



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0015127
(43) 공개일자 2014년02월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/43 (2006.01) A61K 39/04 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01) A61K 39/29 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7005296
- (22) 출원일자(국제) 2010년07월29일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2012년02월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2010/053465
- (87) 국제공개번호 WO 2011/013097
국제공개일자 2011년02월03일
- (30) 우선권주장
61/229,318 2009년07월29일 미국(US)
61/229,348 2009년07월29일 미국(US)

- (71) 출원인
렘 베른드 헬무트 아담
뉴질랜드 팔머스턴 노스(우편번호:4471) 카운티
하이즈 드라이브 알디1 30
버들 브라이스 말콤
뉴질랜드 팔머스턴 노스(우편번호:4410) 워터루
크레슨트 73
(뒷면에 계속)
- (72) 발명자
렘 베른드 헬무트 아담
뉴질랜드 팔머스턴 노스(우편번호:4471) 카운티
하이즈 드라이브 알디1 30
파레인 나탈리 앤
뉴질랜드 팔머스턴 노스(우편번호:4474) 테인 로
드 알디4 240
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
원석희, 박장규, 김민철, 박지하, 김명신, 이동기

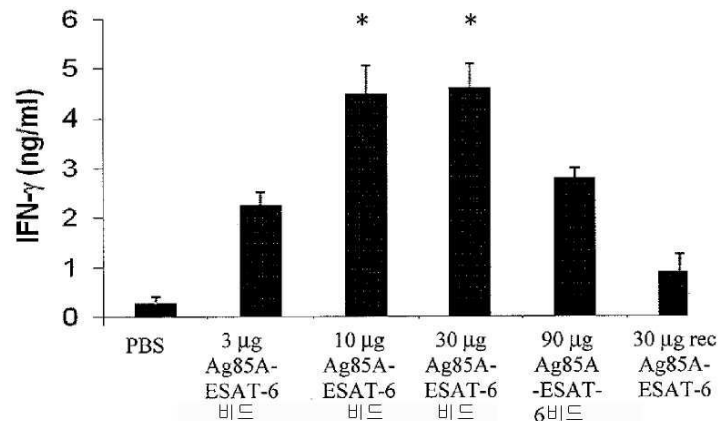
전체 청구항 수 : 총 120 항

(54) 발명의 명칭 폴리머 입자 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 폴리머 입자 및 이의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 관능화된 폴리머 입자, 제조 방법 및 세포내 병원체에 의해 야기되는 질병 또는 증상의 치료 또는 예방 및 세포-매개 면역 반응을 유도하는데 사용되는 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도7



(71) 출원인

웨드록 데이비드 닐

뉴질랜드 레빈(우편번호: 5510) 클리포드 클로스 5

파레인 나탈리 앤

뉴질랜드 팔머스턴 노스(우편번호:4474) 테인 로드
알디4 240

(72) 발명자

웨드록 데이비드 닐

뉴질랜드 레빈(우편번호: 5510) 클리포드 클로스 5

머들 브라이스 말콤

뉴질랜드 팔머스턴 노스(우편번호:4410) 워터루 크
레슨트 73

특허청구의 범위

청구항 1

피험체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서,

이를 필요로 하는 피험체에 1 이상의 융합(fusion) 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자를 투여하는 단계를 포함하며,

상기 융합 폴리펩티드의 1 이상은 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 (particle-forming protein)을 포함하는, 방법.

청구항 2

피험체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서,

이를 필요로 하는 피험체에 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자를 투여하는 단계를 포함하며,

상기 융합 폴리펩티드의 1 이상은 상기 피험체에서 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역(binding domain)에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 3

병원체(pathogen)에 대해 피험체를 면역화하는(immunising) 방법으로서,

이를 필요로 하는 피험체에 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 투여하는 단계를 포함하며,

상기 융합 폴리펩티드의 1 이상은 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 4

병원체에 대해 피험체를 면역화하는 방법으로서,

이를 필요로 하는 피험체에 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 투여하는 단계를 포함하며,

상기 융합 폴리펩티드의 1 이상은 상기 피험체에서 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역 반응은 세포-매개(cell-mediated) 면역 반응을 포함하는, 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역 반응은 체액성(humoral) 반응을 포함하는, 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 피험체는 병원체에 감염되거나 또는 병원체에 대해 면역화되어 있는, 방법.

청구항 8

제 2 항 또는 제 4 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역이 내인성 항원(endogenous antigen)에 결합하는, 방법.

청구항 9

면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자.

청구항 10

면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자.

청구항 11

제 9 항 또는 제 10 항에 있어서,

상기 항원은 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는, 폴리머 입자.

청구항 12

제 9 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원은 체액성 면역 반응을 유도할 수 있는, 폴리머 입자.

청구항 13

제 9 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자는 2 이상의 상이한 융합 폴리펩티드를 포함하는, 폴리머 입자.

청구항 14

제 9 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자는 2 이상의 상이한 항원, 또는 항원을 결합할 수 있는 2 이상의 상이한 결합 영역을 포함하는, 폴리머 입자.

청구항 15

제 9 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자는 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원 및 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역을 포함하는, 폴리머 입자.

청구항 16

제 9 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자는 폴리머 입자에 결합되거나 또는 혼입되는 1 이상의 물질을 추가로 포함하는, 폴리머 입자.

청구항 17

제 16 항에 있어서,

상기 물질은 항원, 보조제(adjuvant) 또는 면역자극 분자, 또는 이의 2 이상의 조합인, 폴리머 입자.

청구항 18

제 9 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자는 다가(multivalent)인, 폴리머 입자.

청구항 19

제 16 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질은 가교(cross-linking)에 의해 폴리머 입자에 결합되는, 폴리머 입자.

청구항 20

피험체에서 면역 반응을 유도하거나, 또는 병원체에 대해 피험체를 면역화하거나, 또는 피험체에서 병원체로부터의 감염을 진단하기 위해서, 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자.

청구항 21

피험체에서 면역 반응을 유도하거나, 또는 병원체에 대해 피험체를 면역화하거나, 또는 피험체에서 병원체로부터의 감염을 진단하기 위해서, 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자.

청구항 22

제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원은 마이코박테리움(*Mycobacterium*)[예컨대, 마이코박테리움 보비스(*M. bovis*), 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*), 마이코박테리움 레프래(*M. leprae*), 마이코박테리움 칸사시이(*M. kansasii*), 마이코박테리움 아비움(*M. avium*), 마이코박테리움 아비움 파라투버쿨로시스(*M. avium paratuberculosis*), 마이코박테리움종], 리스테리아(*Listeria*)[예컨대, 리스테리아 모노사이토젠스(*L. monocytogenes*), 리스테리아종], 살모넬라(*Salmonella*)[예컨대, 살모넬라 티파이(*S. typhi*)], 예르시니아(*Yersinia*)[예컨대, 예르시니아 페스티스(*Y. pestis*), 예르시니아 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*), 예르시니아 슈도투버쿨로시스(*Y. pseudotuberculosis*)], 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 레지오넬라(*Legionella*)[예컨대, 레지오넬라 뉴모필라(*L. pneumophila*), 레지오넬라 롱베아케(*L. longbeachae*), 레지오넬라 보제마니이(*L. bozemanii*), 레지오넬라종], 리케치아(*Rickettsia*)[예컨대, 리케치아 리케치이(*R. rickettsii*), 리케치아 아카리(*R. akari*), 리케치아 코노리이(*R. conorii*), 리케치아 시베리카(*R. siberica*), 리케치아 아우스트랄리스(*R. australis*), 리케치아 자포니카(*R. japonica*), 리케치아 아프리카(*R. africae*), 리케치아 프로와제키이(*R. prowazekii*), 리케치아 티파이(*R. typhi*), 리케치아종], 클라미디아(*Chlamydia*)[예컨대, 클라미디아 뉴모니아(*C. pneumoniae*), 클라미디아 트라코마티스(*C. trachomatis*), 클라미디아종], 클라미도필라(*Chlamydophila*)[예컨대, 클라미도필라 시타시(*C. psittaci*), 클라미도필라 아보르투스(*C. abortus*)], 스트렙토코커스(*Streptococcus*)[예컨대, 스트렙토코커스 뉴모니아(*S. pneumoniae*), 스트렙토코커스 표게네스(*S. pyogenes*), 스트렙토코커스 아갈락티아(*S. agalactiae*)], 메티실린 저항성 스태필로코커스 아우레우스(Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)를 포함하는 스태필로코커스(*Staphylococcus*)[스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)], 에를리키아(*Ehrlichia*)[예컨대, 에를리키아 차프렌시스(*E. chaffeensis*), 에를리키아파고사이토필라 제노군(*Ehrlichia phagocytophila* geno group), 에를리키아종], 콕시엘라 부르네티이(*Coxiella burnetii*), 리슈마니아종(*Leishmania* sp.), 톡스플라스마 곤디이(*Toxoplasma gondii*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 히스토플라스마종(*Histoplasma* sp.), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*)로 구성되는 그룹으로부터 선택된 생물체 및

C형 간염 바이러스, 아데노바이러스(*Adenoviruses*), 콕사키바이러스(*coxsackievirus*), A형 간염 바이러스, 폴리오바이러스(*poliovirus*)를 포함하는 피코르나바이러스(*Picornaviruses*), 에프스테인-바 바이러스(*epstein-barr virus*), 헤르페스 심플렉스 타입 1, 헤르페스 심플렉스 타입 2, 사람 사이토메갈로바이러스(*human cytomegalovirus*), 사람 헤르페스바이러스 타입 8, 바리셀라-조스테르 바이러스(*varicella-zoster virus*)를 포함하는 헤르페스바이러스(*Herpesviruses*), B형 간염 바이러스를 포함하는 헤파드나바이러스(*Hepadnaviruses*), C형 간염 바이러스, 황열 바이러스(*yellow fever virus*), 뎅기 바이러스(*dengue virus*)를 포함하는 플라비바이러스(*Flaviviruses*), 웨스트 나일 바이러스(*West Nile virus*), 사람 면역결핍 바이러스(*HIV*)를 포함하는 레트로바이러스(*Retroviruses*), 인플루엔자 바이러스(*influenza virus*)를 포함하는 오르토믹소바이러스(*Orthomyxoviruses*), 홍역 바이러스(*measles virus*), 볼거리 바이러스(*mumps virus*), 파라인플루엔자 바이러스(*parainfluenza virus*), 호흡기 세포융합 바이러스(*respiratory syncytial virus*)를 포함하는 파라믹소바이러스(*Paramyxoviruses*), 파필로마바이러스(*papillomavirus*)를 포함하는 파필로마바이러스(*Papillomaviruses*), 라비에스 바이러스(*rabies virus*)를 포함하는 람도바이러스(*Rhabdoviruses*), 루벨라 바이러스(*Rubella virus*)를

포함하는 토가바이러스(Togaviruses)를 포함하는 바이러스 및 백신니아(vaccinia), 아비폭스(avipox), 아데노-결합 바이러스(adeno-associated virus), 변형된 백신니아 스트레인 안카라(modified Vaccinia Strain Ankara), 쉼리키 포레스트 바이러스(Semliki Forest virus), 폭스바이러스(poxvirus) 및 코로나 바이러스(coronaviruses)를 포함하는 기타 바이러스로부터 유래된 항원, 또는 상기 기술된 항원의 1 이상의 항원성 일부(antigenic portion) 또는 T-세포 에피토프(epitope)인, 폴리머 입자.

청구항 23

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

1 이상의 폴리머 입자는 제 9 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 따른 폴리머 입자인, 방법.

청구항 24

제 9 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 따른 폴리머 입자를 포함하는 조성물.

청구항 25

제 25 항에 있어서,

피험체에서 면역 반응을 유도하거나, 또는 피험체를 백신화(vaccinating)하거나, 또는 병원체에 대해 피험체를 면역화하거나, 또는 피험체에서 병원체로부터의 감염을 진단하기 위한 조성물.

청구항 26

제 25 항 또는 제 26 항에 있어서,

상기 조성물은 백신(vaccine)인 조성물.

청구항 27

피험체에서 면역 반응을 유도하거나, 또는 피험체를 백신화하거나, 또는 병원체에 대해 피험체를 면역화하거나, 또는 피험체에서 병원체로부터의 감염을 진단하는데 적당한 약제(medicament)를 제조하는데 사용되는, 제 9 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 따른 폴리머 입자의 용도.

청구항 28

제 27 항에 있어서,

상기 약제는 백신인, 용도.

청구항 29

입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및

면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 또는 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함하는, 발현 구조물(expression construct).

청구항 30

제 29 항에 있어서,

입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 및 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 또는 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열이 단일의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)으로 존재하는, 발현 구조물.

