포를 감염시킨다는 것이다. 한가지 이유는 재조합 바이러스의 고르지 못한 분포일 것이다. 다른 이유는 단일 세포를 감염시키는 동안 상이한 재조합 바이러스간의 방해일 것이다. 그러한 방해는 중복감염의 현상으로서 공지되어 있다. 이 경우, 다가 백신의 모든 상이한 항원이 아닌 일부 항원만이 감염된 세포로부터 최종적으로 발현되어 환자의 면역계에 제공된다. 그 결과, 면역보호는 일부의 항원에 대하여서만 얻어지며 다가 백신에 의해 제공되거나 또는 제공되어질 수 있는 다양한 항원에 대한 완전한 면역보호는 제공되지 않는다.
- [0021] 뎅기 바이러스 감염에 대한 백신에 있어서, 다가 백신의 연구는, 상이한 서열이 상이한 양으로 또는 예상하지 못한 방법으로 발현되면, 뎅기 바이러스 2의 외피 단백질의 경우에 대해 나타난 바와 같이(Deuble 등., [1998], *J. Virol* 65: 2853) 그러한 백신접종은 환자에게 매우 위험하다는 단점을 갖는다. 재조합 백신 바이러스를 사용한 불완전한 백신접종은 뎅기 바이러스의 모든 혈청형이 아닌 일부에 대해서만 면역보호를 제공한다. 안타깝게도, 뎅기 감염의 경우에서 불완전한 백신접종은 허용되지 않는데, 이는 불완전한 백신접종이 뎅기 출혈성 열과

같은 치명적인 합병증의 위험을 증가시키기 때문이다.

**발명의 상세한 설명**

**발명의 목적**

본 발명의 목적은 전염병 유발 미생물의 하나 이상의 균주, 클레이드, 변이체, 서브타입 또는 혈청형에 의해 유발될 수 있는 전염병에 대하여 안정되고 효과적이며 안전한 백신을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 뎅기 바이러스 감염에 대하여 안정되고 효과적이며 안전한 백신을 제공함으로써 모든 뎅기 바이러스 혈청형에 대하여 안전한 백신접종을 허용하는 것이다.

**발명의 상세한 설명**

본 발명은 전염병 유발 미생물의 상이한 균주, 클레이드, 변이체, 서브타입 또는 혈청형으로부터 유도된 수두 바이러스 상동 유전자를 포함하는 아이디어를 토대로 한다. 상술한 바와 같이, 캡시드(C) 단백질을 암호화하는 유전자, prM(membrane) 또는 외피(E) 단백질을 암호화하는 유전자와 같이, 동일한 형태의 유전자를 모두 포함하는 존재하는 뎅기 바이러스의 4 그룹의 서브타입 또는 혈청형이 있다. 그러나, 동일한 형태의 유전자의 핵산 서열은 4개의 혈청형에 있어서 각각 완전히 동일하지 않고 완벽하게 상동인 것은 아니다: 예를들면, 뎅기 바이러스 혈청형 1, 2, 3 및 4(PrM1-4)의 PrM 유전자간의 서열 비교(Lasergene 4.05 magalign, Macintosh)는 66.5-72.9%의 서열 일치 즉, 대략 65-75%의 상동관계를 나타냈다. 전염병 유발 미생물의 상이한 서브타입의 유전자에서 차이 및 변이는 하나의 서브타입에 대한 백신접종이 왜 자동적으로 동일한 미생물의 다른 변이체에 의한 감염으로부터 보호를 제공하지 못하는지에 대한 이유이다. 따라서, 전염병 유발 미생물의 상이한 균주, 클레이드, 변이체, 서브타입 또는 혈청형으로부터 유도된 상동 유전자 또는 밀접하게 관련된 유전자를 포함한 재조합 바이러스를 생성하는 아이디어이다. 그러나, 앞서 개시한 바와 같이 상동 서열간의 상동 재조합은 바이러스 생활환 도중에 발생하며 심지어는 완벽하게 상동이지 않은 DNA의 부분 사이에서도 발생한다. 따라서, 단일 바이러스 게놈내의 상동 유전자의 삽입은 상동 재조합을 초래하고 또 삽입된 상동 유전자의 결실을 초래할 것이라고 예견되었다.

그러나, 게놈에서 60% 이상의 상동관계를 갖는 두개 이상의 외래 유전자를 포함하는 재조합 수두 바이러스를 생성할 때, 상기 상동 유전자는 바이러스 게놈내로 안정되게 삽입된다는 것이 예상치 않게 발견되었다.

바람직하게는 50% 이상의 상동관계를 갖는 상동 유전자가 바이러스 게놈의 상이한 삽입부위내로 삽입되더라도, 상기 유전자는 또한 바이러스 게놈내로 안정되게 삽입된다: 이 경우, 상기 상동 유전자간의 재조합은 각각 바이러스의 증폭 및 바이러스 생활환에 있어서 중요한 바이러스 유전자의 손실을 부가적으로 초래한다는 것 즉, 바이러스 생활환이 심각하게 손상받을 것이라는 것이 예상되었다. 부가적으로, 재조합의 주기는 두개의 연계된 유전자간의 거리에 비례하기 때문에, 상이한 삽입부위에 위치한 두개 이상의 상동 유전자간의 재조합의 주기는 높을 것이므로 상기 유전자의 결실 및/또는 심각한 방해를 초래할 것으로 예상되었다. 따라서, 재조합은 발생하지 않지만 상동 유전자가 바이러스 게놈의 상이한 삽입부위내로 안정되게 삽입되어 존재하는 것은 아주 놀랄 만한 일이다.

선행행기술에 따르면, 일본 뇌염 바이러스(JEV), 황색열 바이러스(TFV) 및 뎅기 바이러스와 같은 플라비바이러스(*flavivirus*)로부터 외래 DNA를 함유하고 있는 재조합 수두 바이러스는 공지되어 있다(미국특허번호 제 5,514,375호). 그러나, 상기 플라비바이러스로부터 유도된 각각의 유전자는 일회만 동일한 삽입부위내로 삽입되었다. 부가적으로, 적절한 컴퓨터 소프트웨어를 이용한 서열비교(Lasergene 4.05 Megalign, Macintosh)는 수두 바이러스 게놈내로 삽입되고 JEV로부터 유도된 유전자의 상동성은 20.2%-29.6%이었고, YEV로부터 유도된 유전자의 상동성은 29.2%-45.3%이었으며 또 뎅기 바이러스로부터 유도된 상동성은 22.8%-29.5%이었다.

유사한 내용은 변형된 백시니아 바이러스 안카라(MVA)의 동일한 삽입부위 특히, 결실부위 II내로 뎅기 바이러스 항원의 삽입을 개시하는 WO 98/13500에 적용된다.

미국특허번호 제 5,338,683호는 헤르페스 바이러스 당단백질 유전자의 gp 13 및 14를 단일 재조합 수두 바이러스의 두개의 상이한 삽입부위내로 삽입하는 것을 개시한다; 그러나, 두 유전자는 불과 25.2%의 상동성을 갖는다.

변형된 백시니아 바이러스 안카라(MVA)의 동일한 삽입부위(결실부위 II)내로 삽입되는 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 및 핵단백질인 유전자간의 서열비교는 49.1%의 상동관계의 결과를 나타낸다(미국특허번호 제

5,676,950호; Sutter 등, [1994], Vaccine 12: 1032).

- [0033] 미국특허번호 제 5,891,442호는 전염성 낭병의 폴리프로테인 VP2, VP3 및 VP4에 대한 코딩 서열을 함유하는 재조합 수두 바이러스를 개시한다. 상기 유전자들은 융합되므로 단일 삽입부위내로 삽입되며 41.9%-50.3%의 상동성을 갖는다.
- [0034] 마지막으로, 미국특허번호 제 6,217,882호는 52.7%의 상동성을 갖는, 동일한 삽입부위내로 삽입되는 가성 광견병 항원 gp50 및 gp63을 포함하는 재조합 백조 수두 바이러스 백터를 개시한다.
- [0035] 요약하면, 선행기술에 따르면, 50% 이상의 상동관계를 갖는 상동 유전자 또는 서열은 바이러스 게놈내의 동일 또는 단일 삽입부위내로 모두 삽입된다고 말할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따르면, 상동 유전자 또는 서열은 50% 이상의 상동관계 즉, 50%-100%의 상동관계, 즉 50% 이상의 일치하는 뉴클레오티드 염기를 갖는 반면, 50% 미만의 상동성을 갖는 유전자 또는 서열은 이종인 것으로 간주될 수 있다. 본원에서 용어 “상동” 또는 “상동성” 은 유전자 또는 서열이 각각 비교될 때 사용되는 반면, 용어 “외래” 유전자, “외인성” 또는 “이종” 서열은 유전자 또는 서열을 수두 바이러스 게놈과 비교할 때 사용한다; 즉, 상기 용어들은 본 발명에 따라 사용된 바와 같이, 수두 바이러스에서 본래 일반적으로 발견되지 않는 DNA 서열에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 바이러스 게놈과 비교할 때 이종이지만 서로간에 상동인 두개 이상의 유전자를 포함하는 재조합 수두 바이러스에 관한 것이다. 용어 “유전자” 는 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 항원 등을 암호화하는 코딩 서열에 관한 것이다. 상동 유전자로부터 번역된 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드는 동일한 역할을 수행하며 동일한 기능적 특성을 나타낸다. 상동 유전자는 주로 다르지만 관련된 공급원 또는 생물체로부터 유래된다. 본 발명의 한 구체예에 따르면, 코딩 서열에서의 상동성은 바람직하게는 70% 내지 80%, 더 바람직하게는 80% 내지 90% 또는 90% 내지 100%이다. 가장 바람직한 것은 65% 내지 75%의 상동성이다.
- [0037] 본 발명에 따른 재조합 수두 바이러스가 한개의 단일 전염성 단위 또는 한개의 바이러스 입자내에만 관련된 유전 정보를 포함하기 때문에, 상이한 상동 서열의 불균일 감염 및 불안정한 발현의 우려가 전혀 없다. 따라서, 하나의 감염된 세포에서 몇개의 밀접하게 관련된 또는 심지어는 가장 밀접하게 관련된 유전자 또는 거의 일치하는 서열을 발현할 수 있는 본 발명에 따른 재조합 수두 바이러스는 다가 백신 생성에 특히 이점이 있다.
- [0038] 상기 이점은 몇몇의 밀접하게 관련된 균주 또는 뎅기 바이러스와 같은 바이러스의 혈청형에 의해 유발될 수 있는 질환에 대한 백신의 개발에 있어서 특히 흥미롭다. 상이한 뎅기 바이러스 혈청형의 상동 유전자를 포함하는 재조합 수두 바이러스는 실시예에 개시되어 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 상동 유전자 또는 서열은 벡터 바이러스를 제외한 임의의 바이러스, 임의의 박테리아, 임의의 진균류 또는 기생충과 같은 임의의 미생물로부터 유래될 수 있다. 바람직하게는, 상동 유전자 또는 서열은 전염성 또는 병원성 미생물로부터, 가장 바람직하게는 상기 미생물의 상이한 균주 또는 클레이드, 변이체, 서브타입 또는 혈청형으로부터 유래된다.
- [0040] 용어 “균주” 또는 “클레이드” 는 당업자에게 잘 알려져 있는 기술 용어로서 미생물의 분류에 관한 것이다. 분류 시스템은 지금까지 특징화된 미생물을 과(Families), 속(Genera), 종(species), 균주의 계통학적 순서로 분류한다(Fields Virology, ed. by Fields B.N., Lippincott-Raven Publishers, 4<sup>th</sup> edition 2001). 과(Families)의 구성에 대한 기준은 이들의 계통발생의 관계인 반면, 속(Genera)은 공통적인 특징을 공유하는 모든 구성원을 포함하며, 종(species)은 복제 계통을 구성하며 특별한 생태학적 지위를 차지하는 다형적인 계층으로서 정의된다. 용어 “균주” 또는 “클레이드” 는 미생물 즉, 바이러스를 의미하는 것으로 기본적인 형태 또는 게놈 구조 및 유기조직과 같은 공통적인 특징을 공유하지만 숙주 범위, 조직 친화성, 지리학적 분포, 약화 또는 병원성과 같은 생물학적 특성에 있어서는 다르다. 용어 “변이체” 또는 “혈청형” 은 서브타입으로도 불리는 동일한 균주의 구성원사이를 구별하며, 소수의 게놈 변이로 인하여 개별적인 감염 범위 또는 항원 특성을 나타낸다.
- [0041] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 상동 유전자 또는 서열은 바이러스, 바람직하게는 이것에 한정되는 것은 아니지만, 뎅기 바이러스, 웨스트 나일(West Nile) 바이러스 또는 일본 뇌염 바이러스와 같은 플라비바이러스 속에 속하는 바이러스; 바람직하게는 이에만 한정되는 것은 아니지만, 인체 면역결핍 바이러스(HIV)와 같은 레트로바이러스 속에 속하는 바이러스; 바람직하게는 이에만 한정되는 것은 아니지만, 손, 발 및 입 질환, EV71과 같은 장내 바이러스; 레트로바이러스 속에 속하거나 또는 바람직하게는 이것에만 한정되는 것은 아니지만, 인플루엔자 바이러스와 같은 오르쏘마이소바이러스 속에 속하는 바이러스로부터 선택된다. 가장 바람직한 것은 플라비바

이러스로부터 유래된 상동 유전자이다.