청구항 31

제 29 항 또는 제 30 항에 있어서,

상기 발현 구조물은 입자-형성 단백질 및 면역 반응을 유도할 수 있는 항원 또는 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는, 발현 구조물.

청구항 32

제 29 항 내지 제 31 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 구조물은 하기를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 발현 구조물:

- (i) 1 이상의 티올라제(thiolase), 또는
- (ii) 1 이상의 리덕타제(reductase), 또는
- (iii) 상기 (i)와 (ii) 모두.

청구항 33

제 29 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 구조물은 하기를 코딩하는 핵산을 포함하는, 발현 구조물:

- (i) 1 이상의 티올라제, 또는
- (ii) 1 이상의 리덕타제, 또는
- (iii) 1 이상의 폴리머 신타제(polymer synthase), 또는
- (iv) 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원, 또는
- (v) 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역, 또는
- (vi) 상기 (i) 내지 (v) 중 1 이상을 포함하는 융합 단백질, 또는
- (vii) 상기 (i) 내지 (vi)의 모든 조합.

청구항 34

제 29 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원은 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원인, 발현 구조물.

청구항 35

폴리머 입자의 제조 방법으로서,

1 이상의 발현 구조물, 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함하는 1 이상의 발현 구조물, 또는 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함하는 숙주 세포를 준비하는 단계,

상기 발현 구조물의 발현에 적당한 조건하에 상기 숙주 세포를 유지하는 단계, 및

상기 숙주 세포로부터 폴리머 입자를 분리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 36

병원체로부터의 감염을 진단하는 방법으로서,

제 9 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 따른 1 이상의 폴리머 입자를 피험체에게 투여하는 단계, 및

병원체 존재를 나타내는 반응을 검출하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 37

제 36 항에 있어서,

병원체 존재를 나타내는 반응은 지연성 과민 반응(delayed-type hypersensitivity response)인, 방법.

청구항 38

제 36 항에 있어서,

병원체 존재를 나타내는 반응은 피험체로부터 수득된 시료에서 병원체에 대한 항체의 존재를 검출하는 것인, 방법.

청구항 39

제 36 항에 있어서,

병원체 존재를 나타내는 반응은 상기 시료에서 병원체에 반응하는 면역 세포의 존재를 검출하는 것인, 방법.

청구항 40

폴리머 입자의 제조 방법으로서,

1 이상의 발현 구조물을 포함하는 숙주 세포를 준비하는 단계,

상기 발현 구조물의 발현에 적당한 조건하에 상기 숙주 세포를 유지하는 단계, 및

상기 숙주 세포로부터 폴리머 입자를 분리하는 단계를 포함하며,

상기 1 이상의 발현 구조물은

입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 및

마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원 또는 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 41

제 40 항에 있어서,

상기 발현 구조물은 높은 복제수 벡터(high copy number vector)에 있는, 방법.

청구항 42

제 40 항에 있어서,

입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 강한 프로모터에 조작가능하게 연결되는, 방법.

청구항 43

제 40 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 폴리머 신타제의 기체(substrate) 또는 기체 혼합물(모노머 기체를 포함), 또는 폴리머 신타제의 기체를 형성하기 위해 숙주 세포에 의해서 대사될 수 있는 전구물질 기체의 존재하에 유지되는, 방법.

청구항 44

제 40 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 하기를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 2 이상의 상이한 발현 구조물을 포함하는, 방법:

입자-형성 단백질 및 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는

입자-형성 단백질 및 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는

보조제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는

1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물.

청구항 45

제 40 항에 있어서,

마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 ESAT-6을 코딩하는, 방

법.

청구항 46

제 40 항에 있어서,

마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 Ag85A를 코딩하는, 방법.

청구항 47

제 40 항에 있어서,

마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 ESAT-6 및 Ag85A를 코딩하는, 방법.

청구항 48

1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자.

청구항 49

1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자.

청구항 50

제 48 항 또는 제 49 항에 있어서,

상기 폴리머 입자는 2 이상의 상이한 융합 폴리펩티드를 포함하는, 폴리머 입자.

청구항 51

제 50 항에 있어서,

상기 폴리머 입자는 2 이상의 상이한 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 또는 2 이상의 상이한 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역을 포함하는, 폴리머 입자.

청구항 52

제 50 항 또는 제 51 항에 있어서,

상기 폴리머 입자는 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 및 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역을 포함하는 폴리머 입자.

청구항 53

제 48 항 내지 제 52 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자는 상기 폴리머 입자에 결합되거나 또는 혼입된 1 이상의 물질, 또는 이들의 조합을 포함하는, 폴리머 입자.

청구항 54

제 53 항에 있어서,

상기 물질은 항원, 보조제 또는 면역자극 분자인 폴리머 입자.

청구항 55

제 48 항 내지 제 54 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자는 다가(multivalent)인, 폴리머 입자.

청구항 56

제 53 항 내지 제 55 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 물질이 가교에 의해서 폴리머 입자에 결합되는, 폴리머 입자.

청구항 57

제 48 항 내지 제 56 항 중 어느 한 항에 있어서,
마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) ESAT-6 항원을 포함하는, 폴리머 입자.

청구항 58

제 48 항 내지 제 57 항 중 어느 한 항에 있어서,
마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) Ag85A 항원을 포함하는, 폴리머 입자.

청구항 59

제 58 항에 있어서,
융합 폴리펩티드의 1 이상은 ESAT-6 항원 및 Ag85A 항원을 포함하는, 폴리머 입자.

청구항 60

입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 또는 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물.

청구항 61

제 60 항에 있어서,
입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열, 및 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 또는 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 단일의 오픈 리딩 프레임으로 존재하는, 발현 구조물.

청구항 62

제 60 항 또는 제 61 항에 있어서,
상기 발현 구조물은 입자-형성 단백질 및 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 또는 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는, 발현 구조물.

청구항 63

제 60 항 내지 제 62 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 구조물은 하기를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 발현 구조물:
(i) 1 이상의 티올라제(thiolase), 또는
(ii) 1 이상의 리덕타제(reductase), 또는
(iii) 상기 (i)와 (ii) 모두.

청구항 64

제 60 항 내지 제 63 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 구조물은 하기를 코딩하는 핵산을 포함하는, 발현 구조물:
(i) 1 이상의 티올라제, 또는

- (ii) 1 이상의 리덕타제, 또는
- (iii) 1 이상의 폴리머 신타제, 또는
- (iv) 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원, 또는
- (v) 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역, 또는
- (vi) 상기 (i) 내지 (v) 중 1 이상을 포함하는 융합 단백질, 또는
- (vii) 상기 (i) 내지 (vi)의 모든 조합.

청구항 65

결핵(tuberculosis)에 대한 피험체의 면역 방법으로서,

1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하며,

융합 폴리펩티드의 1 이상은 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 66

결핵에 대한 피험체의 면역 방법으로서,

1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하며,

융합 폴리펩티드의 1 이상은 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 67

피험체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서,

1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하며,

융합 폴리펩티드의 1 이상은 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 68

피험체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서,

1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하며,

융합 폴리펩티드의 1 이상은 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 69

제 65 항 내지 제 68 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 피험체가 결핵에 감염된, 방법.

청구항 70

제 65 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 피험체가 결핵에 면역화되어 있는, 방법.

청구항 71

제 66 항 또는 제 68 항 내지 제 70 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역은 내인성 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원에 결합하는, 방법.

청구항 72

제 65 항 내지 제 71 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 폴리머 입자의 1 이상은 2 이상의 상이한 융합 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 73

제 65 항 내지 제 72 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 폴리머 입자의 1 이상은 2 이상의 상이한 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원, 또는 2 이상의 상이한 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역을 포함하는, 방법.

청구항 74

제 65 항 내지 제 73 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 폴리머 입자의 1 이상은 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 및 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역을 포함하는, 방법.

청구항 75

제 65 항 내지 제 74 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 폴리머 입자의 1 이상은 상기 폴리머 입자에 결합되거나 또는 혼입된 1 이상의 물질, 또는 이들의 조합을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 76

제 75 항에 있어서,
상기 물질은 항원, 보조제 또는 면역자극 분자인, 방법.

청구항 77

제 65 항 내지 제 74 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 폴리머 입자의 1 이상은 다가인, 방법.

청구항 78

제 75 항 내지 제 77 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 물질은 가교에 의해 상기 폴리머 입자에 결합되는, 방법.

청구항 79

제 65 항 내지 제 78 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 폴리머 입자의 1 이상은 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) ESAT-6 항원을 포함하는, 방법.

청구항 80

제 65 항 내지 제 79 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 폴리머 입자의 1 이상은 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) Ag85A 항원을 포함하는, 방법.

청구항 81

제 65 항 내지 제 80 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 폴리머 입자의 1 이상은 ESAT-6 항원 및 Ag85A 항원을 포함하는 융합 폴리펩티드의 1 이상을 포함하는, 방

법.

청구항 82

제 65 항 내지 제 81 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자의 1 이상은 Ag85B (MPT59), Ag85B, Ag85C, MPT32, MPT51, MPT59, MPT63, MPT64, MPT83, MPB5, MPB59, MPB64, MTC28, Mtb2, Mtb8.4, Mtb9.9, Mtb32A, Mtb39, Mtb41, TB10.4, TB10C, TB11B, TB12.5, TB13A, TB14, TB15, TB15A, TB16, TB16A, TB17, TB18, TB21, TB20.6, TB24, TB27B, TB32, TB32A, TB33, TB38, TB40.8, TB51, TB54, TB64, CFP6, CFP7, CFP7A, CFP7B, CFP8A, CFP8B, CFP9, CFP10, CFP11, CFP16, CFP17, CFP19, CFP19A, CFP19B, CFP20, CFP21, CFP22, CFP22A, CFP23, CFP23A, CFP23B, CFP25, CFP25A, CFP27, CFP28, CFP28B, CFP29, CFP30A, CFP30B, CFP50, CWP32, hspX(알파-결정성), APA, 투버쿨린 정제 단백질 유도체 (Tuberculin purified protein derivative, PPD), ST-CF, PPE68, LppX, PstS-1, PstS-2, PstS-3, HBHA, GroEL, GroEL2, GrpES, LHP, 19kDa lipoprotein, 71kDa, RD1-ORF2, RD1-ORF3, RD1-ORF4, RD1-ORF5, RD1-ORF8, RD1-ORF9A, RD1-ORF9B, Rv1984c, Rv0577, Rv1827, BfrB, Tpx, Rv1352, Rv1810, PpiA, Cut2, FbpB, FbpA, FbpC, DnaK, FecB, Ssb, RplL, FixA, FixB, AhpC2, Rv2626c, Rv1211, Mdh, Rv1626, Adk, ClpP, SucD(Belisle 등, 2005; US 7,037,510; US 2004/0057963; US 2008/0199493; US 2008/0267990)를 포함하는 그룹으로부터 선택된 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원, 또는 상기 항원의 1 이상의 항원성 부분 또는 T-세포 에피토프를 포함하는, 방법.

청구항 83

간염(hepatitis) 또는 인플루엔자(influenza)에 대한 피험체의 면역 방법으로서,

1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하며,

융합 폴리펩티드의 1 이상은 1 이상의 간염 항원 또는 1 이상의 인플루엔자 항원에 융합된 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 포함하는, 방법.

청구항 84

간염 또는 인플루엔자에 대한 피험체의 면역 방법으로서,

1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하며,

융합 폴리펩티드의 1 이상은 1 이상의 간염 항원 또는 1 이상의 인플루엔자 항원에 결합할 수 있는 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 포함하는, 방법.

청구항 85

피험체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서,

1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하며,

융합 폴리펩티드의 1 이상은 1 이상의 간염 항원 또는 1 이상의 인플루엔자 항원에 융합된 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 포함하는, 방법.

청구항 86

피험체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서,

1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하며,

융합 폴리펩티드의 1 이상은 1 이상의 간염 항원 또는 1 이상의 인플루엔자 항원에 결합할 수 있는 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 포함하는, 방법.

청구항 87

제 83 항 내지 제 86 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역 반응은 세포-매개 면역 반응인, 방법.

청구항 88

간염 또는 인플루엔자로부터의 감염을 진단하는 방법으로서,

제 9 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 따른 1 이상의 폴리머 입자를 피험체에 투여하는 단계 및 간염 또는 인플루엔자 바이러스의 존재를 나타내는 반응을 검출하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 89

제 88 항에 있어서,

상기 간염 또는 인플루엔자 바이러스의 존재를 나타내는 반응은 지연성 과민 반응인, 방법.

청구항 90

제 88 항에 있어서,

상기 간염 또는 인플루엔자 바이러스의 존재를 나타내는 반응은 상기 시료에서 간염 항원 또는 인플루엔자 항원에 대한 항체의 존재를 검출하는 단계인, 방법.

청구항 91

제 88 항에 있어서,

상기 간염 또는 인플루엔자 바이러스의 존재를 나타내는 반응은 상기 시료에서 간염 또는 인플루엔자 바이러스에 반응하는 면역 세포의 존재를 검출하는 단계인, 방법.

청구항 92

제 88 항 내지 제 91 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 피험체가 간염 또는 인플루엔자에 감염되는, 방법.

청구항 93

제 88 항 내지 제 92 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 피험체가 간염 또는 인플루엔자에 대해 면역화되어 있는, 방법.

청구항 94

제 89 항, 또는 제 91 항 내지 제 93 항 중 어느 한 항에 있어서,

간염 항원 또는 인플루엔자 항원을 결합할 수 있는 결합 영역은 내인성 간염 항원 또는 인플루엔자 항원에 결합하는, 방법.

청구항 95

제 88 항 내지 제 94 항 중 어느 한 항에 있어서,

폴리머 입자의 1 이상은 2 이상의 상이한 융합 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 96

제 88 항 내지 제 95 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자의 1 이상은 2 이상의 상이한 간염 항원 또는 2 이상의 인플루엔자 항원, 또는 간염 항원 또는 인플루엔자 항원을 결합할 수 있는 2 이상의 상이한 결합 영역을 포함하는, 방법.

청구항 97

제 88 항 내지 제 96 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자의 1 이상은 1 이상의 간염 항원 또는 1 이상의 인플루엔자 항원, 및 간염 항원 또는 인플루엔자 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역을 포함하는, 방법.

청구항 98

제 88 항 내지 제 97 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자의 1 이상은 상기 폴리머 입자에 결합되거나 또는 혼입된 1 이상의 물질을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 99

제 98 항에 있어서,

상기 물질은 항원, 보조제 또는 면역자극 분자인, 방법.

청구항 100

제 88 항 내지 제 99 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자의 1 이상은 다가인, 방법,

청구항 101

제 98 항 내지 제 100 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질이 가교에 의해 상기 폴리머 입자에 결합되는, 방법.

청구항 102

제 88 항 내지 제 101 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자의 1 이상은 1 이상의 항원, 또는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역을 포함하며, 상기 항원은 C형 간염 바이러스, 아데노바이러스(Adenoviruses), 콕사키바이러스(coxsackievirus), A형 간염 바이러스, 폴리오바이러스(poliovirus)를 포함하는 피코르나바이러스(Picornaviruses), 에프스테인-바 바이러스(epstein-barr virus), 헤르페스 심플렉스 타입 1, 헤르페스 심플렉스 타입 2, 사람 사이토메갈로바이러스(human cytomegalovirus), 사람 헤르페스바이러스 타입 8, 바리셀라-조스테르 바이러스(varicella-zoster virus)를 포함하는 헤르페스바이러스(Herpesviruses), B형 간염 바이러스를 포함하는 헤파드나바이러스(Hepadnaviruses), C형 간염 바이러스를 포함하는 플라비바이러스(Flaviviruses), 인플루엔자 바이러스(influenza virus)를 포함하는 오르토믹소바이러스(Orthomyxoviruses)로 구성된 그룹으로부터 선택된 생물체로부터 유래하거나, 또는 상기 항원의 1 이상의 항원성 일부 또는 T-세포 에피토프인, 방법.

청구항 103

폴리머 입자를 제조하는 방법으로서,

1 이상의 발현 구조물을 포함하는 숙주 세포를 준비하는 단계,

상기 발현 구조물의 발현에 적당한 조건하에 상기 숙주 세포를 유지하는 단계, 및

상기 숙주 세포로부터 폴리머 입자를 분리하는 단계를 포함하며,

상기 1 이상의 발현 구조물은

간염 항원 또는 인플루엔자 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열, 또는

간염 항원 또는 인플루엔자 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 104

1 이상의 간염 항원 또는 1 이상의 인플루엔자 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는, 폴리머 입자.

청구항 105

간염 항원 또는 인플루엔자 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자.

청구항 106

제 104 항 또는 제 105 항에 있어서,

폴리머 입자는 2 이상의 상이한 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자.

청구항 107

제 106 항에 있어서,

상기 폴리머 입자는 2 이상의 상이한 간염 항원 또는 2 이상의 상이한 인플루엔자 항원, 또는 간염 항원 또는 인플루엔자 항원을 결합할 수 있는 2 이상의 상이한 결합 영역을 포함하는, 폴리머 입자.

청구항 108

제 106 항 또는 제 107 항에 있어서,

상기 폴리머 입자는 1 이상의 간염 항원 또는 1 이상의 인플루엔자 항원 및 간염 항원 또는 인플루엔자 항원에 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역을 포함하는, 폴리머 입자.

청구항 109

제 104 항 내지 제 108 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자는 상기 폴리머 입자에 결합되거나 또는 혼입되는 1 이상의 물질, 또는 이들의 조합을 포함하는, 폴리머 입자.

청구항 110

제 109 항에 있어서,

상기 물질은 항원, 보조제 또는 면역자극 분자인, 폴리머 입자.

청구항 111

제 104 항 내지 제 110 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머 입자는 다가인, 폴리머 입자.

청구항 112

제 109 항 내지 제 111 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질은 가교에 의해서 상기 폴리머 입자에 결합되는, 폴리머 입자.

청구항 113

세포-매개 면역 반응을 이를 필요로 하는 피험체에서 유도하기 위해서, 또는 간염 또는 인플루엔자에 대해 피험체를 면역화하기 위해서, 또는 이를 필요로 하는 피험체에서 간염 또는 인플루엔자로부터의 감염을 진단하기 위해서, 1 이상의 간염 항원 또는 1 이상의 인플루엔자 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자.

청구항 114

세포-매개 면역 반응을 이를 필요로 하는 피험체에서 유도하기 위해서, 또는 간염 또는 인플루엔자에 대해 피험체를 면역화하기 위해서, 또는 이를 필요로 하는 피험체에서 간염 또는 인플루엔자로부터의 감염을 진단하기 위해서, 간염 항원 또는 인플루엔자 항원에 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자.

청구항 115

제 104 항 내지 제 114 항 중 어느 한 항에 따른 폴리머 입자를, 세포-매개 면역 반응을 이를 필요로 하는 피험체에서 유도하기 위해서, 또는 간염 또는 인플루엔자에 대해 피험체를 면역화하기 위해서, 또는 이를 필요로 하는 피험체에서 간염 또는 인플루엔자로부터의 감염을 진단하기 위해서 적당한 약제의 제조에 사용되는, 폴리머 입자의 용도.

청구항 116

입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및

간염 항원 또는 인플루엔자 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 또는 간염 항원 또는 인플루엔자 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함하는, 발현 구조물.

청구항 117

제 116 항에 있어서,

상기 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 및 간염 항원 또는 인플루엔자 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 또는 간염 항원 또는 인플루엔자 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열이 단일의 오픈 리딩 프레임으로 존재하는, 발현 구조물.

청구항 118

제 116 항 또는 제 117 항에 있어서,

상기 발현 구조물은 입자-형성 단백질 및 간염 항원 또는 인플루엔자 항원, 또는 간염 항원 또는 인플루엔자 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는, 발현 구조물.

청구항 119

제 116 항 내지 제 118 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 구조물은 하기를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 발현 구조물:

- (i) 1 이상의 티올라제, 또는
- (ii) 1 이상의 리덕타제, 또는
- (iii) 상기 (i)와 (ii) 모두.

청구항 120

제 116 항 내지 제 119 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 구조물은 하기를 코딩하는 핵산을 포함하는, 발현 구조물:

- (i) 1 이상의 티올라제, 또는
- (ii) 1 이상의 리덕타제, 또는
- (iii) 1 이상의 폴리머 신타제, 또는
- (iv) 1 이상의 간염 항원 또는 1 이상의 인플루엔자 항원, 또는
- (v) 1 이상의 간염 항원 또는 1 이상의 인플루엔자 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역, 또는
- (vi) 상기 (i) 내지 (v) 중 1 이상을 포함하는 융합 단백질, 또는
- (vii) 상기 (i) 내지 (vi)의 모든 조합.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 재조합 단백질 및 관련 구조물 및 방법, 및 폴리머 입자 및 이의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 관능화 폴리머 입자, 이의 제조방법 및 면역반응을 유도하고, 세포내 또는 세포의 병원체에 의해 야기된 것을 포함하는 질병 또는 상태를 치료 또는 예방하는데 있어서의 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 이하의 내용은 본 발명을 이해하는데 유용한 정보를 포함한다. 본 명세서에 제공된 정보들 중 어느 것도 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 대한 선행 기술 또는 관련 기술이거나, 또는 구체적으로 또는 암시적으로 참조된 모든 공보 또는 문서가 종래 기술이라고 인정되지 않는다.

[0003] 세포내 및 세포의 병원체를 포함한 병원체는 예를 들면 그중에서 결핵, 간염, 인플루엔자, 나병, 리스테리아증, 장티푸스, 이질, 페스트, 페럼, 발진티푸스, 클라미디아, 탄저병 질환, 뇌수막염을 포함하는 인간에 해로운 여러 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 전통적인 예방접종 전략에 의해 유도되는, 강력한 세포-매개 면역 반응 및 체액성 반응을 일으킬 수 있는 능력은 모두 본 명세서에 포함되어 있다.

[0004] 결핵(Tb)은 예를 들어, 매년 2 만명 이상이 죽는 것으로 추정된다. 결핵의 치료 또는 예방을 위한 현재 방법은 마이코박테리움(Mycobacterium) 결핵 박테리아의 다중 약물 내성 변종의 출현에 의해 도전받고 있다(Anderson, 2007; Mustafa, 2001). 결핵의 치료 또는 예방은 숙주의 면역 시스템에 대한 세포내 박테리아의 비접근성에 의해 복잡하게 된다.

[0005] 기존의 백신 전달 시스템의 단점을 많이 극복하는 대상 예방접종을 제공하기 위한 안전하고 효율적인 방법을 개발하는 것이 바람직하다. 단점은 종종, 시간이 경과함에 따라 감소된 효능으로 인해, 투여를 반복할 필요성 및 비용이 증가한다는 점을 포함한다. 면역반응, 특히 세포-매개 면역반응을 발생시키는 것은 예를 들면 암을 포함하는 여러 다른 질병 또는 상태를 치료하는 방법으로 제안되고 있다. 따라서, 강력한 면역 반응을 유도할 수 있는 백신 조성물, 및 특히 세포-매개 면역반응 또는 체액성 반응 또는 둘다를 유도할 수 있는 조성물이 필요하다.

[0006] 폴리히드록시알킬 카르복실레이트, 특히 폴리히드록시 알카노에이트(PHAs)의 특성들은 의료, 제약 및 식품 산업 용도에서 약물 및 기타 활성제를 수송하기 위한 매트릭스로서의 용도 이외에, 바이오플라스틱에서의 용도에 대하여 조사되었다. PHA 분자의 생명공학을 통해, PHA 분자의 조성 및 발현은 특정 기능에 맞게 조정될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 면역반응 또는 예방접종에 의해 다양한 질병 및 조건들을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 폴리머 입자들을 제공하는 것, 필요로 하는 대상에 효과적인 면역반응을 유도하기 위한 방법 및 조성물을 제공하는 것, 또는 대중에게 적어도 유용한 선택을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 간단한 요약

[0009] 본 발명의 상세한 설명 및 특허청구범위에 기재된 발명은 많은 특성들 및 실시양태들을 포함하지만, 본 간단한 요약에 설정 또는 기재 또는 참조된 것에 국한되지 않는다. 본 발명의 상세한 설명 및 특허청구범위에 기재된 발명 및 여기에 포함된 것들은 모두 간단한 요약에서 확인된 특징들 또는 비제한적인 실시양태들에 국한되지 않으며, 이는 설명을 위한 목적일뿐, 제한을 위한 목적은 아니다.

[0010] 폴리머 입자들을 제조하기 위한 방법들은 본 발명의 상세한 설명에 개시되어 있으며, 상기 방법은:

[0011] 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 또는

[0012] 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함하는 1 이상의 발현 구조물을 포함하는 숙주 세포를 제공하는 단계;

[0013] 상기 발현 구조물의 발현에 적당한 조건하에서 숙주 세포를 유지하는 단계; 및

[0014] 상기 숙주 세포로부터 폴리머 입자들을 분리하는 단계를 포함한다.