- [0042] 다른 바람직한 구체예에 따르면, 상동 유전자는 탱기 바이러스 유전자, 바람직하게는 C, NS1 및/또는 NS2, 또는 바람직하게는 E, 더욱 바람직하게는 PrM으로부터 선택된다. 가장 바람직한 것은 바이러스의 상이한 혈청형으로부터 유도된 상동 유전자이며, 상기 유전자는 4 탱기 바이러스 혈청형의 하나, 둘, 셋 또는 모두로부터 유래될 수 있다.
- [0043] 또 다른 구체예에 따르면, 상동 유전자는 상이한 HIV 균주 또는 클레이드로부터 선택된다. 바람직하게는 상기 상동 유전자는 gap/pol 코딩 서열, 더 바람직하게는 env 코딩 서열 또는 더욱 바람직하게는 구조 및/또는 조절 HIV 코딩 서열의 조합으로부터 선택된다.
- [0044] 본 발명에 적절한 벡터 바이러스는 조류 숙주세포와 같은 선택된 숙주세포에서 용이하게 배양될 수 있지만, 복제 결함이 있거나 또는 인체 또는 인체 세포에서 실질적으로 복제하지 않는 수두 바이러스 그룹으로부터 선택된다.
- [0045] 일부의 바람직한 구체예에 따르면, 본 발명에 따른 수두 바이러스는 카나리 수두 바이러스(Plotkin 등 [1995] Dev Biol Stand. vol 84: pp 165-170. Taylor 등 [1995] Vaccine, vol 13. No. 6: pp 539-549), 가금류 수두 바이러스(Afonso 등 [2000] J. Virol, pp 3815-3831. Fields Virology, ed. by Fields B. N., Lippincott-Raven Publishers 4<sup>th</sup> edition 2001, Chapter 85: page 2916), 핑귄 수두 바이러스(stannard 등 [1998] J. Virol, 79 pp 1637-1649) 또는 그 유도체를 포함하는 그룹으로부터 선택된다. 이들 바이러스가 아비폭스바이러스(*Avipoxviruses*) 속에 속하기 때문에, 이들은 조류세포에서 쉽게 배양되고 증식될 수 있다. 그러나, 포유류 또는 인체 세포에서 이들 바이러스는 복제 결함이 있는 바, 이는 본질적으로 전혀 또는 거의 전염성 후대 바이러스가 생성되지 않는다는 것을 의미한다.
- [0046] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 백시니아 바이러스, 바람직하게는 약화된 백시니아 바이러스는 두개 이상의 상동 유전자를 포함하는 재조합 수두 바이러스를 생성하는데 사용된다.
- [0047] 백시니아 바이러스(VV)가 짧은 상동 서열의 상동 재조합 처리를 거쳐 상동 서열을 결실시킬 수 있다는 것은 공지되어 있지만(Howley 등 [1996], Gene 172: 233-237), 본 발명자들은 그 계통내로 안정하게 삽입되는 상동 서열 또는 유전자를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스를 제공한다. 이 발견은 특히 예상할 수 없었는바, 이는 Howley 등에 따르면, 이미 300 염기쌍(bp) 이하의 짧은 서열이 백시니아 바이러스에서 계통 재배치 및 상동 서열의 결실을 유도하는데 충분하기 때문이었다. 따라서, 당업자들은 더 긴 서열은 더 높은 확률로 재조합을 유도할 수 있을 것으로 예상할 것이다. 그러나, 본 발명에 따르면 완전한 상동 유전자를 포함하는 서열일지라도 백시니아 바이러스의 계통내로 안정하게 삽입될 수 있다.
- [0048] 비제한적인 예이나 백시니아 바이러스의 한 예는 매우 약화되고 숙주 범위가 제한된 백시니아 균주 즉, 변형된 백시니아 안카라(MVA)이다(Sutter, G. 등 [1994], Vaccine 12: 1032-40). MVA는 백시니아 바이러스의 안카라 균주(CVA)의 닭 배아 섬유아세포상에서 약 570 연속적인 패세지에 의해 생성된다(Mayr, A., 등. [1975], Infection 3, 6-14). 이러한 장기간 패세지의 결과로, CVA는 그 계통 서열의 약 31 킬로베이스를 결실시킨다. 생성된 바이러스 균주인 MVA는 매우 숙주세포 제한적인 것으로 개시되어 있다(Meyer, H. 등., J. Gen. Virol. 72, 1031-1038[1991]). 전형적인 MVA 균주는 European Collection of Animal Cell Cultures에 기탁번호 ECACC V00120707로 기탁된 MVA 575이다.
- [0049] 다른 구체예에서, MVA-Vero 균주 또는 그 유도체는 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 상기 균주 MVA-Vero는 European Collection of Animal Cell Cultures에 기탁번호 ECACC V99101431 및 ECACC 01021411로 기탁되었다. MVA-Vero의 안전성은 국제 특허 출원 PCT/EP01/02703에 개시된 바와 같이, 생물학적, 화학적 및 물리적 특징에 의해 나타난다. 표준 MVA와 비교할 때, MVA-Vero는 한개의 추가 계통 결실을 갖는다.
- [0050] 본 발명에 따른 바이러스의 “유도체” 용어는 부모 바이러스와 동일한 특징적인 특성을 나타내지만, 그 계통의 하나 이상의 부분에서 상이함을 나타내는 후대 바이러스를 의미한다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면 MVA-BN를 사용한다. MVA-BN은 European Collection of Animal Cell Cultures에 기탁번호 ECACC V00083008로 기탁되었다. MVA-BN 또는 그 유도체를 사용함으로써 특히 안전한 바이러스 백신이 생성되었는데, 이는 MVA-BN 바이러스가 변형된 백시니아 안카라 바이러스로부터 유도된 극도로 높게 약화된 바이러스이기 때문이다. 따라서, 가장 바람직한 구체예에 있어서 본 발명에 따른 두개 이상의 상동 유전자를 함유하는 MVA-BN 또는 그 유도체는 바이러스 벡터로서 사용된다. 용어 “MVA-BN의 유도체”는 MVA-BN과

비교할 때 동일한 기능 특징을 갖는 바이러스를 의미한다. MVA-BN의 특성, MVA가 MVA-BN 및 그 유도체 인지를 평가하게 하는 생물학적 에세이에 대한 기술 및 MVA-BN 또는 그 유도체의 발생을 허용하는 방법이 WO 02/42480에 개시되어 있다(본원에서 참고문헌으로 참조함). MVA-BN 또는 그 유도체의 기능적인 특징을 검사하기 위한 한 가지 용이한 방법은 인체 HaCat 세포에서 그 약화 및 복제의 결여이다.

- [0052] 본 발명에 따른 재조합 수두 바이러스에 있어서, 외래 서열의 발현은 바람직하게는 수두 바이러스 전사 조절요소, 더 바람직하게는 MVA, 카나리 수두, 가끔류 수두 또는 펙귄 수두 전사 조절요소 또는 가장 바람직하게는 백시니아 바이러스 프로모터에 의해 조절된다. 본 발명에 따른 수두 바이러스 전사 조절요소는 수두 바이러스 시스템에서 모든 전사 조절요소 기능을 포함한다.
- [0053] 본 발명에 따른 외래 서열의 삽입은 바람직하게는 바이러스 게놈의 비-필수적 영역내로 향한다. 수두 바이러스 생활환에 있어서 비-필수적인 비-필수적 영역은, 예를 들면, 수두 바이러스의 유전자 좌 또는 오픈 리딩 프레임(ORF)이다. 또한 두개의 ORF사이내의 공간을 나타내는 유전자내 영역은 본 발명에 따른 비-필수적 영역으로서 간주된다. 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 외인성 서열은 MVA 게놈의 천연 산출 결실부위에 삽입된다(PCT/EP96/02923에 공개되어 있으며 본원에서 참고문헌으로 인용됨).
- [0054] 삽입된 DNA의 방향은 본 발명에 따른 재조합 바이러스의 기능성 또는 안정성에 영향을 미치지 않는다.
- [0055] 본 발명에 따른 재조합 수두 바이러스는 성장이 매우 제한되어 매우 약화되므로 사람 및 심지어는 면역이 손상된 사람을 포함한 광범위한 포유류의 치료에 있어서 이상적인 후보자이다. 따라서, 본 발명은 사람을 비롯한 살아있는 동물의 몸에서 면역반응을 유도하기 위한 약제학적 조성물 및 백신을 또한 제공한다.
- [0056] 상기 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 및/또는 승인된 담체, 첨가제, 항생제, 방부제, 보조제, 희석제 및/또는 안정화제를 일반적으로 포함한다. 그러한 보조물질은 물, 식염수, 글리세롤, 에탄올, 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질 등일 수 있다. 적절한 담체는 단백질, 다당류, 폴리락트 산, 폴리글리콜 산, 폴리머 아미노 산, 아미노산 공중합체, 지질 응집물 등과 같이 일반적으로 크고 느리게 대사되는 분자이다.
- [0057] 백신의 제조를 위해, 본 발명에 따른 재조합 수두 바이러스는 생리학적으로 허용가능한 형태로 변환된다. 이는 천연두에 대한 백신접종에 사용된 수두 바이러스 백신의 제조에 있어서 경험을 토대로 하여 실시될 수 있다(Stickl, H. 등에 의해 개시됨. [1974] Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392). 예를들면, 약 10mM 트리스, pH 7.4의 NaCl 140mM에서 조제되고 5x10E8 TCID<sub>50</sub>/ml의 역가를 갖는 정제된 바이러스를 -80°C에서 저장한다. 백신 주사의 제조를 위해 예를들면, 바이러스의 10E2-10E8 입자는 앰플내, 바람직하게는 유리 앰플내의 1% 사람 알부민 및 2% 펩톤의 존재하의 100ml의 인산-완충 식염수(PBS)에서 동결건조된다. 다르게는, 백신 주사는 제제에서 바이러스의 순차적 동결-건조에 의해 생성될 수 있다. 이 제제는 만니톨, 텍스트란, 당, 글리신, 락토오스 또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 추가 첨가제 또는 산화 방지제 또는 비활성 가스, 안정화제 또는 생체내 투여에 적합한 재조합 단백질(예를들면, 사람 혈청 알부민)과 같은 다른 보조제를 함유할 수 있다. 이어 유리 앰플을 밀봉하고 4°C 및 실온사이에서 몇개월동안 저장할 수 있다. 그러나, 다른 요구사항이 없는 한, 상기 앰플은 바람직하게는 -20°C미만에서 저장될 수 있다.
- [0058] 예방접종 또는 치료를 위해, 동결건조물은 0.1 내지 0.5ml의 수용액, 바람직하게는 생리 식염수 또는 트리스 완충액에서 용해되며 전신적으로 또는 국소적으로, 즉 비경구, 피하, 정맥내, 근육내 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 투여경로에 의해 투여될 수 있다. 투여 형태, 복용량 및 투여횟수는 공지된 방식으로 당업자에 의해 최적화될 수 있다. 그러나 가장 일반적으로, 환자는 첫번째 백신접종을 한지 약 한달 내지 6주 후에 두번째 백신접종을 한다.
- [0059] 본 발명에 따른 재조합 바이러스는 외인성 코딩 서열을 표적 세포내로 도입하는데 사용된다. 외인성 코딩 서열의 표적 세포내로의 도입은 시험관내에서 각각 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 항원 및 항원 결정기를 생성하는데 사용된다. 또한 상동 또는 이종 서열을 세포내로 도입하기 위한 방법은 시험관내 및 생체내 치료에 적용될 수 있다. 시험관내 치료에 있어서, 본 발명에 따른 재조합 수두 바이러스에 의해 이전에 감염된 분리된 세포는 면역반응을 유도하기 위한 살아있는 동물의 몸에 투여된다. 생체내 실험에 있어서, 본 발명에 따른 재조합 수두 바이러스는 면역 반응을 유도하기 위해 살아있는 동물의 몸에 직접적으로 투여된다. 이 경우, 접종부위를 둘러싸고 있는 세포는 생체내에서 본 발명에 따른 바이러스 또는 재조합 바이러스에 의해 직접적으로 감염된다. 감염 후, 상기 세포는 외인성 코딩 서열에서 암호화되는 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 또는 항원을 합성한 다음 세포 표면에 이들 또는 이들의 일부를 제공한다. 면역 시스템의 특수화된 세포는 그러한 외래 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 항원 또는 항원결정기의 존재를 인식하여 특이적 면역반응을 개시한다.