- [0015] 한 실시양태에서, 폴리머 입자의 제조 방법은:
- [0016] 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 또는
- [0017] 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함하는 1 이상의 발현 구조물을 포함하는 숙주 세포를 제공하는 단계;
- [0018] 상기 발현 구조물의 발현에 적당한 조건하에서 숙주 세포를 유지하는 단계; 및
- [0019] 상기 숙주 세포로부터 폴리머 입자들을 분리하는 단계를 포함한다.
- [0020] 한 실시양태에서, 입자-형성 단백질은 폴리머 신타제이다.
- [0021] 한 실시양태에서, 발현 구조물은 높은 복제수 벡터(high copy number vector)에 있다.
- [0022] 한 실시양태에서, 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 강한 프로모터에 조작가능하게 연결된다.
- [0023] 한 실시양태에서, 강한 프로모터는 바이러스 프로모터 또는 파아지 프로모터이다.
- [0024] 한 실시양태에서, 프로모터는 파아지 프로모터, 예를 들면 T7 파아지 프로모터이다.
- [0025] 한 실시양태에서, 숙주 세포는 폴리머 신타제의 기체(substrate), 바람직하게는, 존재하는 경우 폴리머 신타제의 기체 또는 기체 혼합물(모노머 기체를 포함), 또는 입자-형성 단백질의 기체를 형성하기 위해 숙주 세포에 의해서 대사될 수 있는 전구물질 기체의 존재하에 유지된다.
- [0026] 한 실시양태에서, 숙주 세포는 2 이상의 다른 발현 구조물을 포함한다.
- [0027] 숙주 세포가 2 이상의 다른 발현 구조물들을 포함하는 일부 실시양태에서, 1 이상의 발현 구조물은 하기를 포함하는 그룹으로부터 선택된다:
- [0028] 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0029] 예를 들면, 세포-매개 면역 반응을 포함하는 면역-반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역 및 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0030] 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원 및 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0031] 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역 및 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0032] 보조제(adjuvant)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0033] 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0034] 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물.
- [0035] 숙주 세포가 2 이상의 다른 발현 구조물들을 포함하는 다른 실시양태에서, 발현 구조물 중 하나는 하기를 포함하는 그룹으로부터 선택된다:
- [0036] 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0037] 입자-크기 결정 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0038] 폴리머 조절제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물.
- [0039] 숙주 세포가 2 이상의 다른 발현 구조물들을 포함하고, 발현 구조물 중 하나는 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산 서열 및 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 다른 실시양태에서, 1 이상의 발현 구조물은 하기를 포함하는 그룹으로부터 선택된다:
- [0040] 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 발현 구조물, 또는

- [0041] 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0042] 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0043] 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0044] 보조제를 코딩하는 핵산 서열 및 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0045] 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물.
- [0046] 한 실시양태에서, 숙주 세포는 발현 구조물들의 혼합 집단을 포함하며, 각 발현 구조물은 융합(fusion) 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 상기 융합 폴리펩티드는 하기를 포함한다:
- [0047] 1 이상의 입자-형성 단백질, 및
- [0048] 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원, 또는
- [0049] 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역.
- [0050] 다양한 실시양태에서, 항원은 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원이다.
- [0051] 본 발명의 다른 측면은,
- [0052] 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
- [0053] 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열
- [0054] 을 포함하는 발현 구조물에 관한 것이다.
- [0055] 한 실시양태에서, 핵산은 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 코딩한다.
- [0056] 본 발명의 다른 측면은,
- [0057] 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
- [0058] 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열
- [0059] 을 포함하는 발현 구조물에 관한 것이다.
- [0060] 다양한 실시양태에서, 항원은 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있으며, 또는 결합 영역은 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있다.
- [0061] 한 실시양태에서, 발현 구조물은 입자-형성 단백질, 및 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩한다.
- [0062] 한 실시양태에서, 발현 구조물은 입자-형성 단백질, 및 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩한다.
- [0063] 한 실시양태에서, 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 및 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 단일의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)으로 존재한다.
- [0064] 한 실시양태에서, 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 및 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 단일의 오픈 리딩 프레임으로 존재한다.
- [0065] 한 실시양태에서, 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 강한 프로모터에 조작가능하게 연결된다.
- [0066] 한 실시양태에서, 발현 구조물은 추가의 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함한다.
- [0067] 한 실시양태에서, 발현 구조물은 하기를 포함한다:
- [0068] 입자-형성 단백질, 및 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및

- [0069] 융합 폴리펩티드의 면역 반응을 유도할 수 있는 항원에 결합할 수 있는 결합 영역에 결합하는 추가의 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열.
- [0070] 한 실시양태에서, 추가의 폴리펩티드는 입자-형성 단백질, 및 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 포함하는 융합 폴리펩티드이다.
- [0071] 한 실시양태에서, 구조물은 하기를 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다:
- [0072] (i) 1 이상의 티올라제(thiolase), 또는
- [0073] (ii). 1 이상의 리덕타제(reductase), 또는
- [0074] (iii) 상기 (i)와 (ii) 모두.
- [0075] 한 실시양태에서, 구조물은 하기를 코딩하는 핵산을 포함한다:
- [0076] (i) 1 이상의 티올라제,
- [0077] (ii) 1 이상의 리덕타제,
- [0078] (iii) 1 이상의 폴리머 신타제(polymer synthase),
- [0079] (iv) 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원, 또는
- [0080] (v) 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역,
- [0081] (vi) 상기 (i) 내지 (v) 중 1 이상을 포함하는 융합 단백질,
- [0082] (vii) 상기 (i) 내지 (vi)의 조합.
- [0083] 한 실시양태에서, 발현 구조물은 하기를 포함한다:
- [0084] 입자-형성 단백질, 및 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
- [0085] 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 추가의 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열.
- [0086] 한 실시양태에서, 발현 구조물은 하기를 포함한다:
- [0087] 입자-형성 단백질, 및 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
- [0088] 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 추가의 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열.
- [0089] 한 실시양태에서, 추가의 폴리펩티드는 입자-형성 단백질, 및 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드이다.
- [0090] 본 발명의 다른 측면은 본 발명의 발현 구조물을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0091] 한 실시양태에서, 벡터는 높은 복제수 벡터이다.
- [0092] 한 실시양태에서, 벡터는 낮은 복제수 벡터이다.
- [0093] 본 발명의 다른 측면은 상기 정의된 발현 구조물 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0094] 한 실시양태에서, 숙주 세포는 하기를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 발현 구조물을 포함한다:
- [0095] 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열, 및 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0096] 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열, 및 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0097] 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열, 및 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 발현 구조물, 또는

- [0098] 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열, 및 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0099] 보조제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0100] 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0101] 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물.
- [0102] 본 발명의 다른 측면은 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자에 관한 것이다.
- [0103] 본 발명의 다른 측면은 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원에 결합할 수 있는 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자에 관한 것이다.
- [0104] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 2 이상의 다른 융합 폴리펩티드들을 포함한다.
- [0105] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 폴리머 입자 표면 상에 2 이상의 다른 융합 폴리펩티드들을 포함한다.
- [0106] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 폴리머 입자 표면 상에 3 이상의 다른 융합 폴리펩티드들과 같은 3 이상의 다른 융합 폴리펩티드들을 포함한다.
- [0107] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 2 이상의 다른 항원들을 포함한다.
- [0108] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 2 이상의 다른 항원들의 결합 영역을 포함한다.
- [0109] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 폴리머 입자에 결합되거나 혼입되는 1 이상의 물질, 또는 이들의 조합물을 추가로 포함한다.
- [0110] 한 실시양태에서, 물질은 항원, 또는 보조제, 또는 면역자극 분자이다.
- [0111] 한 실시양태에서, 물질은 가교에 의해 결합된다.
- [0112] 한 실시양태에서, 1 이상의 폴리머 입자는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원(*M. tuberculosis* antigen), C형 간염 항원, 인플루엔자 항원, 프란시셀라 툴라렌시스 항원(*Francisella tularensis* antigen), 브루셀라 아보르투스 항원(*Brucella abortus* antigen), 수막구균 항원(*Neisseria meningitidis* antigen), 바실루스 안트라시스 항원(*Bacillus anthracis* antigen), 땡기 바이러스 항원(dengue virus antigen), 에볼라 바이러스 항원(ebolavirus antigen), 웨스트 나일 바이러스 항원(West Nile virus antigen)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 1 이상의 항원을 포함하며, 상기 항원들 중 하나를 포함한다.
- [0113] 본 발명의 다른 측면은 상기 방법에 따라 제조된 폴리머 입자에 관한 것이다.
- [0114] 본 발명의 다른 측면은 폴리머 입자의 조성물에 관한 것으로, 상기 폴리머 입자들은 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원에 융합되는 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함한다.
- [0115] 본 발명의 다른 측면은 폴리머 입자의 조성물에 관한 것으로, 상기 폴리머 입자는 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함한다.
- [0116] 본 발명의 다른 측면은 폴리머 입자의 조성물에 관한 것으로, 폴리머 입자들은 상기 정의된 방법에 따라 제조된다.
- [0117] 여러 실시양태에서, 조성물은 백신 조성물이다. 여러 실시양태에서, 백신 조성물은 1 이상의 보조제 또는 면역자극 분자들을 추가로 포함한다.
- [0118] 본 발명의 다른 측면은 상기 정의된 폴리머 입자들의 조성물을 포함하는 진단 체계에 관한 것이다.
- [0119] 본 발명의 다른 측면은 상기 정의된 폴리머 입자의 조성물을 포함하는 진단용 키트에 관한 것이다.

- [0120] 한 실시양태에서, 조성물은 폴리머 입자의 균일한 군집을 포함한다.
- [0121] 한 실시양태에서, 조성물은 폴리머 입자의 혼합 군집을 포함한다.
- [0122] 한 실시양태에서, 조성물은 하기 중 1 이상을 추가로 포함한다:
- [0123] 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원들,
- [0124] 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원들의 1 이상의 결합 영역,
- [0125] 1 이상의 보조제, 또는
- [0126] 1 이상의 면역조절제 또는 분자들.
- [0127] 본 발명의 다른 측면은 피험체에 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 이를 필요로 하는 피험체에 1 이상의 융합(fusion) 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자를 투여하는 단계를 포함하며,
- [0128] 상기 융합 폴리펩티드의 1 이상은 피험체에 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원에 융합된 입자-형성 단백질(particle-forming protein)을 포함한다.
- [0129] 한 실시양태에서, 면역 반응은 세포-매개 면역 반응이다. 한 실시양태에서, 항원은 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원이다.
- [0130] 한 실시양태에서, 면역 반응은 체액성 면역 반응이다. 한 실시양태에서, 항원은 체액성 면역 반응을 유도할 수 있는 항원이다.
- [0131] 본 발명의 다른 측면은 피험자에 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에 투여하는 단계를 포함하는 단계를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 피험체에 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하며, 면역반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역은 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 피험자 또는 투여된 피험자에게 투여된다.
- [0132] 한 실시양태에서, 면역 반응은 세포-매개 면역 반응이다. 한 실시양태에서, 결합 영역은 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있다.
- [0133] 한 실시양태에서, 상기 방법은 투버쿨로시스에 대하여 피험자를 예방접종하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 필요로 하는 피험자에게 투여하는 단계를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 세포-매개 또는 다른 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0134] 한 실시양태에서, 상기 방법은 투버쿨로시스에 대하여 피험자를 예방접종하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 필요로 하는 피험자에게 투여하는 단계를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하며, 세포-매개 또는 다른 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역은 세포-매개 또는 다른 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 피험자에게 또는 투여되는 피험자에게 결합된다.
- [0135] 한 실시양태에서, 1 이상의 폴리머 입자는 피험자에게 세포-매개 또는 다른 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 조성물과 같이, 피험자에게 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 조성물 내에 존재한다.
- [0136] 한 실시양태에서, 본 발명은 투버쿨로시스로 감염된 피험자에게 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 예를 들면 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 포함하는 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0137] 한 실시양태에서, 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역은 예를 들면, 내인성 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 결합한다.
- [0138] 본 발명의 다른 측면은 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 피험자에게 유도하는 폴리머 입자에 관한 것으로, 폴리머 입자는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 피험자에 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원에 융합된 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 포함한다.

- [0139] 한 실시양태에서, 면역 반응은 세포-매개 면역 반응이다. 한 실시양태에서, 항원은 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원이다.
- [0140] 한 실시양태에서, 면역 반응은 체액성 면역 반응이다. 한 실시양태에서, 항원은 체액성 면역 반응을 유도할 수 있는 항원이다.
- [0141] 본 발명의 다른 측면은 이를 필요로 하는 피험자에 면역 반응을 유도하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 1 이상의 폴리머 입자는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 피험자에 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하며, 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역은 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원에 결합된, 항원을 포함하는 피험자에게 결합한다.
- [0142] 한 실시양태에서, 면역 반응은 세포-매개 면역 반응이다. 한 실시양태에서, 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있다. 한 실시양태에서, 면역 반응은 체액성 면역 반응이다. 한 실시양태에서, 항원은 체액성 면역 반응을 유도할 수 있는 항원이다.
- [0143] 한 실시양태에서, 1 이상의 폴리머 입자는 면역 반응, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 조성물내에 존재한다.
- [0144] 한 실시양태에서, 1 이상의 폴리머 입자는 예를 들면, 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 포함하는 조성물내에 존재한다.
- [0145] 한 실시양태에서, 실시예에 의해, 1 이상의 폴리머 입자는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원, C형 간염 항원, 인플루엔자 항원, 프란시셀라 툴라렌시스 항원, 브루셀라 아보르투스 항원, 수막구균 항원, 바실루스 안트라시스 항원, 뎅기 바이러스 항원, 에볼라 바이러스 항원, 웨스트 나일 바이러스 항원을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 1 이상의 항원을 포함하며, 상기 항원들 중 하나를 포함한다.
- [0146] 한 실시양태에서, 피험자는 세포내 병원체로 감염되거나, 또는 예를 들면 세포내 병원체에 의해 감염될 위험이 있다. 다른 실시양태에서, 피험자는 예를 들면 우선적으로 세포내 생명주기를 갖는 병원체에 의해 감염되거나 또는 감염될 위험에 있다.
- [0147] 여러 실시양태에서, 피험체는 간염, 인플루엔자 또는 투버쿨로시스에 의해 감염된다.
- [0148] 다른 실시양태에서, 피험체는 예를 들면, 세포내 병원체에 대하여 예방접종받았다. 예를 들면, 피험체는 바실루스 칼메트-게랭(Bacillus Calmette-Guerin, BCG)에 의해 예방접종받았다.
- [0149] 한 실시양태에서, 피험체는 예를 들면 세포외 병원체에 의해 감염되거나, 또는 세포외 병원체에 의해 감염될 위험에 있다. 다른 실시양태에서, 피험체는 예를 들면 우선적으로 세포외 생명주기를 갖는 병원체에 의해 감염되거나, 또는 감염될 위험에 있다.
- [0150] 본 발명의 다른 측면은 세포내 병원체에 의해 감염되거나 또는 예방접종받은 피험체에서 면역 반응을 유도하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 1 이상의 폴리머 입자는 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역에 융합된, 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 포함한다.
- [0151] 세포내 병원체에 대하여 피험체를 예방접종하기 위한, 또는 세포내 병원체에 의해 감염된 또는 예방접종된 피험체를 포함하는 피험체에 면역반응을 유도하기 위한 약제를 제조하는데 상기 설명된 폴리머 입자를 사용하는 것도 또한 고려된다.
- [0152] 본 발명의 다른 측면은 예를 들면 세포외 병원체에 의해 감염되거나 또는 이에 대하여 예방접종된 피험체에 면역 반응을 유도하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 상기 1 이상의 폴리머 입자는 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역에 융합된, 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 포함한다.
- [0153] 예를 들면 세포외 병원체에 대하여 피험체를 예방접종하기 위한, 또는 예를 들면 세포외 병원체에 의해 감염되거나 또는 이에 대하여 예방접종된 피험체를 포함하는 피험체에 면역 반응을 유도하기 위한 약제를 제조하는데 있어서 상기 설명된 폴리머 입자의 용도가 또한 고려된다.
- [0154] 본 발명은 필요로 하는 피험체를 백신화하기 위해 본 명세서에 설명된 폴리머 입자를 추가로 제공한다. 따라서, 필요로 하는 피험체를 백신화하기 위한 약제를 제조하는데 있어서 상기 설명된 폴리머 입자의 용도가 고려된다.

- [0155] 본 발명의 다른 측면은 병원체로부터의 감염을 진단하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자를 피험체에 투여하는 단계 및 병원체 존재를 나타내는 반응을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0156] 한 실시양태에서, 병원체는 세포내 병원체이다. 다른 실시양태에서, 병원체는 세포외 병원체이다.
- [0157] 한 실시양태에서, 세포내 병원체와 같은 병원체 존재를 나타내는 반응은 지연성 과민 반응(delayed-type hypersensitivity response)이다.
- [0158] 본 발명의 다른 측면은 병원체로부터의 감염을 진단하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 피험체로부터 얻은 시료를 본 발명의 폴리머 입자와 접촉시키는 단계 및 병원체 존재를 나타내는 반응을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0159] 다시, 특정 실시양태에서, 병원체는 세포내 병원체, 세포외 병원체, 예를 들면 우선적으로 세포내 생명-주기를 갖는 병원체, 또는 예를 들면 우선적으로 세포외 생명-주기를 갖는 병원체이다.
- [0160] 한 실시양태에서, 병원체 존재를 나타내는 반응은 상기 시료내 병원체에 대한 항체가 존재함을 검출하는 것이다.
- [0161] 한 실시양태에서, 병원체 존재를 나타내는 반응은 상기 시료에서 병원체에 반응하는 면역 세포의 존재를 검출하는 것이다.
- [0162] 한 실시양태에서, 병원체에 대한 항체 존재의 검출은 면역분석법(immunoassay)에 의해 행한다.
- [0163] 한 실시양태에서, 병원체에 대한 항체 존재의 검출은 ELISA, 방사면역측정법(radioimmunoassay-assay) 또는 웨스턴 블롯(Western Blot)에 의해 행한다.
- [0164] 한 실시양태에서, 병원체 존재를 나타내는 반응은 상기 시료내 병원체에 반응하는 면역 세포의 존재를 검출하는 것이다.
- [0165] 본 발명의 다른 측면은 폴리머 입자를 제조하는 방법을 제공하며,
- [0166] 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0167] 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 및 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 또는 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함하는, 1 이상의 발현 구조물을 포함하는 숙주 세포를 준비하는 단계,
- [0168] 발현 구조물의 발현 및 폴리머 입자의 형성에 적당한 조건하에 상기 숙주 세포를 유지하는 단계, 및
- [0169] 상기 숙주 세포로부터 폴리머 입자를 분리하는 단계.
- [0170] 숙주 세포가 2 이상의 상이한 발현 구조물을 포함하는 일부 실시양태에서, 1 이상의 발현 구조물은 하기를 포함하는 그룹으로부터 선택된다:
- [0171] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0172] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0173] 보조제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0174] 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물.
- [0175] 숙주 세포가 2 이상의 상이한 발현 구조물을 포함하는 다른 실시양태에서, 발현 구조물 중 하나는 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 포함하며, 1 이상의 발현 구조물은:
- [0176] 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0177] 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 포함하는 발현 구조물, 또는

- [0178] 보조제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0179] 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물로 구성된 그룹으로부터 선택된다.
- [0180] 한 실시양태에서, 숙주 세포는 발현 구조물의 혼성 균집을 포함하며, 상기 각 발현 구조물은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하며,
- [0181] 융합 폴리펩티드는 1 이상의 입자-형성 단백질 및
- [0182] 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 또는 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 포함한다.
- [0183] 본 발명의 다른 측면은 발현 구조물에 관한 것으로,
- [0184] 발현 구조물은:
- [0185] 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
- [0186] 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함한다.
- [0187] 본 발명의 다른 측면은 발현 구조물에 관한 것으로,
- [0188] 발현 구조물은:
- [0189] 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
- [0190] 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함한다.
- [0191] 한 실시양태에서, 발현 구조물은 입자-형성 단백질 및 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩한다.
- [0192] 한 실시양태에서, 발현 구조물은 입자-형성 단백질 및 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩한다.
- [0193] 한 실시양태에서, 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 및 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 단일의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)으로 존재한다.
- [0194] 한 실시양태에서, 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 및 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 단일의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)으로 존재한다.
- [0195] 한 실시양태에서, 발현 구조물은:
- [0196] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
- [0197] 융합 폴리펩티드의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역에 결합하는 1 이상의 폴리펩티드를 포함하는 추가의 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함한다.
- [0198] 한 실시양태에서, 추가의 폴리펩티드는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원이거나, 또는 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 포함한다.
- [0199] 한 실시양태에서, 추가의 폴리펩티드는 입자-형성 단백질 및 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 포함하는 융합 폴리펩티드이다.
- [0200] 한 실시양태에서, 발현 구조물은:
- [0201] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
- [0202] 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 포함하는 추가의 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함한다.
- [0203] 한 실시양태에서, 추가의 폴리펩티드는 입자-형성 단백질 및 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드이다.

- [0204] 한 실시양태에서, 숙주 세포는:
- [0205] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0206] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0207] 보조제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0208] 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0209] 본 발명의 다른 측면은 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자에 관한 것이다.
- [0210] 본 발명의 다른 측면은 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자에 관한 것이다.
- [0211] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 2 이상의 다른 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 포함한다.
- [0212] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 2 이상의 다른 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 포함한다.
- [0213] 본 발명의 다른 측면은 폴리머 입자들의 조성물에 관한 것으로, 폴리머 입자들은 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함한다.
- [0214] 본 발명의 다른 측면은 폴리머 입자들의 조성물에 관한 것으로, 폴리머 입자들은 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함한다.
- [0215] 한 실시양태에서, 상기 조성물은:
- [0216] 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원,
- [0217] 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역,
- [0218] 1 이상의 보조제, 또는
- [0219] 1 이상의 면역조절제 또는 분자들 중 1 이상을 추가로 포함한다.
- [0220] 본 발명의 다른 측면은 투버쿨로시스에 대하여 피험체를 예방접종하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에 투여하는 단계를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0221] 본 발명의 다른 측면은 투버쿨로시스에 대하여 피험체를 예방접종하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에 투여하는 단계를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하며, 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역은 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 결합되어, 피험체가 포함하거나, 또는 피험체에 투여된다.
- [0222] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 포함하는 조성물내에 존재한다.
- [0223] 본 발명의 다른 측면은 피험체에 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에 투여하는 단계를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0224] 본 발명의 다른 측면은 피험자에 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험자에 투여하는 단계를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하며, 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역은 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 결합되어 피험자가 포함하거나, 또는 피험자에 투여된다.
- [0225] 한 실시양태에서, 1 이상의 폴리머 입자는 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 포함하는 조성물내에

존재한다.

- [0226] 한 실시양태에서, 피험자는 투버쿨로시스에 의해 감염된다.
- [0227] 다른 실시양태에서, 피험자는 투버쿨로시스에 대하여 예방접종되었다. 일례로, 피험자는 바실루스 칼메트-게랭(Bacillus Calmette-Guerin, BCG)에 의해 백신화되었다(세계보건기구 - <http://www.who.int>).
- [0228] 본 발명의 다른 측면은 투버쿨로시스에 의해 감염된 피험자에 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험자에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0229] 한 실시양태에서, 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역은 내인성 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 결합한다.
- [0230] 본 발명의 다른 측면은 투버쿨로시스에 대하여 피험자를 예방접종하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 폴리머 입자는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0231] 본 발명의 다른 측면은 투버쿨로시스에 대하여 피험자를 예방접종하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 폴리머 입자는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0232] 본 발명의 다른 측면은 피험자에 면역 반응을 유도하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 폴리머 입자는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0233] 본 발명의 다른 측면은 피험자에 면역 반응을 유도하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 폴리머 입자는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0234] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 포함하는 조성물내에 존재한다.
- [0235] 한 실시양태에서, 피험자는 투버쿨로시스에 의해 감염된다.
- [0236] 다른 실시양태에서, 피험자는 투버쿨로시스에 대하여 예방접종되었다. 예를 들면, 피험자는 바실루스 칼메트-게랭(BCG)에 의해 백신화되었다.
- [0237] 본 발명의 다른 측면은 투버쿨로시스에 의해 감염되거나 또는 이에 대하여 예방접종된 피험자에 면역 반응을 유도하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 폴리머 입자는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0238] 투버쿨로시스에 대하여 피험자를 예방접종하거나, 또는 투버쿨로시스에 의해 감염되거나 또는 예방접종된 피험자를 포함하는 피험자에 면역 반응을 유도하기 위한 약제를 제조하는데 있어서 상기 폴리머 입자의 용도가 또한 고려된다.
- [0239] 본 발명의 다른 측면은 피험자에서 투버쿨로시스를 진단하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자를 피험자에 투여하는 단계 및 마이코박테리움 투버쿨로시스의 존재를 나타내는 반응을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0240] 한 실시양태에서, 마이코박테리움 투버쿨로시스의 존재를 나타내는 반응은 지연성 과민 반응(delayed-type hypersensitivity response)이다.
- [0241] 본 발명의 다른 측면은 피험자에서 투버쿨로시스를 진단하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 피험자로부터 얻은 시료를 본 발명의 폴리머 입자와 접촉시키는 단계 및 마이코박테리움 투버쿨로시스의 존재를 나타내는 반응을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0242] 한 실시양태에서, 마이코박테리움 투버쿨로시스의 존재를 나타내는 반응은 상기 시료내 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 대한 항체의 존재를 나타낸다.
- [0243] 한 실시양태에서, 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 대한 항체의 존재는 면역분석법에 의해 검출된다.
- [0244] 한 실시양태에서, 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 대한 항체의 존재를 검출하는 것은 ELISA, 방사면역분석

법 또는 웨스턴 블롯에 의해 행한다.