- [0060] 재조합 수두 바이러스를 얻기 위한 방법 또는 수두 바이러스 게놈내로 외인성 코딩 서열을 삽입하기 위한 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 부가적으로, 상기 방법은 실시예에 개시되어 있으며 또한 하기의 참고문헌으로부터 추론될 수 있다:
- [0061] -Molecular Cloning, A laboratory Manual. Second Edition. By J. Sambrook, E.f. Fritsch and T. Maniatis. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989 : DNA의 클로닝, RNA 분리, 웨스턴 블롯 분석, RT-PCR 및 PCR 증폭수법과 같은 표준 분자생물학 수법의 여러기술 및 노하우를 개시함;
- [0062] -Virology Methods Manual. Edited by Brian WJ Mahy and Hillar O Kangro. Academic Press. 1996: 바이러스의 취급 및 조작수법 개시;
- [0063] -Molecular Virology: A Practical Approach. Edited by AJ Davison and RM Elliott. The Practical Approach Series. IRL Press at Oxford University Press. Oxford 1993. Chapter 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectors;
- [0064] -Current Protocols in Molecular Biology. Publisher: John Wiley and Son Inc. 1998. Chapter 16, section IV: Expression of proteins in mammalian cells using Vaccinia viral vector: MVA의 취급, 조작 및 유전자 조작 수법과 노하우 기재.
- [0065] 본 발명에 따른 재조합 수두 바이러스의 생성을 위해, 상이한 방법이 적용될 수 있다: 바이러스내로 삽입될 DNA 서열은 수두 바이러스의 DNA의 부분에 상동인 DNA가 삽입되는 대장균 플라스미드 작제물내에 놓일 수 있다. 별도로, 삽입될 DNA 서열은 프로모터에 결합된다. 프로모터-유전자 연결이 양쪽 말단에서 비필수 유전자 좌를 함유하는 수두바이러스 DNA의 영역 측면에 위치하는 DNA 서열에 상동인 DNA에 의해 측면에 접하게 되도록 상기 프로모터-유전자 연결이 플라스미드 작제물에 위치하게 된다. 생활할 플라스미드 작제물은 대장균내에서 성장 증폭되어 분리될 수 있다. 상기 DNA를 함유하는 분리된 플라스미드는 수두 바이러스와 함께 닭 배아 섬유아세포 (CEF)와 같은 세포 배양물에 형질감염된다. 플라스미드내의 상동 수두 DNA와 바이러스 게놈 사이의 재조합은 외래 DNA 서열의 존재로 변형된 수두 바이러스를 생성한다.
- [0066] 보다 바람직한 구체예에 따르면, 세로 배양에 적합한 세포, 예컨대 CEF 세포를 수두 바이러스에 의해 감염시킨다. 이어, 상기 감염된 세포를, 수두 바이러스 발현 조절 요소의 전사 조절하에서, 외래 유전자를 포함하는 제1 플라스미드 벡터에 의해 형질감염시킨다. 상기 설명한 바와 같이, 상기 플라스미드 벡터는 외래 서열이 수두 바이러스 게놈의 선택된 부분에 삽입되도록 유도할 수 있는 서열을 또한 포함한다. 경우에 따라, 플라스미드 벡터는 수두 바이러스 프로모터에 기능적으로 연결된 마커 및/또는 선택 유전자를 포함하는 카세트도 또한 포함한다. 적합한 마커 또는 선택 유전자는 예컨대 녹색 형광 단백질,  $\beta$ -갈락토시다제, 네오마이신, 포스포리보실 트랜스퍼라제 또는 기타 마커를 암호화하는 유전자이다. 선택 또는 마커 카세트의 사용은 생성된 재조합 수두 바이러스의 확인과 분리를 간편하게 해 준다. 그러나, 재조합 수두 바이러스는 PCR 수법에 의해서도 확인될 수 있다. 이어, 다른 세포를 상기 기재한 바와 같이 얻은 재조합 수두 바이러스에 의해 감염시키고 제1 벡터에 포함된 유전자와 상동인 유전자를 포함하는 제2 벡터를 이용하여 형질감염시킨다. 이 경우, 상기 유전자는 수두 바이러스 게놈의 상이한 부분에 포함될 것이고, 제2 벡터는 상동 유전자를 수두 바이러스의 게놈으로 통합시키는 서열에서 상이하다. 상동 재조합 후, 2개의 상동 유전자를 포함하는 재조합 바이러스가 분리될 수 있다. 2개 이상의 상동 유전자를 재조합 바이러스에 도입하기 위해서, 감염을 위해 상기 단계에서 분리한 재조합 바이러스를 사용하는 것에 의해 또 형질감염을 위한 상동 유전자를 포함하는 다른 벡터를 사용하는 것에 의해 감염 단계와 형질감염 단계를 반복한다.
- [0067] 다르게는, 상술한 바와 같은 감염 및 형질감염의 단계는 상호교환가능하다 즉, 적절한 세포는 처음에 외래 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터에 의해 형질감염된 다음, 수두 바이러스에 의해 감염될 수 있다.
- [0068] 다른 예로서, 각 상동 유전자를 상이한 바이러스내로 도입하고, 수득한 모든 재조합 바이러스에 의해 세포를 공동감염시키며 모든 상동 유전자를 포함하는 재조합물을 찾는 것도 또한 가능하다.
- [0069] 본 발명은 발현가능한 상동 유전자를 수두 바이러스 게놈내로 통합하는 것을 유도할 수 있는 두개 이상의 플라스미드 벡터 작제물을 포함하는 키트를 또한 제공한다. 적절한 클로닝 부위외에, 그러한 플라스미드 벡터는 수두 바이러스내의 선택된 부분에 외래 서열의 삽입을 유도할 수 있는 서열을 포함한다. 경우에 따라, 그러한 벡터는 선택 또는 마커 유전자 카세트를 포함한다. 상기 키트는 상기 벡터 작제물을 통하여 삽입된 하나 또는 몇 개의 상동 유전자에 대하여 재조합서인 바이러스 및 경우에 따라 선별 또는 마커 유전자를 선별하기 위한 수단

및 지침을 또한 포함한다.

[0071] 또 다른 구체예에 따르면, 본 발명은 본 발명의 제조합 수두 바이러스로부터 유래되거나 또는 제조합 수두 바이러스에 상동인 DNA 서열 또는 그 부분을 포함한다. 그러한 서열은 본 발명에 따른 하나의 상동 유전자의 하나 이상의 단편 및 본 발명에 따른 계놈 수두 바이러스 서열의 하나 이상의 단편을 포함하는 외래 서열의 적어도 일부분을 포함하며, 상기 계놈 수두 바이러스 서열은 바람직하게는 외래 서열과 측면을 접하고 있다.

[0072] 그러한 DNA 서열은 바이러스 또는 그 유도체를 확인 또는 분리하는데 사용될 수 있고, 예컨대, 이들을 사용하여 PCR-프라이머, 교배탐침(probe)을 생성하거나 또는 배열 기술에 사용될 수 있다.

**실시예**

[0080] 하기의 실시예는 본 발명을 더 설명할 것이다. 본 발명의 실시예에 의해 제공된 기술의 적응성은 다른 실시예를 제한하지 않는다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0081] **실시예 1**

[0082] **삽입벡터**

[0083] 결실 A에 대한 삽입벡터

[0084] 계놈 위치 7608-7609에 각각 대응하는 소위 결실 A 또는 결실 1에서 MVA 계놈내로 외래 서열의 삽입을 위해, 결실부위 A에 인접한 측면 서열의 약 600bp를 포함하는 플라스미드 벡터를 작제하였다. 계놈 MVA-BN DNA로부터 측면서열을 분리시키기 위해, 적절한 PCR 프라이머는 적합한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 고안할 수 있다 (DNAsis, Hitashi software engineering, San Bruno, USA). 그러한 프라이머는 벡터 플라스미드내로 측면서열을 클론화하는데 사용되는 제한효소 부위를 갖는 연장된 부위를 포함한다. 이들 측면 서열 사이에, 선별 유전자 카세트 예를들면, NPT II 유전자(네오마이신 내성)를 수두 바이러스 프로모터의 전사 조절하에 도입하였다. 부가적으로, 결실부위 A내로 삽입될 추가 유전자 또는 외래 서열의 삽입에 대한 클로닝 부위가 있다. 본 발명에 따른 한개의 그러한 벡터 작제물은 도 2에 도시되어 있다(pBNX10).

[0085] 결실 E에 대한 삽입벡터

[0086] 계놈 위치 170480-170481에 각각 대응하는 소위 결실 E 또는 결실 4에서 MVA 계놈내로 외래 서열의 삽입을 위해, 결실부위 E에 인접한 측면 서열의 약 600bp를 포함하는 벡터를 작제하였다. 상기 벡터는 상술한 바와 같이 고안하고 작제하였다. 이들 측면서열 사이에, EGFP 유전자(녹색 형광 단백질, Clonetech)는 수두 바이러스 프로모터의 전사 조절하에 위치시킨다. 부가적으로, 결실부위 A내로 삽입될 추가 유전자 또는 외래 서열의 삽입에 대한 클로닝 부위가 있다. 본 발명에 따른 한개의 그러한 벡터 작제물은 도 3에 도시되어 있다(pBNX32).

[0087] 결실 2에 대한 삽입벡터

[0088] 계놈 위치 20718-20719에 대응하는 소위 결실 2에서 MVA 계놈내로 외래 서열의 삽입을 위해, 결실부위 2에 인접한 측면 서열의 약 600bp를 포함하는 벡터를 작제하였다. 상기 벡터는 상술한 바와 같이 고안하고 작제하였다. 이들 측면서열 사이에, hbfp 유전자(인체화된 청색 형광 단백질, Pavalkis GN 등.)는 수두 바이러스 프로모터의 전사 조절하에 위치시킨다. 부가적으로, 결실부위 2내로 삽입될 추가 유전자 또는 외래 서열의 삽입에 대한 클로닝 부위가 있다. 본 발명에 따른 한개의 그러한 벡터 작제물은 도 4에 도시되어 있다(pBNX36).

[0089] 유전자내 영역, I4L에 대한 삽입벡터

[0090] 계놈 위치 56760에 대응하는 ORF I3L 및 I4L간의 유전자내 영역에서 외래 서열을 삽입하기 위해, I4L 유전자 좌에서 유전자내 영역에 인접한 측면 서열의 약 600bp를 포함하는 벡터를 작제하였다. 상기 벡터는 상술한 바와 같이 고안하고 작제하였다. 이들 측면서열 사이에, EcoGpt 유전자(또는 gpt는 대장균으로부터 분리된 포스포리보실 트랜스퍼라아제 유전자)는 수두 바이러스 프로모터의 전사 조절하에 위치시킨다. 부가적으로, I4L ORF 뒤의 유전자내 영역내로 삽입될 추가 유전자 또는 외래 서열의 삽입에 대한 클로닝 부위가 있다. 본 발명에 따른 한개의 그러한 벡터 작제물은 도 5에 도시되어 있다(pBNX39).

[0091] **제조합 수두 바이러스내에 통합된 몇몇의 상동 유전자를 포함하는 제조합 수두 바이러스의 작제.**

[0092] 삽입벡터

[0093] MVA 계놈내의 멩기 바이러스의 4개의 혈청형의 4개 PrM 유전자의 삽입을 위해 4개의 독립된 제조합 벡터를 사용

하였다.