- [0245] 한 실시양태에서, 세포내 병원체의 존재를 나타내는 반응은 상기 시료내 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 대하여 반응하는 면역 세포가 존재함을 나타내는 반응이다.
- [0246] 한 실시양태에서, 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 대하여 반응하는 면역 세포의 존재는 세포증식 분석법, FACS를 포함하는 세포분류 분석법 또는 인시츄 동소교합 분석법(in situ hybridisation assay)에 의해 검출된다.
- [0247] 본 발명의 다른 측면은 폴리머 입자들을 제조하는 방법을 제공하며,
- [0248] 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:
- [0249] 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및 간염 항원 또는 간염 항원 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함하는 1 이상의 발현 구조물을 포함하는 숙주 세포를 준비하는 단계;
- [0250] 발현 구조물의 발현 및 폴리머 입자의 형성에 적당한 조건하에 숙주 세포를 유지하는 단계; 및
- [0251] 숙주 세포들로부터 폴리머 입자들을 분리하는 단계.
- [0252] 숙주 세포가 2 이상의 다른 발현 구조물을 포함하는 일부 실시양태에서, 1 이상의 발현 구조물은:
- [0253] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 간염 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0254] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 간염 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0255] 보조제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0256] 1 이상의 간염 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물
- [0257] 을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0258] 숙주 세포가 2 이상의 상이한 발현 구조물을 포함하는 다른 실시양태에서, 발현 구조물 중 하나는 입자-형성 단백질 및 1 이상의 간염 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 1 이상의 발현 구조물은:
- [0259] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 간염 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0260] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 간염 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0261] 보조제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0262] 1 이상의 간염 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물
- [0263] 을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0264] 한 실시양태에서, 숙주 세포는 발현 구조물의 혼성 군집을 포함하며, 각 발현 구조물들은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 융합 폴리펩티드는:
- [0265] 1 이상의 입자-형성 단백질 및
- [0266] 1 이상의 간염 항원 또는 1 이상의 간염 항원 결합 영역
- [0267] 을 포함한다.
- [0268] 본 발명의 다른 측면은 발현 구조물에 관한 것으로, 발현 구조물은:
- [0269] 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
- [0270] 간염 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열
- [0271] 을 포함한다.
- [0272] 본 발명의 다른 측면은 발현 구조물에 관한 것으로, 발현 구조물은:
- [0273] 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
- [0274] 간염 항원 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열

- [0275] 을 포함한다.
- [0276] 한 실시양태에서, 발현 구조물은 입자-형성 단백질 및 간염 항원을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩한다.
- [0277] 한 실시양태에서, 발현 구조물은 입자-형성 단백질 및 간염 항원 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩한다.
- [0278] 한 실시양태에서, 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 및 간염 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 단일의 오픈 리딩 프레임으로 존재한다.
- [0279] 한 실시양태에서, 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 및 간염 항원 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 단일의 오픈 리딩 프레임으로 존재한다.
- [0280] 한 실시양태에서, 발현 구조물은:
- [0281] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 간염 항원 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
- [0282] 융합 폴리펩티드의 간염 항원 결합 영역에 결합하는 1 이상의 폴리펩티드를 포함하는 추가의 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열
- [0283] 을 포함한다.
- [0284] 한 실시양태에서, 추가의 폴리펩티드는 간염 항원이거나, 또는 1 이상의 간염 항원을 포함한다.
- [0285] 한 실시양태에서, 추가의 폴리펩티드는 입자-형성 단백질 및 1 이상의 간염 항원을 포함하는 융합 폴리펩티드이다.
- [0286] 한 실시양태에서, 발현 구조물은:
- [0287] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 간염 항원을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
- [0288] 1 이상의 간염 항원 결합 영역에 결합하는 추가의 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열
- [0289] 을 포함한다.
- [0290] 한 실시양태에서, 추가의 폴리펩티드는 입자-형성 단백질 및 1 이상의 간염 항원 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드이다.
- [0291] 한 실시양태에서, 숙주 세포는:
- [0292] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 간염 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0293] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 간염 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0294] 보조제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0295] 1 이상의 간염 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물
- [0296] 을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 발현 구조물을 포함한다.
- [0297] 본 발명의 다른 측면은 1 이상의 간염 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자에 관한 것이다.
- [0298] 본 발명의 다른 측면은 1 이상의 간염 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자에 관한 것이다.
- [0299] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 2 이상의 상이한 간염 항원을 포함한다.
- [0300] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 2 이상의 상이한 간염 항원 결합 영역을 포함한다.
- [0301] 본 발명의 다른 측면은 폴리머 입자의 조성물에 관한 것으로, 상기 폴리머 입자는 1 이상의 간염 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함한다.
- [0302] 본 발명의 다른 측면은 폴리머 입자의 조성물에 관한 것으로, 상기 폴리머 입자는 1 이상의 간염 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함한다.

- [0303] 한 실시양태에서, 조성물은:
- [0304] 하기 중 1 이상을 추가로 포함한다:
- [0305] 1 이상의 간염 항원,
- [0306] 1 이상의 간염 항원 결합 영역,
- [0307] 1 이상의 보조제, 또는
- [0308] 1 이상의 면역조절제 또는 분자들.
- [0309] 본 발명의 다른 측면은 간염에 대하여 피험자에 예방접종하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험자에 투여하는 단계를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 간염 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0310] 본 발명의 다른 측면은 간염에 대하여 피험자에 예방접종하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험자에 투여하는 단계를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 간염 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하며, 간염 항원 결합 영역은 1 이상의 간염 항원에 결합하여 피험자가 포함하거나 피험자에 투여된다.
- [0311] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 1 이상의 간염 항원을 포함하는 조성물내에 존재한다.
- [0312] 본 발명의 다른 측면은 피험자에 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험자에 투여하는 단계를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 간염 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0313] 본 발명의 다른 측면은 피험자에 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험자에 투여하는 단계를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 간염 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하며, 간염 항원 결합 영역은 1 이상의 간염 항원에 결합하여, 피험자가 포함하거나, 피험자에 투여된다.
- [0314] 한 실시양태에서, 1 이상의 폴리머 입자는 1 이상의 간염 항원을 포함하는 조성물내에 존재한다.
- [0315] 한 실시양태에서, 피험자는 간염에 의해 감염된다.
- [0316] 다른 실시양태에서, 피험자는 간염에 대하여 예방접종되었다.
- [0317] 본 발명의 다른 측면은 간염에 의해 감염된 피험자에 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 간염 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험자에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0318] 한 실시양태에서, 간염 항원 결합 영역은 내인성 간염 항원에 결합한다.
- [0319] 본 발명의 다른 측면은 간염에 대하여 피험자를 예방접종하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 상기 폴리머 입자는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 간염 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0320] 본 발명의 다른 측면은 간염에 대하여 피험자를 예방접종하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 상기 폴리머 입자는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 간염 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0321] 본 발명의 다른 측면은 피험자에 면역 반응을 유도하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 상기 폴리머 입자는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 간염 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0322] 본 발명의 다른 측면은 피험자에 면역 반응을 유도하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 상기 폴리머 입자는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 간염 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0323] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 1 이상의 간염 항원을 포함하는 조성물내에 존재한다.
- [0324] 한 실시양태에서, 피험체는 간염에 의해 감염된다.

- [0325] 다른 실시양태에서, 피험체는 간염에 대하여 예방접종되었다.
- [0326] 본 발명의 다른 측면은 간염에 의해 감염되거나, 또는 예방접종된 피험체에 면역 반응을 유도하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 상기 폴리머 입자는 간염 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0327] 간염에 의해 감염되거나 또는 예방접종된 피험체를 포함하는 피험체에 면역 반응을 유도하기 위한, 또는 간염에 대하여 피험체를 예방접종하기 위한 약제를 제조하는데 있어서 상기 설명된 폴리머 입자의 용도도 또한 고려된다.
- [0328] 본 발명의 다른 측면은 피험체에 간염을 진단하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자를 피험체에 투여하는 단계 및 바이러스성 간염이 존재함을 나타내는 반응을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0329] 한 실시양태에서, 바이러스성 간염의 존재를 나타내는 반응은 지연성 과민 반응(delayed-type hypersensitivity response)이다.
- [0330] 본 발명의 다른 측면은 피험체에 간염을 진단하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 피험체로부터 얻은 시료를 본 발명의 폴리머 입자와 접촉시키는 단계 및 바이러스성 간염의 존재를 나타내는 반응을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0331] 한 실시양태에서, 바이러스성 간염의 존재를 나타내는 반응은 상기 시료내 바이러스성 간염 항원에 대한 항체가 존재한다는 것이다.
- [0332] 한 실시양태에서, 간염 항원에 대한 항체의 존재는 면역분석법에 의해 검출된다.
- [0333] 한 실시양태에서, 바이러스성 간염 항원에 대한 항체의 존재를 검출하는 것은 ELISA, 방사면역측정-분석법, 또는 웨스턴 블롯에 의해 실시한다.
- [0334] 한 실시양태에서, 세포내 병원체의 존재를 나타내는 반응은 상기 시료내 간염 항원에 대하여 반응하는 면역 세포가 존재한다는 것이다.
- [0335] 한 실시양태에서, 바이러스성 간염 항원에 대하여 반응하는 면역 세포의 존재는 세포증식 분석법, FACS를 포함하는 세포분류 분석법 또는 인시츄 교잡 분석법에 의해 검출된다.
- [0336] 본 발명의 다른 측면은 폴리머 입자를 제조하는 방법을 제공하며,
- [0337] 상기 방법은:
- [0338] 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및 인플루엔자 항원 또는 인플루엔자 항원 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함하는 1 이상의 발현 구조물을 포함하는 숙주 세포를 준비하는 단계;
- [0339] 발현 구조물을 발현하고, 폴리머 입자를 형성하기에 적당한 조건하에 숙주 세포를 유지하는 단계; 및
- [0340] 숙주 세포로부터 폴리머 입자들을 분리하는 단계
- [0341] 를 포함한다.
- [0342] 숙주 세포가 2 이상의 상이한 발현 구조물들을 포함하는 일부 실시양태에서, 1 이상의 발현 구조물은:
- [0343] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 인플루엔자 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0344] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 인플루엔자 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0345] 보조제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0346] 1 이상의 인플루엔자 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물
- [0347] 을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0348] 숙주 세포가 2 이상의 상이한 발현 구조물들을 포함하는 다른 실시양태에서, 발현 구조물 중 하나는 입자-형성 단백질 및 1 이상의 인플루엔자 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 1 이상의 발현 구조물은:
- [0349] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 인플루엔자 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0350] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 인플루엔자 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는

- [0351] 보조제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0352] 1 이상의 인플루엔자 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물
- [0353] 을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0354] 숙주 세포가 발현 구조물의 혼성 군집을 포함하는 한 실시양태에서, 각 발현 구조물은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 융합 폴리펩티드는 1 이상의 입자-형성 단백질 및 1 이상의 인플루엔자 항원 또는 1 이상의 인플루엔자 항원 결합 영역을 포함한다.
- [0355] 본 발명의 다른 측면은 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및 인플루엔자 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물에 관한 것이다.
- [0356] 본 발명의 다른 측면은 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 및 인플루엔자 항원 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물에 관한 것이다.
- [0357] 한 실시양태에서, 발현 구조물은 입자-형성 단백질 및 인플루엔자 항원을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩한다.
- [0358] 한 실시양태에서, 발현 구조물은 입자-형성 단백질 및 인플루엔자 항원 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩한다.
- [0359] 한 실시양태에서, 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 및 인플루엔자 항원을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 단일의 오픈 리딩 프레임으로 존재한다.
- [0360] 한 실시양태에서, 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열 및 인플루엔자 항원 결합 영역을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 단일의 오픈 리딩 프레임으로 존재한다.
- [0361] 한 실시양태에서, 발현 구조물은:
- [0362] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 인플루엔자 항원 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
- [0363] 융합 폴리펩티드의 인플루엔자 항원 결합 영역에 결합하는 1 이상의 폴리펩티드를 포함하는 추가의 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열
- [0364] 을 포함한다.
- [0365] 한 실시양태에서, 추가의 폴리펩티드는 인플루엔자 항원이거나, 또는 1 이상의 인플루엔자 항원을 포함한다.
- [0366] 한 실시양태에서, 추가의 폴리펩티드는 입자-형성 단백질 및 1 이상의 인플루엔자 항원을 포함하는 융합 폴리펩티드이다.
- [0367] 한 실시양태에서, 발현 구조물은:
- [0368] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 인플루엔자 항원을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열; 및
- [0369] 1 이상의 인플루엔자 항원 결합 영역을 포함하는 추가의 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열
- [0370] 을 포함한다.
- [0371] 한 실시양태에서, 추가의 폴리펩티드는 입자-형성 단백질 및 1 이상의 인플루엔자 항원 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드이다.
- [0372] 한 실시양태에서, 숙주 세포는:
- [0373] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 인플루엔자 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0374] 입자-형성 단백질 및 1 이상의 인플루엔자 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0375] 보조제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0376] 1 이상의 인플루엔자 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물