- [0094] 상기에서 상세하게 개시한 바와 같이, 이들 박터는 상동 재조합에 의한 표적 삽입에 대한 MVA 게놈에 상동인 서열을 함유한다. 부가적으로, 각 박터는 선별-또는 리포터 유전자 카세트를 함유한다.
- [0095] 4개의 땡기 바이러스 혈청형의 PrM 서열은 소량의 어닐링 및 PCR 증폭에 의해 합성적으로 만들어진다. 상기 PrM 서열은 수두 바이러스 요소의 하류에서 클론화되어 발현 카세트를 형성한다. 이 발현 카세트는 이어 관련된 삽입박터 작제물의 클로닝 부위내로 클론화된다.
- [0096] 그 결과, 결실 A에 대한 삽입 박터 작제물은 땡기 바이러스 혈청형 2의 PrM 유전자를 함유한다(도 6-pBN39). 결실 2에 대한 삽입 박터 작제물은 땡기 바이러스 혈청형 의 PrM 유전자를 함유한다(도 7-pBN49). 유전자내 영역 I4L에 대한 삽입박터 작제물은 땡기 바이러스 혈청형 3의 PrM 유전자를 함유한다(도 8-pBN50). 결실 E에 대한 삽입 박터 작제물은 땡기 바이러스 혈청형 4의 PrM 유전자를 함유한다(도 9-pBN40).
- [0097] 삽입박터의 PCR 확인
- [0098] 클로닝 방법의 확인을 위해, PCR 에세이를 실시하였다. 이러한 PCR 에세이에 있어서, 선택된 프라이머 쌍은 삽입부위에 대하여 특정 측면서열에 특이적으로 결합되는 프라이머와 높은 상동성의 땡기 바이러스 PrM 유전자중 의 하나에 특이적으로 결합되는 두번째 프라이머의 조합이다.
- [0099] 땡기 바이러스 혈청형 2의 PrM 유전자를 함유하는 결실 A에 대한 삽입박터는 프라이머 oBN93(CGCGGATCCATGCTGAACATCTTGAACAGGAGACGCAGA. 서열번호 1) 및 oBN477(CATGATAAGAGATTGTATCAG. 서열번호 2)을 사용하여 검사하였다.
- [0100] 땡기 바이러스 혈청형 1의 PrM 유전자를 함유하는 결실 2에 대한 삽입박터는 프라이머 oBN194(ATGTTGAACATAATGAACAGGAGGAAAAGATCTGTGACCATGCTCCTCATGCTGCTGCCACAGCCCTGGCGTTCCATCT. 서열번호 3) 및 oBN476(GATTTTGCTATTCAGTGGACTGGATG 서열번호 4)을 사용하여 검사하였다.
- [0101] 땡기 바이러스 혈청형 3의 PrM 유전자를 함유하는 유전자내 영역 I4L에 대한 삽입박터는 프라이머 oBN255(CCTTAATCGAATTCTCATGTCATGGATGGGGTAACAGCATTAAATAGT. 서열번호 5) 및 oBN479(GCTCCCATTCATTTCACATTGG. 서열번호 6)를 사용하여 검사하였다.
- [0102] 땡기 바이러스 혈청형 4의 PrM 유전자를 함유하는 결실 E에 대한 삽입박터는 프라이머 oBN210(ATCCCATTCCTGAATGTGGTGTAAAGCTACTGAGCGCTTCTCTCGTCTCCGTTCTCCGCTCTGGGTGCATGTCCCATAC. 서열번호 7) 및 oBN478(GTACATGGATGATATAGATATG. 서열번호 8)을 사용하여 검사하였다.
- [0103] PCR 실험은 Thermal cycler GeneAmp 9700(Perkin Elmer)에서 10x PCR 완충액, MgCl<sub>2</sub> 완충액 및 Taq DNA 폴리머라아제(Roche, Cat.no. 201205) 또는 등가물을 함유하는 Taq DNA 폴리머라아제 키트를 사용하여 실시하였다. 일반적으로 PCR 반응은 45 $\mu$ l 마스터믹스(mastermix), 샘플 DNA 및 ddH<sub>2</sub>O를 함유하는 총 반응 부피 50 $\mu$ l를 사용하여 제조하였다. 상기 마스터믹스는 30.75 $\mu$ l DdH<sub>2</sub>O, 5 $\mu$ l 10x 완충액, 1 $\mu$ l dNTP-믹스(각각 10mM), 각 프라이머 2.5 $\mu$ l(5 pmol/ $\mu$ l), 3 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>(25mM) 및 0.25 $\mu$ l Taq-폴리머라아제(5 U/ $\mu$ l)를 사용하여 제조하여야 한다.
- [0104] 상기 증폭은 하기의 프로그램을 사용하여 실시하였다:
- [0105] 1) 변성: 4분 94 $^{\circ}$ C
- [0106] 2) 30주기:
- [0107] 변성: 30초 94 $^{\circ}$ C
- [0108] 어닐링: 30초 55 $^{\circ}$ C
- [0109] 신장: 1-3분 72 $^{\circ}$ C
- [0110] 3) 신장: 7분 72 $^{\circ}$ C
- [0111] 4) 저장 4 $^{\circ}$ C
- [0112] 삽입된 유전자의 크기를 토대로 하여 신장 시간은 1 min/kb이상 이어야 한다.
- [0113] 도 10에 나타난 상기 PCR 결과는 단일 삽입에 사용된 프라이머 조합의 특이성을 입증하였다.

- [0114] 프라이머 조합 oBN194/oBN476은 삽입물로서 결실 2 및 PrM1에 대하여 특이적이다. 플라스미드 pBN49의 예상되는 PCR 단편은 678bp의 크기를 갖는다(레인 3에 도시, 겔의 상부).
- [0115] 프라이머 조합 oBN255/oBN479는 삽입물로서 유전자내 영역 I4L 및 PrM3에 대하여 특이적이다. 플라스미드 pBN50의 예상되는 PCR 단편은 825bp의 크기를 갖는다(레인 9에 도시, 겔의 상부).
- [0116] 프라이머 조합 oBN210/oBN478은 삽입물로서 결실 E 및 PrM4에 대하여 특이적이다. 플라스미드 pBN40의 예상되는 PCR 단편은 607bp의 크기를 갖는다(레인 5에 도시, 겔의 하부).
- [0117] 프라이머 조합 oBN93/oBN477은 삽입물로서 결실 A 및 PrM2에 대하여 특이적이다. 플라스미드 pBN39의 예상되는 PCR 단편은 636bp의 크기를 갖는다(레인 11에 도시, 겔의 하부).
- [0118] 상동 재조합을 통한 재조합 MVA의 발생
- [0119] 재조합 MVA에 의한 외래 유전자의 발현을 위해, 이들 유전자는 상동 재조합이라 불리는 방법에 의해 바이러스 계통내로 삽입하였다. 이 목적을 위해, 관심을 갖고 있는 외래 유전자는 상술한 바와 같이 삽입벡터내로 클론화하였다. 이 벡터는 MVA-BN에 의해 세포를 감염시킨 후 형질감염시켰다. 재조합은 감염 및 형질감염된 세포의 세포질내에서 발생한다. 삽입벡터내에 또한 함유되어 있는 레인별 및/또는 리포터 카세트를 사용하여 재조합 바이러스를 포함하는 세포를 확인하고 분리시켰다.
- [0120] 상동 재조합
- [0121] 상동 재조합을 위해, BHK(베이비 햄스터 신장) 세포 또는 CEF(일차 닭 배아 섬유아세포) 세포는 혈청없는 제조 과정에 있어서 DMEM(Dulbecco 변형 이글 배지, Gibco BRL) + 10% 우태혈청(FCS) 또는 VP-SFM(Gibco BRL) + 4mmol/l L-글루타민을 사용한 6웰 플레이트에서 살포시켰다.
- [0122] 세포는 성장 상에 있도록 요구되므로 형질감염 당일에 60-80% 콘플루언스에 도달해야 한다. 감염에 대한 감염 다양성(moi)의 측정용으로 공지된 세포의 수로서, 살포하기 전에 세포수를 세었다.
- [0123] 감염을 위해, MVA 균주는 DMEM/FCS 또는 VP-SFM/L-글루타민에서 희석시켜 500 $\mu$ l 희석물이 0.01의 moi를 나타내는 바이러스의 적절한 양을 함유하게 한다. 세포는 살포후에 한번 나뉜 것으로 추정된다. 배지를 세포로부터 제거시키고 세포는 500 $\mu$ l의 희석된 바이러스를 사용하여 실온에서 1시간동안 흔들어서 감염시켰다. 집종원을 제거하고 세포를 DMEM/VP-SFM으로 세척시켰다. 감염된 세포를 1.6ml DMEM/FCS 및 VP-SFM/L-글루타민에 각각 방치하는 동안, 형질감염 반응 장비를 설치하였다(Qiagen Effectene Kit).
- [0124] 형질감염을 위해, "Effectene" 형질감염 키트(Qiagen)을 사용하였다. 형질감염 혼합물은 최종 부피가 150 $\mu$ l 가 되도록 완충액 EC를 사용하여 1-5 $\mu$ g의 선형 삽입 벡터(다양한 형질감염을 위한 총 양)로 조제하였다.  $\mu$ g DNA 당 8.0 $\mu$ l 인헨서를 부가하고, 와류를 가하며 실온에서 5분간 배양시켰다. 이어, 저장액 튜브를 와류회전처리후에  $\mu$ g DNA 당 25 $\mu$ l의 Effectene을 부가하고 용액을 와류회전처리에 의해 충분히 혼합시키고 실온에서 10분간 배양하였다. 600 $\mu$ l의 DMEM/FCS 및 VP-SFM/L-글루타민을 각각 부가하고 혼합한 후에, 전체 형질감염 혼합물을 이미 배지로 덮여있는 세포에 부가하였다. 배지를 천천히 흔들어 형질감염 반응을 혼합시켰다. 배양은 37 $^{\circ}$ C에서 5% CO<sub>2</sub>를 사용하여 밤새도록 실시하였다. 다음날, 배지를 제거하고 신선한 DMEM/FCS 또는 VP-SFM/L-글루타민으로 대체하였다. 배양은 3일동안 계속되었다.
- [0125] 생성물을 얻기 위해, 세포를 배지내로 빼내고, 세포 현탁액을 적절한 튜브로 옮겨 단기간 저장을 위해서는 -20 $^{\circ}$ C에서 또는 장기간의 저장을 위해서는 -80 $^{\circ}$ C에서 냉동시켰다.
- [0126] MVA내로 PrM4의 삽입
- [0127] 첫번째로, 상술한 프로토콜에 따라 MVA-BN에 의해 세포를 감염시키고 땡기 바이러스 혈청형 4의 PrM 유전자 및 리포터 유전자로서 EGFP 유전자를 함유하는 삽입벡터 pBN40에 의해 추가적으로 형질감염시켰다. 형질감염된 벡터가 리포터 유전자, EGFP를 함유하기 때문에, 합성된 단백질은 재조합 바이러스에 의해 감염된 세포내에서 마지막 3일째에 검출가능하다. 생성된 재조합 바이러스는 플라크 정제에 의해 정제시켜야 한다.
- [0128] 플라크 정제를 위해, 감염된 세포(형광의 또는 착색된)는 피펫 팁을 사용하여 분리, 재현탁시키고 200 $\mu$ l PBS 또는 배지에서 흡입시켰다. 이어, 약 10E<sup>6</sup> 세포를 함유하는 새로운 배양 배지를 100 $\mu$ l의 재현탁된 플라크에 의해 감염시켰다. 48시간 후, 300 $\mu$ l PBS로 옮겼다. DNA를 현탁액으로부터 추출하여 PCR 에세이를 사용하여 검사하였다. 예상된 밴드를 나타내는 클론을 선택하고 새로운 6-웰 플레이트는 이 바이러스의 다른 양에 의해 감염시켰

다. 1% 아가로스를 사용하여 웰을 증첩하여 놓는것은 바이러스의 추가적 전파를 막는다. 48시간 후 재조합 바이러스 클론을 포함하는 감염세포를 분리하였다.

- [0129] 어떠한 야생형의 MVA-BN이 PCR 에세이에서 검출되지 않을때까지 이 방법을 반복하였다.
- [0130] 4회의 플라크 정제 후, 재조합 바이러스, MVA-PrM은 예상되는 삽입(상술한 바와 같이, oBN210 및 oBN478)을 선택적으로 증폭시키는 프라이머 쌍 및 대조용으로 삽입부위 결실 E(oBN453: GTTGAAGGATTCACTCCGTGGA, 서열번호 9 및 oBN454: GCATTCACAGATTCTATTGTGAGTC, 서열번호 10)을 특이적으로 인식하는 프라이머 쌍을 사용하는 PCR 에세이에 의해 확인하였다.
- [0131] MVA-PrM4내로 PrM2의 삽입
- [0132] 상술한 프로토콜에 따라 MVA-PrM4에 의해 세포를 감염시키고 텡기 바이러스 혈청형 2의 PrM 유전자 및 선택별 유전자로서 NPT II 즉, 네오마이신 내성 유전자를 함유하는 삽입벡터 pBN39에 의해 추가적으로 형질감염시켰다. 항생제 내성 유전자를 발현하는 재조합 MVA의 정제를 위해, 플라크 정제전에 선택적 조건하에서 3회의 바이러스 증폭을 추천하였다. 네오마이신포스포트랜스퍼라아제 선택별을 위해, G418을 배지에 부가하였다. G418은 네오마이신의 유도체이며 리보솜의 작용에 의한 방해에 의해 단백질-생합성을 억제한다. NPT 유전자 활성화는 인산화에 의해 G418을 비활성화시킨다.
- [0133] 네오마이신 선택별 재조합 바이러스하에서 16회의 플라크 정제 후, MVA-PrM4/PrM2는 예상되는 삽입물(상술한 바와 같이, oBN93 및 oBN477)을 선택적으로 증폭시키는 프라이머 쌍 및 대조용으로 삽입부위 결실 A(oBN477: 상술한 바와 같음) 및 oBN452: GTTTCATCAGAAATGACTCCATGAAA, 서열번호 11)을 특이적으로 인식하는 프라이머 쌍을 사용하는 PCR 에세이에 의해 확인하였다. 부가적으로, 결실 E내로 PrM4의 삽입 또한 프라이머 쌍에 의해 확인하였다: oBN210-oBN478 및 oBN453-oBN454.
- [0134] MVA내로 PrM1의 삽입
- [0135] 상술한 프로토콜에 따라 MVA-BN에 의해 세포를 감염시키고 텡기 바이러스 혈청형 1의 PrM 유전자 및 리포터 유전자로서 hbfp 즉, 인체화된 청색 형광 단백질을 함유하는 삽입벡터 pBN49에 의해 추가적으로 형질감염시켰다. 합성된 hbfp 단백질은 재조합 바이러스에 의해 감염된 세포내에서 마지막 3일째에 검출가능하다. 생성된 재조합 바이러스는 플라크 정제에 의해 정제시켰다.
- [0136] 10회의 플라크 정제 후, 재조합 바이러스, MVA-PrM1은 예상되는 삽입물(상술한 바와 같이, oBN194 및 oBN476)을 선택적으로 증폭시키는 프라이머 쌍 및 대조용으로 삽입부위 결실 2(oBN54: CGGGGTACCCGACGAACAAGGAAGTGTAGCAGAGGCATC, 서열번호 12 및 oBN56: AACTGCAGTTGTTTCGTATGTCATAAATTCTTTAATTAT, 서열번호 13)을 특이적으로 인식하는 프라이머 쌍을 사용하는 PCR 에세이에 의해 확인하였다.
- [0137] MVA내로 PrM3의 삽입
- [0138] 상술한 프로토콜에 따라 MVA-BN에 의해 세포를 감염시키고 텡기 바이러스 혈청형 3의 PrM 유전자 및 리포터 유전자로서 Ecogpt 유전자(Ecogpt 또는 간략화해서 gpt는 포스포리보실 트랜스퍼라아제 유전자를 의미한다)를 함유하는 삽입벡터 pBN50에 의해 추가적으로 형질감염시켰다. 생성된 재조합 바이러스는 마이코페놀산, 크산틴 및 하이포크산틴의 부가에 의한 포스포리보실 트랜스퍼라아제 대사 선택하에서 3회의 플라크 정제에 의해 정제시켰다. 마이코페놀 산(MPA)은 이노신 모노포스페이트 탈수소효소를 억제하며 대부분의 세포 주에서 퓨린 합성의 방해 및 바이러스 복제의 억제를 초래한다. 이러한 방해는 구성적 프로모터로부터 Ecogpt를 발현하여 크산틴 및 하이포크산틴 기질을 제공함으로써 극복될 수 있다.
- [0139] 생성된 재조합 바이러스, MVA-PrM3은 예상되는 삽입물(상술한 바와 같이, oBN255 및 oBN479)을 선택적으로 증폭시키는 프라이머 쌍 및 대조용으로 삽입부위 I4L(oBN499: CAACTCTCTTCTTGATTACC, 서열번호 14 및 oBN500: CGATCAAAGTCAATCTATG, 서열번호 15)을 특이적으로 인식하는 프라이머 쌍을 사용하는 PCR 에세이에 의해 확인하였다.
- [0140] MVA-PrM1 및 MVA-PrM3의 공동 감염
- [0141] 상술한 프로토콜에 따라 동일한 양의 MVA-PrM1 및 MVA-PrM3에 의해 세포를 감염시켰다. 포스포리보실 트랜스퍼라아제 대사 선택하에서 3회의 플라크 정제 후, 청색 형광 클론의 재조합 바이러스는 프라이머 쌍(상술한 바와 같이, oBN255 및 oBN479. oBN499 및 oBN500. oBN194 및 oBN476. oBN54 및 oBN56)을 사용한 PCR에 의해 분석하였다. 생성된 재조합 바이러스를 MVA-PrM1/PrM3로 지정하였다.

- [0142] MVA-PrM1/PrM3의 및 MVA-PrM2/PrM4의공동 감염
- [0143] 상술한 프로토콜에 따라 동일한 양의 MVA-PrM1/PrM3 및 MVA-PrM2/PrM4에 의해 세포를 감염시켰다. 포스포리보실 트랜스퍼라아제 대사 및 네오마이신 선택하에서 플라크 정제를 실시하였다. 녹색 및 청색 형광을 유도하는 재조합 바이러스는 프라이머 쌍(상술한 바와 같이, oBN255 및 oBN479. oBN499 및 oBN500. oBN194 및 oBN476. oBN54 및 oBN56. oBN93 및 oBN477. oBN477 및 oBN452. oBN210 및 oBN478. oBN453 및 oBN454)을 사용한 PCR에 의해 분리 및 분석하였다.
- [0144] 4개 PrM 유전자 모두를 포함하는 재조합 바이러스의 PCR 분석(클론 20)은 도 11에 나타나 있다. 겔의 상부에서는 재조합 바이러스에 대한 상이한 PCR 결과를 나타내는 반면, 하부에서는 대조용 플라스미드(나타난 바와 같이)에 대해 동이한 PCR 반응의 결과를 제공하였다. 레인 1, 10 및 11은 1kb 및 100bp 분자 표지(marker)를 나타낸다.
- [0145] 프라이머 조합 oBN210/oBN478은 삽입물로서 결실 E 및 PrM4에 대해 특이적이다. 재조합 바이러스의 예상된 PCR 단편 및 플라스미드 pBN40은 607bp의 크기를 갖는다(레인 2에 도시됨).
- [0146] 프라이머 조합 oBN453/oBN454는 결실 E에 대해 특이적이다. 재조합 바이러스의 예상된 PCR 단편은 2.7kb이며, 야생형 바이러스의 예상된 밴드는 2.3kb이다(레인 3에 도시됨). 또한, 겔의 상부에서 야생형 바이러스에 대해 특이적인 밴드를 확인할 수 있다. 이는 재조합 바이러스의 제조가 아직 완전하게 야생형 바이러스가 없는 것이 아니라는 의미이다. 추가의 플라크 정제가 필요하였다.
- [0147] 프라이머 조합 oBN93/oBN477은 삽입물로서 결실 A 및 PrM2에 대해 특이적이다. 재조합 바이러스의 예상된 PCR 단편 및 플라스미드 pBN39는 636bp의 크기를 갖는다(레인 4에 도시됨).
- [0148] 프라이머 조합 oBN477/oBN452는 결실 A에 대해 특이적이다. 재조합 바이러스의 예상된 PCR 단편은 4.1kb이며, 야생형 바이러스의 예상된 밴드는 2.7kb이다(레인 5에 도시됨). 겔의 상부에서 야생형 바이러스에 대해 특이적인 밴드를 확인할 수 있다.
- [0149] 프라이머 조합 oBN255/oBN479는 삽입물로서 유전자내 영역 I4L 및 PrM3에 대해 특이적이다. 재조합 바이러스의 예상된 PCR 단편 및 플라스미드 pBN50는 825bp의 크기를 갖는다(레인 6에 도시됨).
- [0150] 프라이머 조합 oBN499/oBN500은 유전자내 영역 I4L에 대해 특이적이다. 재조합 바이러스의 예상된 PCR 단편은 1.0kb이며, 야생형 바이러스의 예상된 밴드는 0.3kb이다(레인 7에 도시됨).
- [0151] 프라이머 조합 oBN194/oBN476은 삽입물로서 결실 2 및 PrM1에 대해 특이적이다. 재조합 바이러스의 예상된 PCR 단편 및 플라스미드 pBN49는 678bp의 크기를 갖는다(레인 8에 도시됨).
- [0152] 프라이머 조합 oBN54/oBN56는 결실 2에 대해 특이적이다. 재조합 바이러스의 예상된 PCR 단편은 1.6kb이며, 야생형 바이러스의 예상된 밴드는 0.9kb이다(레인 9에 도시됨). 겔의 상부에서 야생형 바이러스에 대해 특이적인 밴드를 확인할 수 있다.
- [0153] 다르게는, 한개는 4개의 상이한 바이러스를 생성, 4개의 모든 바이러스에 의해 세포를 감염 및 재조합을 위해 검사할 수 있다.
- [0154] 추가의 선별- 또는 내성 마커(marker)를 함유하는 재조합 벡터를 사용하여 개선이 이루어 질 수 있다.
- [0155] **실시예 2**
- [0156] **삽입벡터**
- [0157] 유전자내 영역 136-137(IGR 136-137)에 대한 재조합 벡터
- [0158] 게놈 위치 129.940에 대응하는 소위 유전자내 영역(IGR) 136-137에 있는 MVA 게놈내로 외래 서열의 삽입을 위해, 삽입부위에 인접한 측면 서열의 약 600bp를 포함하는 플라스미드 벡터를 작제하였다. 게놈 MVA-BN DNA로부터 측면서열을 분리시키기 위해, 적절한 PCR 프라이머를 고안할 수 있다. 그러한 프라이머는 벡터 플라스미드 내로 측면서열을 클론화하는데 사용되는 제한효소 부위를 갖는 연장 부위를 포함한다. 이들 측면서열 사이에, 선택 유전자 카세트, 예를들면 NPT II 유전자(네오마이신 내성)를 수두 바이러스 프로모터(P)의 전사 조절하에서 도입하였다. 부가적으로, IGR 136-137(PacI)내로 삽입될 추가 유전자 또는 외래 서열의 삽입에 대한 클로닝 부위가 있다. 본 발명에 따른 한개의 그러한 벡터 작제물은 도 12에 도시되어 있다(pBNX67).

- [0159] 유전자내 영역 07-08(IGR 07-08)에 대한 재조합 벡터
- [0160] 계놈 위치 12.800에 대응하는 유전자내 영역(IGR) 07-08에 있는 MVA 계놈내로 외래 서열의 삽입을 위해, 삽입부위에 인접한 측면 서열의 약 600bp를 포함하는 벡터를 작제하였다. 계놈 MVA-BN DNA로부터 측면서열을 분리시키기 위해, 적절한 PCR 프라이머를 고안할 수 있다. 그러한 프라이머는 벡터 플라스미드내로 측면서열을 클론화하는데 사용되는 제한효소 부위를 갖는 연장 부위를 포함한다. 이들 측면서열사이에, 선택 유전자 카세트, 예를들면 Ecogpt(구아닌포스포리보실 트랜스퍼라아제)를 수두 바이러스 프로모터(P)의 전사 조절하에서 도입하였다. 부가적으로, IGR 07-08(PacI)내로 삽입될 추가 유전자 또는 외래 서열의 삽입에 대한 클로닝 부위가 있다. 본 발명에 따른 한개의 그러한 벡터 작제물은 도 13에 도시되어 있다(pBNX88).
- [0161] 유전자내 영역 44-45(IGR 44-45)에 대한 재조합 벡터
- [0162] 계놈 위치 37.330에 대응하는 유전자내 영역(IGR) 44-45에서 MVA 계놈내로 외래 서열의 삽입을 위해, 삽입부위에 인접한 측면 서열의 약 600bp를 포함하는 벡터를 작제하였다. 계놈 MVA-BN DNA로부터 측면서열을 분리시키기 위해, 적절한 PCR 프라이머를 고안할 수 있다. 그러한 프라이머는 벡터 플라스미드내로 측면서열을 클론화하는데 사용되는 제한효소 부위를 갖는 연장 부위를 포함한다. 이들 측면서열사이에, 선택 유전자 카세트 예를들면, NPT II 유전자(네오마이신 내성)를 수두 바이러스 프로모터(P)의 전사 조절하에서 도입하였다. 부가적으로, IGR 44-45(PacI)내로 삽입될 추가 유전자 또는 외래 서열의 삽입에 대한 클로닝 부위가 있다. 본 발명에 따른 한개의 그러한 벡터 작제물은 도 14에 도시되어 있다(pBNX87).
- [0163] **재조합 수두 바이러스내에 통합된 몇몇의 상동 유전자를 포함하는 재조합 수두 바이러스의 작제.**
- [0164] 삽입벡터
- [0165] MVA 계놈내의 뎅기 바이러스의 혈청형 2, 3 및 4의 3개의 PrM 유전자의 삽입을 위해, 3개의 독립된 재조합 벡터를 사용하였다.
- [0166] 상기에서 상세하게 개시한 바와 같이, 이들 벡터는 상동 재조합에 의한 표적 삽입에 대한 MVA 계놈에 상동인 서열을 함유한다. 부가적으로, 각 벡터는 선택 및 리포터 유전자 카세트를 함유한다.
- [0167] 3개의 뎅기 바이러스 혈청형의 PrM 서열은 실시예 1에 개시된 바와 같이 합성적으로 만들어진다. 그 결과, IGR 136-137에 대한 삽입 벡터 작제물은 뎅기 바이러스 혈청형 4의 PrM을 함유한다(도 15-pBN27). IGR 07-08에 대한 삽입 벡터 작제물은 뎅기 바이러스 혈청형 2의 PrM을 함유(도 16-pBN34)하며, IGR 44-45에 대한 삽입 벡터 작제물은 뎅기 바이러스 혈청형 3의 PrM을 함유한다(도 17-pBN47).
- [0168] 상동 재조합을 통한 재조합 MVA의 발생
- [0169] 상동 재조합에 의한 재조합 MVA의 발생은 실시예 1에 개시된 바와 같이 실시하였다. MVA 계놈에서 PrM4, PrM3 및 PrM2에 대한 삽입부위는 도 18에 도시되어 있다.
- [0170] MVA내로 PrM4의 삽입
- [0171] 첫번째로, 상술한 프로토콜에 따라 MVA-BN에 의해 세포를 감염시키고 뎅기 바이러스 혈청형 4의 PrM 유전자 및 리포터 유전자로서 EGFP 유전자를 함유하는 삽입벡터 pBN27에 의해 추가적으로 형질감염시켰다. 형질감염된 벡터가 리포터 유전자, EGFP를 함유하기 때문에, 합성된 단백질은 재조합 바이러스에 의해 감염된 세포내에서 마지막 3일째에 검출가능하다. 생성된 재조합 바이러스는 실시예 1에 개시된 바와 같이 플라크 정제에 의해 정제시켜야 한다. 4회의 플라크 정제 후, 재조합 바이러스, MVA-PrM는 삽입부위 IGR 136-137(oBN1008: gataccgatcaggttcta, 서열번호 16; 및 oBN1009: ggatatgattatgtagag, 서열번호 17)를 선택적으로 증폭시키는 프라이머 쌍을 사용하는 PCR 에세이에 의해 확인하였다.
- [0172] MVA내로 PrM2의 삽입
- [0173] 상술한 프로토콜에 따라 MVA-PrM4에 의해 세포를 감염시키고 뎅기 바이러스 혈청형 2의 PrM 유전자 및 리포터 유전자로서 EGFP 유전자를 함유하는 삽입벡터 pBN34에 의해 추가적으로 형질감염시켰다. 형질감염된 벡터가 리포터 유전자, EGFP를 함유하기 때문에, 합성된 단백질은 재조합 바이러스에 의해 감염된 세포내에서 마지막 3일째에 검출가능하다. 생성된 재조합 바이러스는 실시예 1에 개시된 바와 같이 플라크 정제에 의해 정제시켜야 한다. 6회의 플라크 정제 후, 재조합 바이러스, MVA-PrM + PrM2를 추가로 패세지 및 증폭시켰으며 조(crude) 저장액을 제조하였다. 재조합 바이러스는 삽입부위 IGR 07-08(oBN903: ctggataaatacaggacgtg, 서열번호 18; 및 oBN904: gacaatatccgacgcaccg, 서열번호 19)를 선택적으로 증폭시키는 프라이머 쌍을 사용하는 PCR 에세이에

의해 확인하였다.