- [0377] 을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 발현 구조물을 포함한다.
- [0378] 본 발명의 다른 측면은 1 이상의 인플루엔자 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자에 관한 것이다.
- [0379] 본 발명의 다른 측면은 1 이상의 인플루엔자 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 폴리머 입자에 관한 것이다.
- [0380] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 2 이상의 상이한 인플루엔자 항원들을 포함한다.
- [0381] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 2 이상의 상이한 인플루엔자 항원 결합 영역들을 포함한다.
- [0382] 본 발명의 다른 측면은 폴리머 입자의 조성물에 관한 것으로, 폴리머 입자는 1 이상의 인플루엔자 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함한다.
- [0383] 본 발명의 다른 측면은 폴리머 입자의 조성물에 관한 것으로, 폴리머 입자는 1 이상의 인플루엔자 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함한다.
- [0384] 한 실시양태에서, 조성물은:
- [0385] 1 이상의 인플루엔자 항원들,
- [0386] 1 이상의 인플루엔자 항원 결합 영역들,
- [0387] 1 이상의 보조제들, 또는
- [0388] 1 이상의 면역조절제 또는 분자들 중 하나 이상을 추가로 포함한다.
- [0389] 본 발명의 다른 측면은 인플루엔자에 대하여 피험체를 예방접종하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에 투여하는 단계를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 인플루엔자 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0390] 본 발명의 다른 측면은 인플루엔자에 대하여 피험체를 예방접종하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험자에 투여하는 단계를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드들은 1 이상의 인플루엔자 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하며, 인플루엔자 항원 결합 영역은 1 이상의 인플루엔자 항원에 결합되어 피험체가 포함하거나, 또는 피험체에 투여된다.
- [0391] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 1 이상의 인플루엔자 항원을 포함하는 조성물내에 존재한다.
- [0392] 본 발명의 다른 측면은 피험체에 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에 투여하는 단계를 포함하며, 상기 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 인플루엔자 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0393] 본 발명의 다른 측면은 피험체에 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에 투여하는 단계를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 인플루엔자 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하며, 인플루엔자 항원 결합 영역은 1 이상의 인플루엔자 항원에 결합되어, 피험체가 포함하거나, 또는 피험체에 투여된다.
- [0394] 한 실시양태에서, 1 이상의 폴리머 입자는 1 이상의 인플루엔자 항원을 포함하는 조성물내에 존재한다.
- [0395] 한 실시양태에서, 피험체는 인플루엔자에 의해 감염된다.
- [0396] 다른 실시양태에서, 피험체는 인플루엔자에 대하여 예방접종받았다.
- [0397] 본 발명의 다른 측면은 인플루엔자에 의해 감염된 피험체에 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 인플루엔자 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 1 이상의 폴리머 입자를 이를 필요로 하는 피험체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0398] 한 실시양태에서, 인플루엔자 항원 결합 영역은 내인성 인플루엔자 항원에 결합한다.
- [0399] 본 발명의 다른 측면은 인플루엔자에 대하여 피험체를 예방접종하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 폴리머 입자는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 인플루엔자 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.

- [0400] 본 발명의 다른 측면은 인플루엔자에 대하여 피험체를 예방접종하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 폴리머 입자는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 인플루엔자 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0401] 본 발명의 다른 측면은 피험체에 면역 반응을 유도하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 폴리머 입자는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 인플루엔자 항원에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0402] 본 발명의 다른 측면은 피험체에 면역 반응을 유도하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 폴리머 입자는 1 이상의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 1 이상의 인플루엔자 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0403] 한 실시양태에서, 폴리머 입자는 1 이상의 인플루엔자 항원을 포함하는 조성물내에 존재한다.
- [0404] 한 실시양태에서, 피험체는 인플루엔자에 의해 감염된다.
- [0405] 다른 실시양태에서, 피험체는 인플루엔자에 대하여 예방접종받았다.
- [0406] 본 발명의 다른 측면은 인플루엔자에 의해 감염되거나, 또는 예방접종받은 피험체에 면역 반응을 유도하기 위한 폴리머 입자에 관한 것으로, 상기 폴리머 입자는 인플루엔자 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0407] 인플루엔자에 대하여 피험체를 예방접종하기 위해, 또는 인플루엔자에 의해 감염되거나 또는 예방접종받은 피험체를 포함하는 피험체에 면역 반응을 유도하기 위해 약제를 제조하는데 있어서 상기 폴리머 입자의 용도가 또한 고려된다.
- [0408] 본 발명의 다른 측면은 피험체에서 인플루엔자를 진단하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자를 피험체에 투여하는 단계 및 인플루엔자 바이러스의 존재를 나타내는 반응을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0409] 한 실시양태에서, 인플루엔자 바이러스의 존재를 나타내는 반응은 지연성 과민 반응이다.
- [0410] 본 발명의 다른 측면은 피험체에서 인플루엔자를 진단하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 피험체로부터 얻은 시료를 본 발명의 폴리머 입자와 접촉시키는 단계 및 인플루엔자 바이러스의 존재를 나타내는 반응을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0411] 한 실시양태에서, 인플루엔자 바이러스의 존재를 나타내는 반응은 상기 시료내에 인플루엔자 항원에 대한 항체가 존재함을 나타낸다.
- [0412] 한 실시양태에서, 인플루엔자 항원에 대한 항체의 존재는 면역분석법에 의해 검출된다.
- [0413] 한 실시양태에서, 인플루엔자 항원에 대한 항체의 존재를 검출하는 것은 ELISA, 방사면역분석-분석법, 또는 웨스턴 블롯에 의해 수행된다.
- [0414] 한 실시양태에서, 세포내 병원체의 존재를 나타내는 반응은 상기 시료내 인플루엔자 항원에 대하여 반응하는 면역 세포의 존재를 나타낸다.
- [0415] 한 실시양태에서, 인플루엔자 항원에 대하여 반응하는 면역 세포의 존재는 세포 증식 분석법, FACS를 포함하는 세포분류 분석법, 또는 인시츄 교잡 분석법에 의해 검출된다.
- [0416] 하기 실시양태들은 상기 측면들 중 어느 하나에 관한 것이다.
- [0417] 여러 실시양태들에서, 입자-형성 단백질은 폴리머 신타제이다.
- [0418] 여러 실시양태에서, 폴리머 입자는 폴리-베타-아미노산, 폴리락테이트, 폴리티오에스테르 및 폴리에스테르로부터 선택되는 폴리머를 포함한다. 가장 바람직하게는, 폴리머는 폴리히드록시알카노에이트(PHA), 바람직하게는 폴리(3-히드록시부티레이트(PHB))를 포함한다.
- [0419] 여러 실시양태에서, 폴리머 입자는 인지질 단일층에 의해 피막된(encapsulated) 폴리머 입자를 포함한다.
- [0420] 여러 실시양태에서, 폴리머 입자는 2 이상의 상이한 융합 폴리펩티드들을 포함한다.
- [0421] 여러 실시양태에서, 폴리머 입자는 폴리머 입자 표면에 2 이상의 상이한 융합 폴리펩티드를 포함한다.

- [0422] 여러 실시양태에서, 폴리머 입자는 폴리머 입자 표면에 3 이상의 상이한 융합 폴리펩티드와 같은 3 이상의 상이한 융합 폴리펩티드를 포함한다.
- [0423] 여러 실시양태에서, 폴리머 입자는 폴리머 입자에 결합된 1 이상의 물질, 또는 통합된 물질, 또는 이들의 조합을 추가로 포함한다.
- [0424] 여러 실시양태에서, 물질은 항원, 보조제 또는 면역조절 분자이다.
- [0425] 여러 실시양태에서, 물질은 가교에 의해 폴리머 입자에 결합된다.
- [0426] 여러 실시양태에서, 폴리머 신타제는 폴리머 입자에 결합되거나, 또는 인지질 단일층에 결합되거나, 또는 둘다에 결합된다.
- [0427] 여러 실시양태에서, 폴리머 신타제는 이를 형성하는 폴리머 입자에 공유결합되거나 또는 비공유결합된다.
- [0428] 여러 실시양태에서, 폴리머 신타제는 클래스 1 아시네토박터속(class 1 genera *Acinetobacter*), 비브리오속(*Vibrio*), 에어로모나스속(*Aeromonas*), 클로로박테리움 슈도모나스속(*Chromobacterium*, *Pseudomonas*), 주글레아속(*Zoogloea*), 알칼리게네스속(*Alcaligenes*), 델프트리아속(*Delftia*), 버크홀데리아속(*Burkholderia*), 랄스토니아속(*Ralstonia*), 로도코쿠스속(*Rhodococcus*), 고도니아속(*Gordonia*), 로도박터속(*Rhodobacter*), 파라코쿠스속(*Paracoccus*), 리켓시아속(*Rickettsia*), 카울로박터속(*Caulobacter*), 메틸로박테리움속(*Methylobacterium*), 아조리조비움속(*Azorhizobium*), 아그로박테리움속(*Agrobacterium*), 라이조븀속(*Rhizobium*), 시노리조븀속(*Sinorhizobium*), 리켓시아속(*Rickettsia*), 크레나케오타속(*Crenarchaeota*), 시네코사이스티스속(*Synechocystis*), 엑토티오호도스피라속(*Ectothiorhodospira*), 티오캡사속(*Thiocapsa*), 티오사이스티스속(*Thyocystis*) 및 알로크로마티움속(*Allochromatium*), 클래스 2 버크홀데리아속(*Burkholderia*) 및 슈도모나스속(*Pseudomonas*), 또는 클래스 4 바실루스속(*Bacillus*)으로부터의 PHA 신타제, 보다 바람직하게는 클래스 1 아시네토박터(*Acinetobacter*) sp. RA3849, 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*), 지느러미적병(*Aeromonas punctata*) FA440, 솔방울병(*Aeromonas hydrophila*), 크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. 61-3, 주글레아 라미제라(*Zoogloea ramigera*), 알칼리게네스 라투스(*Alcaligenes latus*), 알칼리게네스(*Alcaligenes*) sp. SH-69, 델프트리아 아시도보란스(*Delftia acidovorans*), 버크홀데리아(*Burkholderia*) sp. DSMZ9242, 랄스토니아 유트로피아(*Ralstonia eutrophia*) H1 6, 버크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*), 로도코쿠스 루버(*Rhodococcus rubber*) PP2, 고르도니아 루브리퍼팅쿠스(*Gordonia rubripertinctus*), 리켓시아 프로와제키(*Rickettsia prowazekii*), 시네코사이스티스(*Synechocystis*) sp. PCC6803, 엑토티오호도스피라 샤포쉬니코비(*Ectothiorhodospira shaposhnikovii*) N1, 티오캡사 페니기(*Thiocapsa pfennigii*) 9111, 알로크로마티움 비노숨(*Allochromatium vinosum*) D, 티오사이스티스 비올라세아(*Thyocystis violacea*) 2311, 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*), 파라코쿠스 데니트리피칸스(*Paracoccus denitrificans*), 로도박터 캡슐라투스(*Rhodobacter capsulatus*), 카울로박터 크레센투스(*Caulobacter crescentus*), 메틸로박테리움 엑스토퀸스(*Methylobacterium extorquens*), 아조리조븀 카울리노단스(*Azorhizobium caulinodans*), 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 시노리조븀 멜리로티(*Sinorhizobium meliloti*) 41, 로도스피릴룸 루브룸(*Rhodospirillum rubrum*) HA, 및 로도스피릴룸 루브룸(*Rhodospirillum rubrum*) ATCC25903, 클래스 2 버크홀데리아 캐리오필리(*Burkholderia caryophylli*), 슈도모나스 클로라피스(*Pseudomonas chloraphis*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. 61-3, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) U, 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 레지노보란스(*Pseudomonas resinovorans*), 슈도모나스 스투트제리(*Pseudomonas stutzeri*), 슈도모나스 멘도시나(*Pseudomonas mendocina*), 슈도모나스 슈돌칼리게네스(*Pseudomonas pseudocaligenes*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) BM01, 슈도모나스 니트로레듀신스(*Pseudomonas nitroreducens*), 슈도모나스 클로라피스(*Pseudomonas chloraphis*), 및 클래스 4 바실루스 메가테리움(*Bacillus megaterium*) 및 바실루스(*Bacillus*) sp. INT005를 포함하는 그룹으로부터의 PHA 신타제이다.
- [0429] 다른 실시양태에서, 폴리머 신타제는 그람-음성 및 그람-양성 유박테리아(eubacteria)로부터의 PHA 폴리머 신타제 또는 원시세균류(archaea)로부터의 PHA 폴리머 신타제이다.
- [0430] 여러 실시예에서, 폴리머 신타제는 각각 쿠프리아비두스 네카토(*C. necator*), 녹농균(*P. aeruginosa*), 에이. 비노숨(*A. vinosum*), 바실루스 메가테리움(*B. megaterium*), 할로아르쿨라 마리스모르투이(*H. marismortui*), 슈도모나스 아우레오파시엔스(*P. aureofaciens*), 또는 슈도모나스 푸티다(*P. putida*)(등록번호 AY836680,

AE004091, AB205104, AF109909, YP137339, AB049413 및 AF150670)로부터의 PHA 폴리머 신타제를 포함한다.