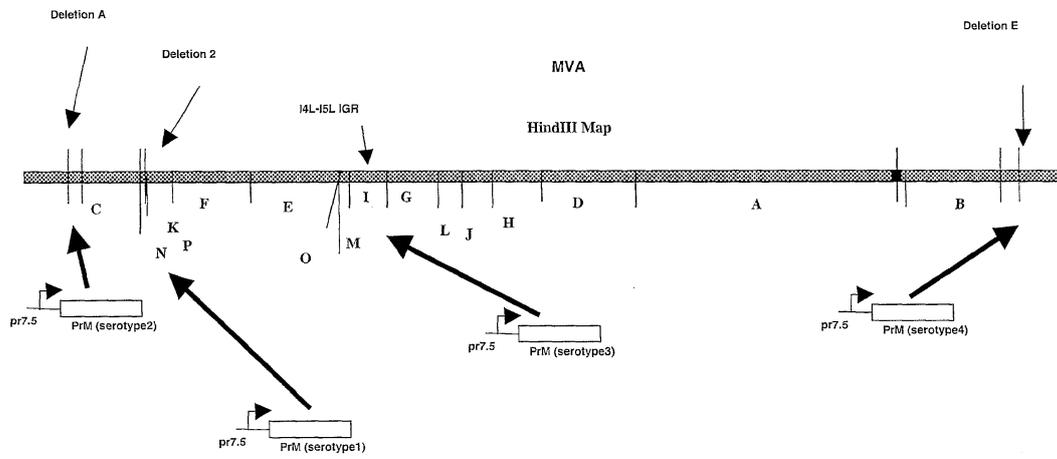
- [0174] MVA내로 PrM3의 삽입
- [0175] 상술한 프로토콜에 따라 MVA-PrM2+4에 의해 세포를 감염시키고 뎅기 바이러스 혈청형 3의 PrM 유전자 및 리포터 유전자로서 EGFP 유전자를 함유하는 삽입벡터 pBN34에 의해 추가적으로 형질감염시켰다. 형질감염된 벡터가 리포터 유전자, EGFP를 함유하기 때문에, 합성된 단백질은 재조합 바이러스에 의해 감염된 세포내에서 마지막 3일째에 검출가능하다. 생성된 재조합 바이러스는 실시예 1에 개시된 바와 같이 플라크 정제에 의해 정제시켜야 한다. 3회의 플라크 정제 후, 재조합 바이러스, MVA-PrM4+3+2는 삽입부위 IGR 44-45(oBN904: cgtagacaacacaccgacgatgg, 서열번호 20; 및 oBN905: cggatgaaaaatttttgggaag, 서열번호 21)를 선택적으로 증폭시키는 프라이머 쌍을 사용하는 PCR 에세이에 의해 확인하였다.
- [0176] 3개 뎅기 바이러스 PrM 유전자를 포함하는 재조합 바이러스의 PCR 분석은 도 19에 나타나 있다. PCR 실험은 실시예 1에 개시된 바와 같이 실시하였다. 프라이머 조합 oBN1008/oBN1009는 PrM4 삽입(도 19, 하부 패널)을 함유하는 IGR 136-137에 대해 특이적이다. 재조합 바이러스의 예상된 PCR 단편은 플라스미드 양성 대조용으로서(레인 8) 1kb의 크기를 갖는다(레인 4,5 및 6에 도시됨). PrM4이 결합된 앵프티 벡터 대조용은 190bp의 예상된 단편을 나타냈다(레인 2). 레인 M은 분자량 표지를 나타내며 레인 1, 3 및 7은 비어있다. 프라이머 조합 oBN902/oBN903은 PrM2 삽입(도 19, 상부 패널)을 함유하는 IGR 07-08에 대해 특이적이다. 재조합 바이러스의 예상된 PCR 단편은 플라스미드 양성 대조용으로서(레인 8) 960bp의 크기를 갖는다(레인 4-6에 도시됨). PrM2가 결합된 앵프티 벡터 대조용은 190bp의 예상된 단편을 나타냈다(레인 2). 프라이머 조합 oBN904/oBN905은 PrM3 삽입(도 19, 중간 패널)을 함유하는 IGR 44-45에 대해 특이적이다. 재조합 바이러스의 예상된 PCR 단편은 플라스미드 양성 대조용으로서(레인 8) 932bp의 크기를 갖는다(레인 4-6에 도시됨). PrM2가 결합된 앵프티 벡터 대조용은 185bp의 예상된 단편을 나타냈다(레인 2).

**도면의 간단한 설명**

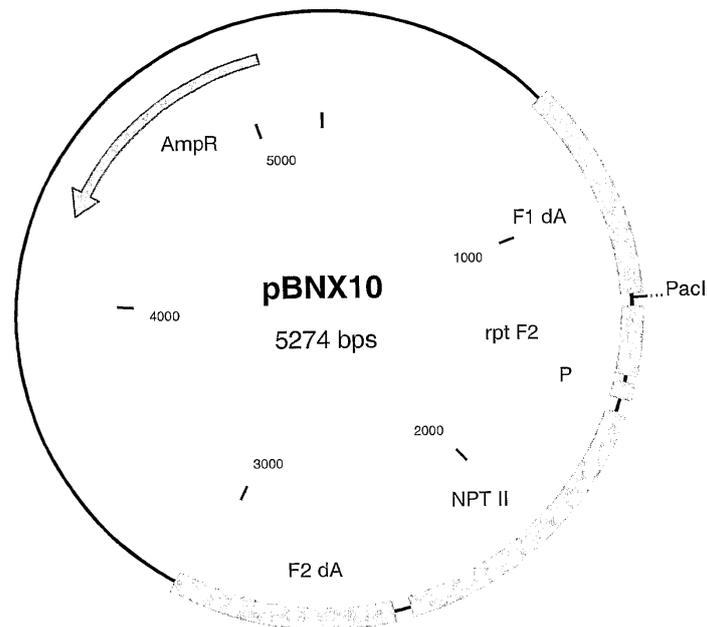
- [0073] 도 1: 실시예 1에 따른 MVA 계놈에서 4개의 PrM(membrane) 유전자(혈청형 1-4)의 삽입부위의 개략도.
- [0074] 도 2-9 및 12-17: 벡터의 이름, 크기 및 하기와 같은 관심을 갖고있는 서열의 배치를 나타내는 플라스미드 벡터 작제물의 삽입:
- [0075] AmpR = 암피실린 내성 유전자, bfp = 청색 형광 단백질 유전자, dA = 결실 A, dE = 결실 E, d2 = 결실 2, Ecogpt = 대장균 구아노신포스포리보실 트랜스퍼라아제 유전자, EGFP = 향상된 녹색 형광 단백질 유전자, F1 = 측면서열 1, F2 = 측면서열 2, I4L = 유전자내 영역 I4L, IGR = 유전자내 영역, NPT II = 네오마이신 내성 유전자, P = 수두 바이러스 프로모터, pr7.5 = 백시니아 프로모터 7.5, PrM = 4개의 혈청형으로부터 유도된 수를 나타내는 뎅기 바이러스의 PrM 유전자, rpt = 측면서열의 반복
- [0076] 도 10: 4개의 상이한 삽입 벡터(pBN49, pBN50, pBN40, pBN39)의 벡터 클로닝 방법의 PCR 확인. 각 플라스미드는 4개의 상이한 PCR 프라이머 조합을 사용하여 실험하였다. 각 조합은 한개의 독특한 삽입부위내로 통합되는 한개의 독특한 PrM 서열에 대해 특이적이다.
- [0077] 도 11: 4개의 상동 뎅기 바이러스 PrM 유전자(실시예 1)를 포함하는 재조합 수두 바이러스의 PCR 확인. 겔의 상부에서는 재조합 바이러스의 상이한 PCR 결과를 나타내는 반면, 하부에서는 나타난 바와 같이 조절 플라스미드의 동일한 PCR 반응의 결과를 제공한다. 상동 서열을 함유하는 플라스미드는 pBN39, pBN40 또는 pBN50으로 명명된다. PrM은 뎅기 바이러스의 삽입된 예비-세포막 유전자를 나타내며, 상기에서 수는 4개의 혈청형으로부터 유래된 것을 나타낸다. dA = 결실 A, dE = 결실 E, d2 = 결실 2, I4L = 유전자내 영역 I4L은 외래 DNA의 삽입 부위를 개시한다.
- [0078] 도 18: 실시예 2에 따른 MVA 계놈에서 3개의 PrM 유전자(혈청형 2-4)의 삽입부위의 개략도.
- [0079] 도 19: 유전자내 영역내로 삽입되는 3개의 상동 뎅기 바이러스 PrM 유전자(실시예 2)를 포함하는 재조합 수두 바이러스의 PCR 확인. 상부 패널은 PrM2에 대한 특이적 PCR 반응의 결과를 나타내며; 중간 패널은 PrM3에 대한 특이적 PCR 반응의 결과를 나타내며, 및 하부 패널은 PrM4에 대한 특이적 PCR 반응의 결과를 나타낸다. 레인 (lane) 8은 조절 플라스미드의 동일한 PCR 반응을 나타낸다. 레인 2는 앵프티 벡터 조절 MVA를 나타낸다. PrM은 뎅기 바이러스의 삽입된 예비-세포막 유전자를 나타내며, 상기에서 수는 4개의 혈청형으로부터 유도된 것을 나타낸다. M = 분자량 표지(marker).

도면

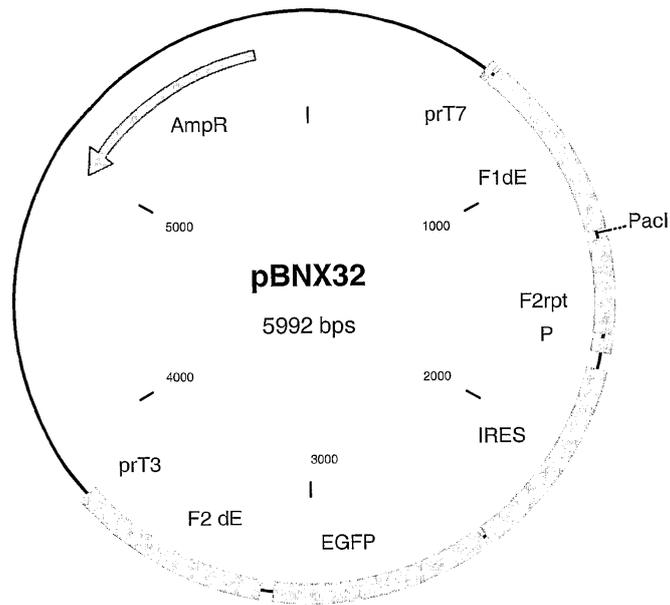
도면1



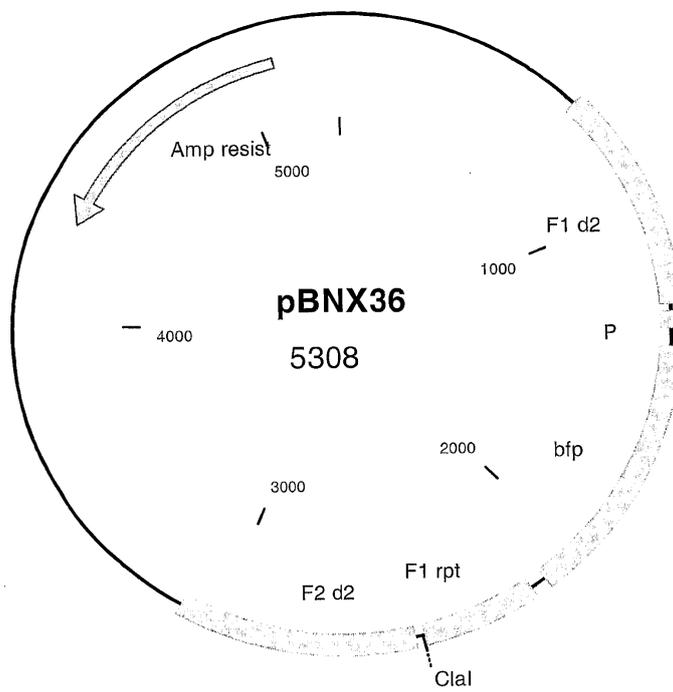
도면2



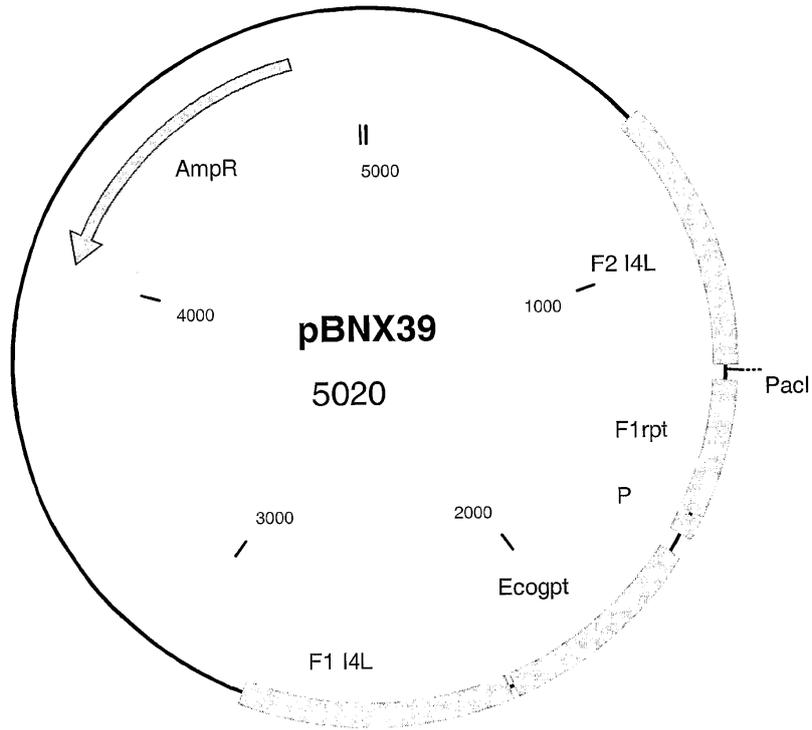
도면3



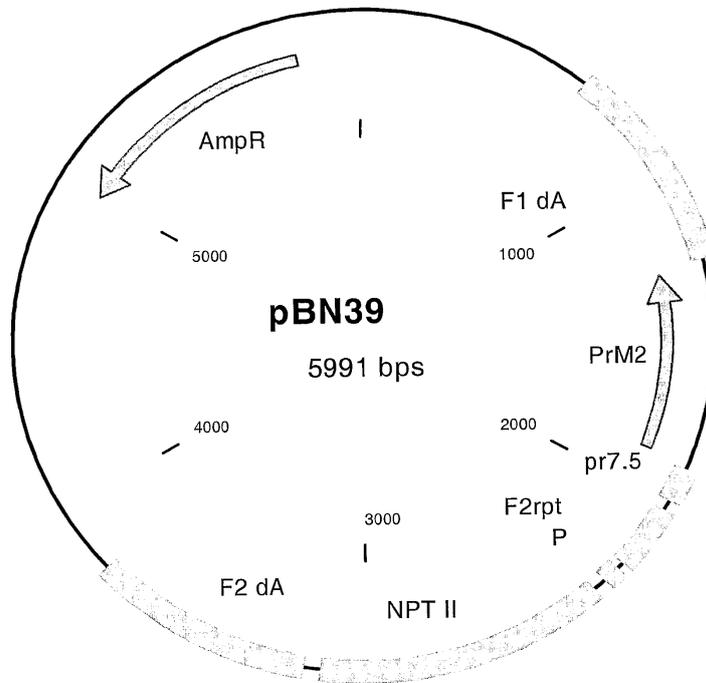
도면4



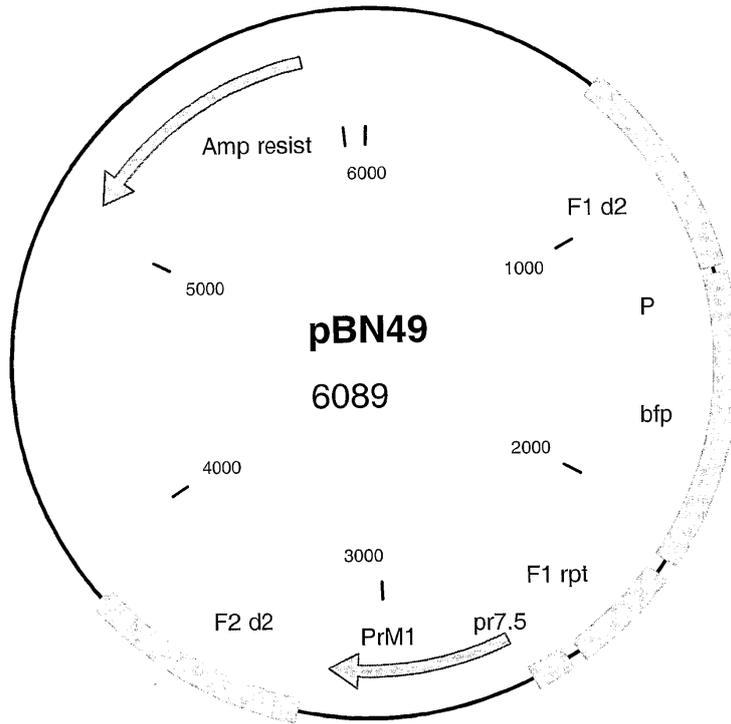
도면5



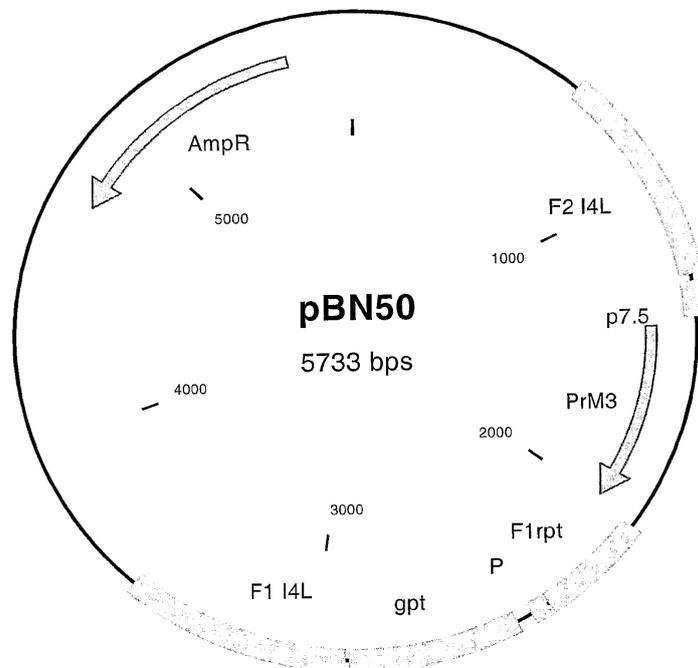
도면6



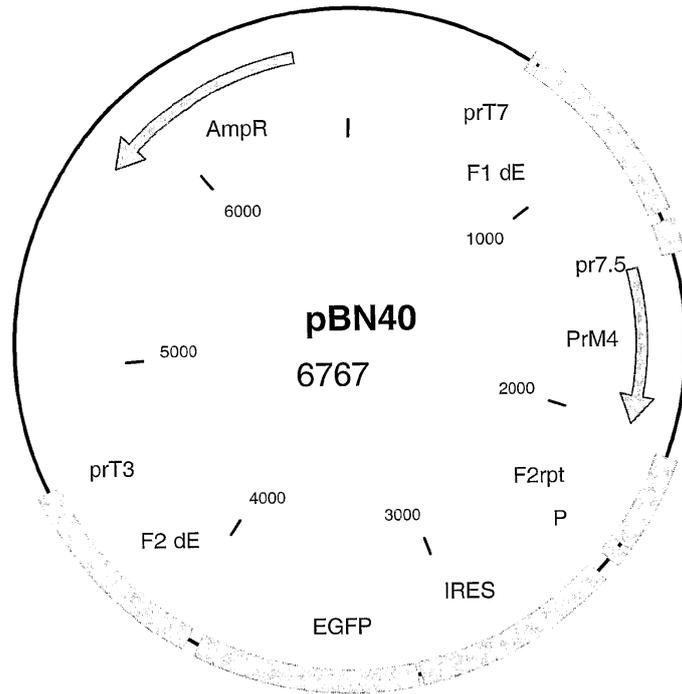
도면7



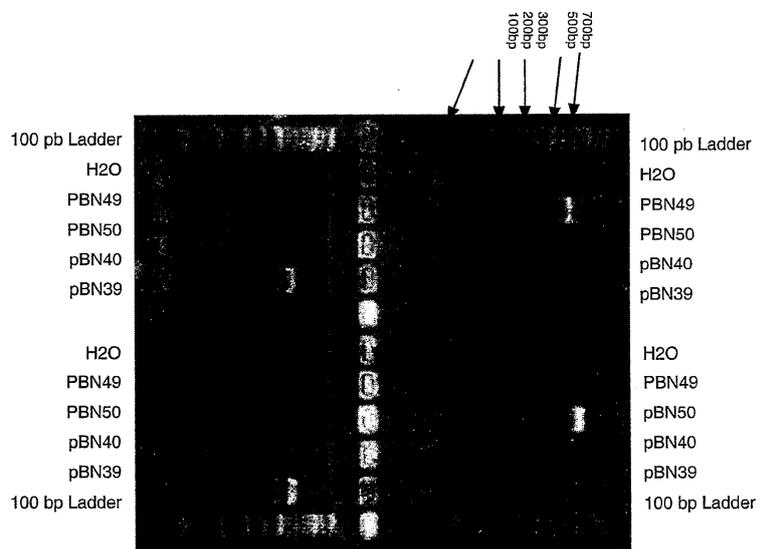
도면8



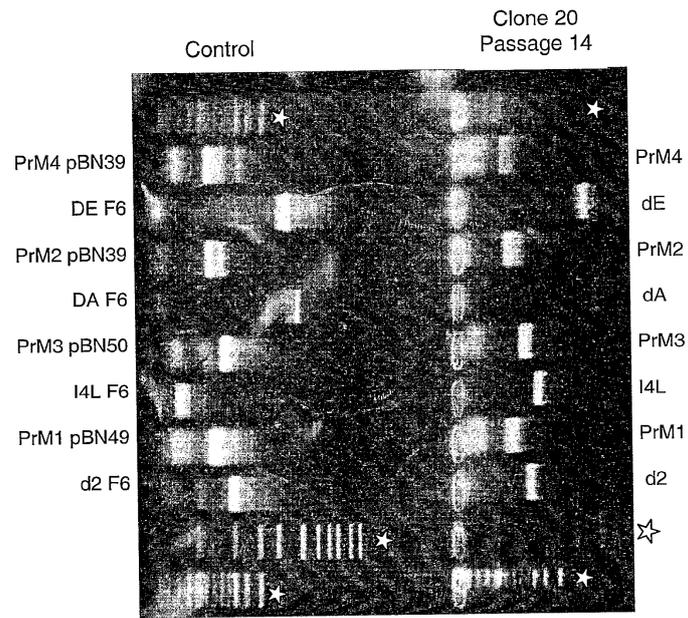
도면9



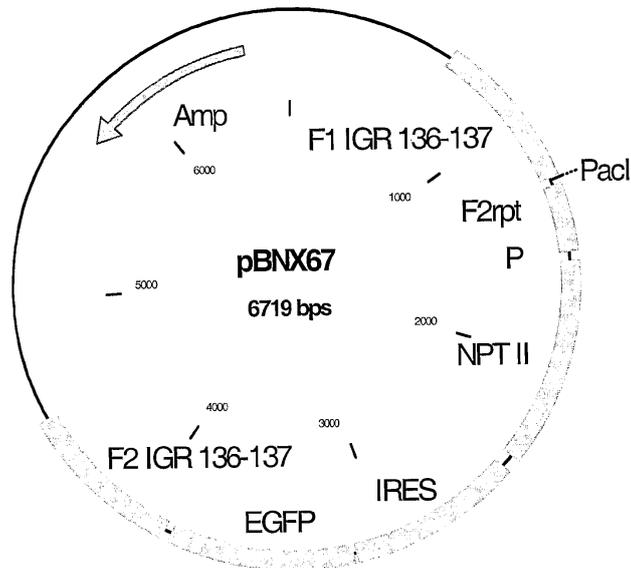
도면10



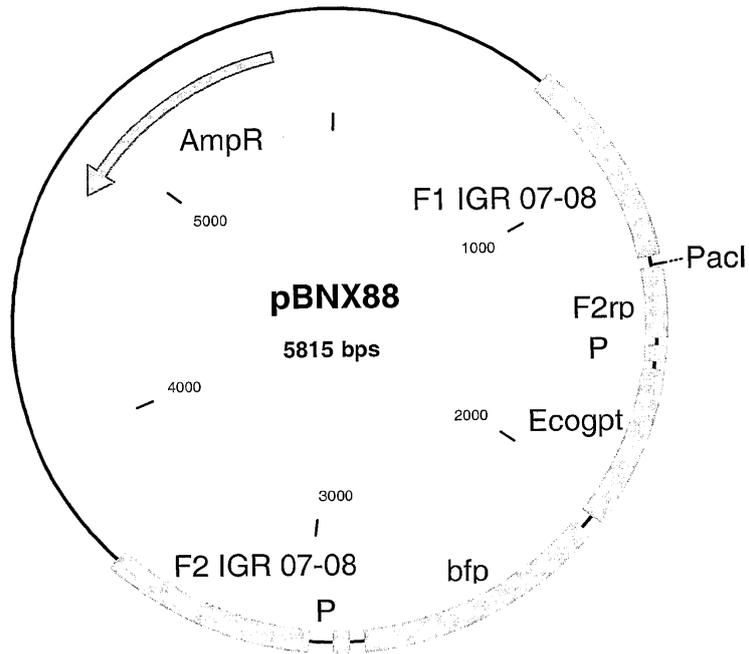
도면11



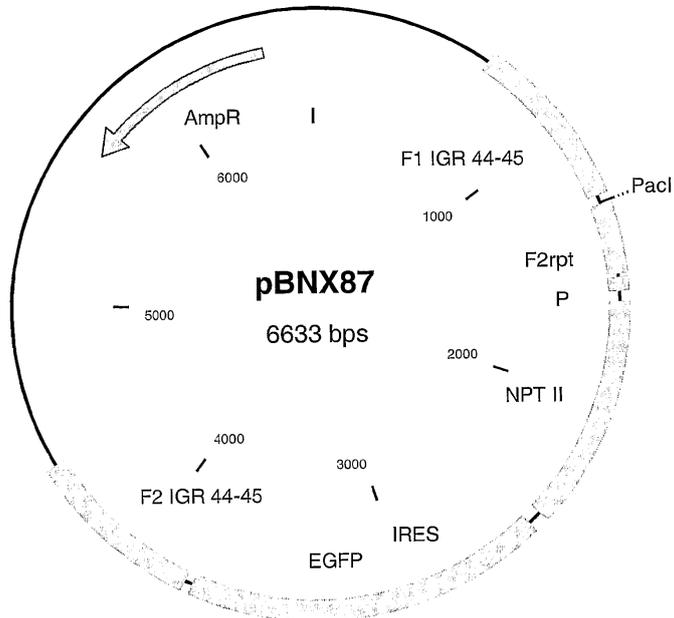
도면12



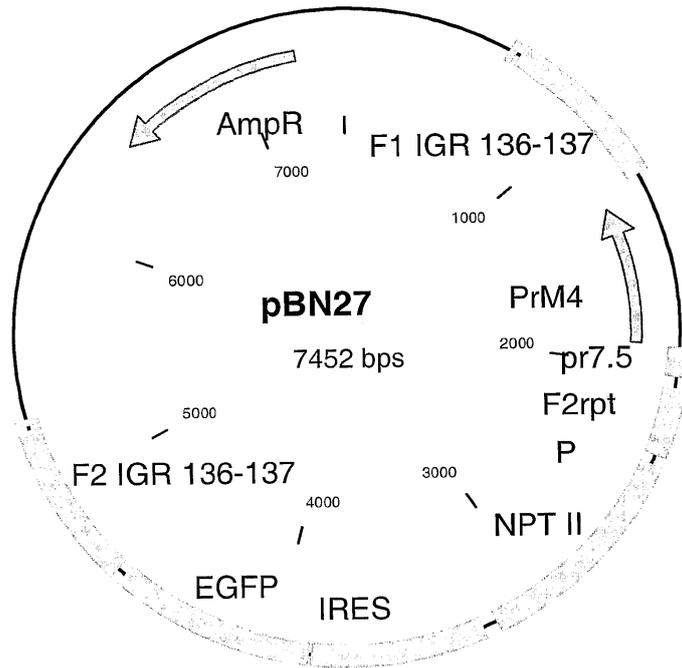
도면13



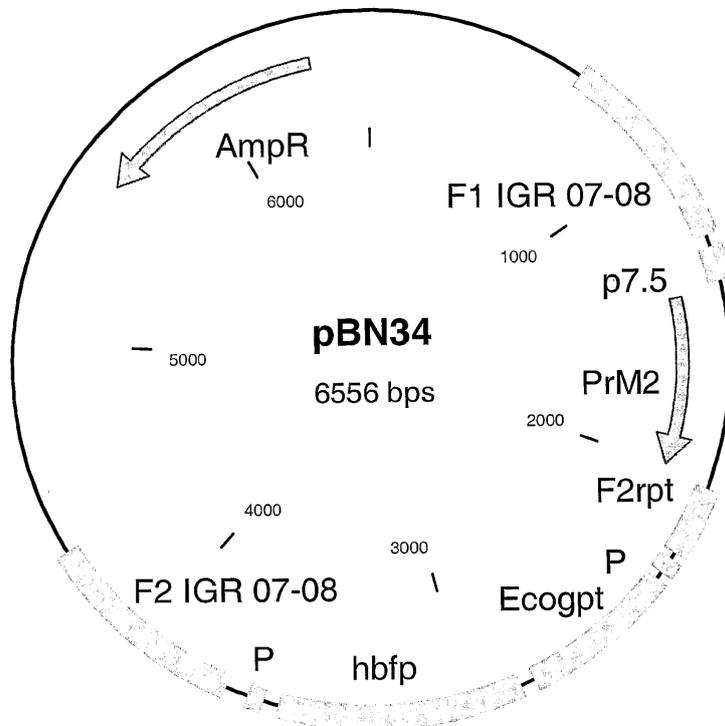
도면14



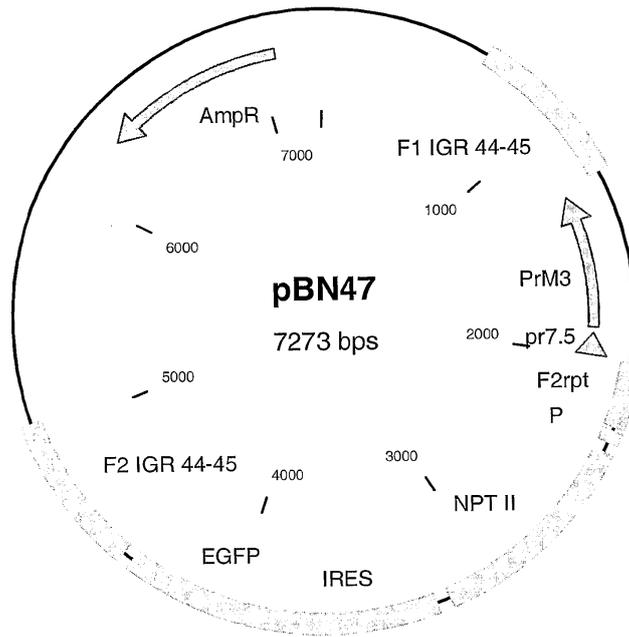
도면15



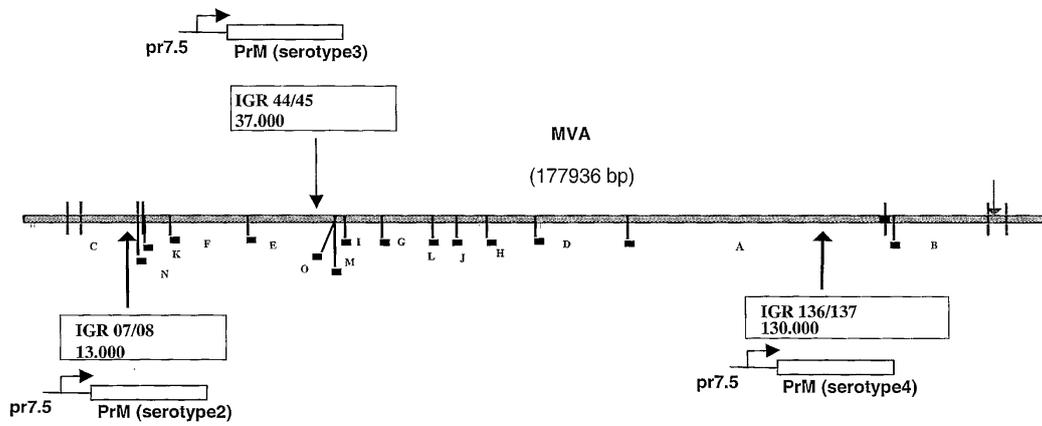
도면16



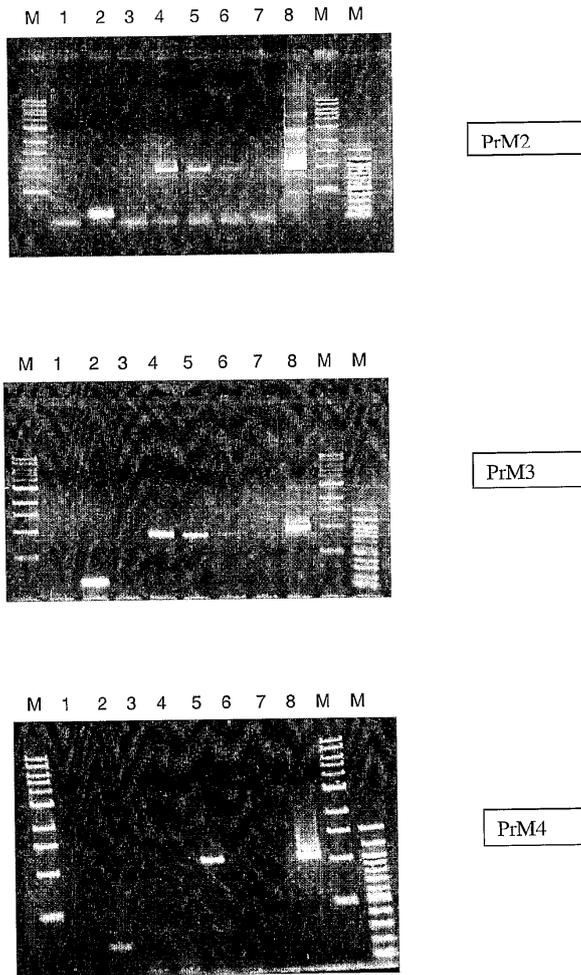
도면17



도면18



도면19



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Bavarian Nordic A/S

<120> Recombinant poxvirus expressing homologous genes inserted into the poxviral genome

<130> BN 46 PCT

<160> 21

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 1

cgcgatcca tgctgaacat cttgaacagg agacgcaga

39

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 2

catgataaga gattgtatca g

21

<210> 3

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 3

atggtgaaca taatgaacag gaggaaga tctgtgacca tgctctcat gctgctgcc

60

acagcctgg cgttccatct

80

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 4

gattttgcta ttcagtggac tggatg 26

<210> 5  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Primer

<400> 5  
 ccttaatcga attctcatgt catggatggg gtaaccagca ttaatagt 48

<210> 6  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Primer

<400> 6  
 gctccattc aattcacatt gg 22

<210> 7  
 <211> 80  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Primer

<400> 7  
 atcccatc tgaatgtggt gttaaagcta ctgagcgctt ctctcgtctc cgttctccgc 60

tctgggtgca tgtccatac 80

<210> 8  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
<223> Primer

<400> 8  
gtacatggat gatatagata tg 22

<210> 9  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer

<400> 9  
gttgaaggat tcacttccgt gga 23

<210> 10  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer

<400> 10  
gcattcacag attctattgt gagtc 25

<210> 11  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer

<400> 11  
gtttcatcag aaatgactcc atgaaa 26

<210> 12

<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer

<400> 12  
cggggtaccg gacgaacaag gaactgtagc agaggcatc 39

<210> 13  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer

<400> 13  
aactgcagtt gttcgtatgt cataaattct ttaattat 38

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer

<400> 14  
caactctctt ctgattacc 20

<210> 15  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer

<400> 15  
cgatcaaagt caatctatg 19

<210> 16  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Primer

<400> 16  
 gataccgatc acgttcta 18

<210> 17  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Primer

<400> 17  
 ggatatgatt atgtagag 18

<210> 18  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Primer

<400> 18  
 ctggataaat acgaggacgt g 21

<210> 19  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Primer

<400> 19  
gacaattatc cgacgcaccg 20

<210> 20  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer

<400> 20  
cgttagacaa cacaccgacg atgg 24

<210> 21  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer

<400> 21  
cggatgaaaa attttggaa g 21