[0431]

본 발명에 사용하기에 적당한 다른 폴리머 신타제로는 각각이 하기 유기체들로부터 등록번호로 확인되는 폴리머 신타제가 포함된다: 알. 유트로파(*R. eutropha*) (A34341), 티. 프페니기(*T. pfennigii*) (X93599), 에이. 평타타(*A. punctata*) (032472), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. 61-3 (AB014757 및 AB014758), 알. 스페로이데스(*R. sphaeroides*) (AAA72004), 시. 비올라세움(*C. violaceum*) (AAC69615), 에이. 보르쿠멘시스(*A. borkumensis*) SK2 (CAL17662), 에이. 보르쿠멘시스(*A. borkumensis*) SK2 (CAL16866), 알. 스페로이데스(*R. sphaeroides*) KD131 (ACM01571 및 YP002526072), 알. 오파쿠스(*R. opacus*) B4 (BAH51880 및 YP002780825), 비. 멀티보란스(*B. multivorans*) ATCC 17616 (YP001946215 및 BAG43679), 에이. 보르쿠멘시스(*A. borkumensis*) SK2(YP693934 및 YP693138), 알. 루브룸(*R. rubrum*) (AAD53179), 감마 프로테오박테리움(*gamma proteobacterium*) HTCC5015 (ZP05061661 및 EDY86606), 아조아르쿠스(*Azoarcus*) sp. BH72 (YP932525), 시. 비올라세움(*C. violaceum*) ATCC 12472 (NP902459), 림노박터(*Limnobacter*) sp. MED105 (ZP01915838 및 EDM82867), 엠. 알기콜라(*M. algicola*) DG893 (ZP01895922 및 EDM46004), 알. 스페로이데스(*R. sphaeroides*) (CAA65833), 시. 비올라세움(*C. violaceum*) ATCC 12472 (AAQ60457), 에이. 라투스(*A. latus*) (AAD10274, AAD01209 및 AAC83658), 에스. 말토폴라(*S. maltophilia*) K279a (CAQ46418 및 YP001972712), 알. 솔라나세아룸(*R. solanacearum*) IP01609 (CAQ59975 및 YP002258080), 비. 멀티보란스(*B. multivorans*) ATCC 17616 (YP001941448 및 BAG47458), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. gl13 (ACJ02400), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. gl06 (ACJ02399), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. gl01 (ACJ02398), R. sp. gl32 (ACJ02397), 알. 레구미노사룸(*R. leguminosarum*) bv. 비시애(*viciae*) 3841 (CAK10329 및 YP770390), 아조아르쿠스(*Azoarcus*) sp. BH72 (CAL93638), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. LDC-5 (AAV36510), 엘. 니트로페룸(*L. nitroferum*) 2002 (ZP03698179), 타우에라(*Thauera*) sp. MZ1T (YP002890098 및 ACR01721), 엠. 라디오톨레란스(*M. radiotolerans*) JCM 2831 (YP001755078 및 ACB24395), 메틸로박테리움(*Methylobacterium*) sp. 4-46 (YP001767769 및 ACA15335), 엘. 니트로페룸(*L. nitroferum*) 2002 (EEG08921), 피. 데니트리피칸스(*P. denitrificans*) (BAA77257), 엠. 그리피스발덴세(*M. gryphiswaldense*) (ABG23018), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. USM4-55 (ABX64435 및 ABX64434), 에이. 하이드로필라(*A. hydrophila*) (AAT77261 및 AAT77258), 바실루스(*Bacillus*) sp. INT005 (BAC45232 및 BAC45230), 피. 푸티다(*P. putida*) (AAM63409 및 AAM63407), 지. 루브리페르틴투스(*G. rubripertinctus*) (AAB94058), 비. 메가테리움(*B. megaterium*) (AAD05260), 디. 아시도보란스(*D. acidovorans*) (BAA33155), 피. 세리니필루스(*P. seriniphilus*) (ACM68662), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. 14-3 (CAK1 8904), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. LDC-5 (AAAX1 8690), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. PC17 (ABV25706), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. 3Y2 (AAV35431, AAV35429 및 AAV35426), 피. 멘도시나(*P. mendocina*) (AAM10546 및 AAM10544), 피. 니트로레두센스(*P. nitroreducens*) (AAK19608), 피. 슈도알칼리게네스(*P. pseudoalcaligenes*) (AAK1 9605), 피. 레지노보란스(*P. resinovorans*) (AAD26367 및 AAD26365), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. USM7-7 (ACM90523 및 ACM90522), 피. 플루오레스세스(*P. fluoresces*) (AAP58480) 및 다른 미배양 박테리아 (BAE02881, BAE02880, BAE02879, BAE02878, BAE02877, BAE02876, BAE02875, BAE02874, BAE02873, BAE02872, BAE02871, BAE02870, BAE02869, BAE02868, BAE02867, BAE02866, BAE02865, BAE02864, BAE02863, BAE02862, BAE02861, BAE02860, BAE02859, BAE02858, BAE02857, BAE07146, BAE07145, BAE07144, BAE07143, BAE07142, BAE07141, BAE07140, BAE07139, BAE07138, BAE07137, BAE07136, BAE07135, BAE07134, BAE07133, BAE07132, BAE07131, BAE07130, BAE07129, BAE07128, BAE07127, BAE07126, BAE07125, BAE07124, BAE07123, BAE07122, BAE07121, BAE07120, BAE07119, BAE07118, BAE07117, BAE07116, BAE07115, BAE07114, BAE07113, BAE07112, BAE07111, BAE07110, BAE07109, BAE07108, BAE07107, BAE07106, BAE07105, BAE07104, BAE07103, BAE07102, BAE07101, BAE07100, BAE07099, BAE07098, BAE07097, BAE07096, BAE07095, BAE07094, BAE07093, BAE07092, BAE07091, BAE07090, BAE07089, BAE07088, BAE07053, BAE07052, BAE07051, BAE07050, BAE07049, BAE07048, BAE07047, BAE07046, BAE07045, BAE07044, BAE07043, BAE07042, BAE07041, BAE07040, BAE07039, BAE07038, BAE07037, BAE07036, BAE07035, BAE07034, BAE07033, BAE07032, BAE07031, BAE07030, BAE07029, BAE07028, BAE07027, BAE07026, BAE07025, BAE07024, BAE07023, BAE07022, BAE07021, BAE07020, BAE07019, BAE07018, BAE07017, BAE07016, BAE07015, BAE07014, BAE07013, BAE07012, BAE07011, BAE07010, BAE07009, BAE07008, BAE07007, BAE07006, BAE07005, BAE07004, BAE07003, BAE07002, BAE07001, BAE07000, BAE06999, BAE06998, BAE06997, BAE06996, BAE06995, BAE06994, BAE06993, BAE06992, BAE06991, BAE06990, BAE06989, BAE06988, BAE06987, BAE06986, BAE06985, BAE06984, BAE06983, BAE06982, BAE06981, BAE06980, BAE06979, BAE06978, BAE06977, BAE06976, BAE06975, BAE06974, BAE06973, BAE06972, BAE06971, BAE06970, BAE06969, BAE06968, BAE06967, BAE06966, BAE06965, BAE06964, BAE06963, BAE06962, BAE06961, BAE06960, BAE06959, BAE06958,

BAE06957, BAE06956, BAE06955, BAE06954, BAE06953, BAE06952, BAE06951, BAE06950, BAE06949, BAE06948, BAE06947, BAE06946, BAE06945, BAE06944, BAE06943, BAE06942, BAE06941, BAE06940, BAE06939, BAE06938, BAE06937, BAE06936, BAE06935, BAE06934, BAE06933, BAE06932, BAE06931, BAE06930, BAE06929, BAE06928, BAE06927, BAE06926, BAE06925, BAE06924, BAE06923, BAE06922, BAE06921, BAE06920, BAE06919, BAE06918, BAE06917, BAE06916, BAE06915, BAE06914, BAE06913, BAE06912, BAE06911, BAE06910, BAE06909, BAE06908, BAE06907, BAE06906, BAE06905, BAE06904, BAE06903, BAE06902, BAE06901, BAE06900, BAE06899, BAE06898, BAE06897, BAE06896, BAE06895, BAE06894, BAE06893, BAE06892, BAE06891, BAE06890, BAE06889, BAE06888, BAE06887, BAE06886, BAE06885, BAE06884, BAE06883, BAE06882, BAE06881, BAE06880, BAE06879, BAE06878, BAE06877, BAE06876, BAE06875, BAE06874, BAE06873, BAE06872, BAE06871, BAE06870, BAE06869, BAE06868, BAE06867, BAE06866, BAE06865, BAE06864, BAE06863, BAE06862, BAE06861, BAE06860, BAE06859, BAE06858, BAE06857, BAE06856, BAE06855, BAE06854, BAE06853 및 BAE06852).

- [0432] 여러 실시양태에서, 폴리머 신타제는 기질 (R)-히드록시아실-CoA 또는 다른 CoA 티오에스테르 또는 이들의 유도체들을 중합하거나 또는 이들 중합을 용이하게 함으로써, 폴리머 입자들의 시험관내 제조에 사용될 수 있다.
- [0433] 여러 실시양태에서, 기질 또는 기질 혼합물들은 1 이상의 선택적으로 치환된 아미노산, 락테이트, 에스테르 또는 포화 또는 불포화 지방산, 바람직하게는 아세틸-CoA를 포함한다.
- [0434] 여러 실시양태에서, 발현 구조물은 높은 복제수에 있다.
- [0435] 여러 실시양태에서, 발현 구조물은 추가의 폴리펩티드를 코딩하는 1 이상의 핵산 서열을 포함한다.
- [0436] 여러 실시양태에서, 상기 구조물은 하기를 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다:
- [0437] (i) 1 이상의 티올라제, 또는
- [0438] (ii) 1 이상의 리덕타제, 또는
- [0439] (iii) (i)와 (ii) 둘다.
- [0440] 여러 실시양태에서, 상기 구조물은 하기를 코딩하는 핵산을 포함한다:
- [0441] (i) 1 이상의 티올라제,
- [0442] (ii) 1 이상의 리덕타제,
- [0443] (iii) 1 이상의 폴리머 신타제;
- [0444] (iv) 번역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원, 또는
- [0445] (v) 번역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원에 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역,
- [0446] (vi) 1 이상의 상기 (i) 내지 (v)를 포함하는 융합 단백질,
- [0447] (vii) 상기 (i) 내지 (vi)의 조합.
- [0448] 여러 실시양태에서, 상기 구조물은 하기를 코딩하는 핵산을 포함한다:
- [0449] (i) 1 이상의 티올라제,
- [0450] (ii) 1 이상의 리덕타제,
- [0451] (iii) 1 이상의 폴리머 신타제,
- [0452] (iv) 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원, 또는
- [0453] (v) 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역,
- [0454] (vi) 1 이상의 상기 (i) 내지 (v)를 포함하는 융합 단백질,
- [0455] (vii) 상기 (i) 내지 (vi)의 조합.
- [0456] 여러 실시양태에서, 입자-형성 단백질을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열은 강한 프로모터에 조작가능하게 연결된다.
- [0457] 여러 실시양태에서, 강한 프로모터는 바이러스성 프로모터 또는 파아지 프로모터이다.

- [0458] 여러 실시양태에서, 프로모터는 과아지 프로모터, 예를 들면 T7 과아지 프로모터이다.
- [0459] 여러 실시양태에서, 숙주 세포는 입자-형성 단백질의 기질, 바람직하게는 폴리머 신타제의 기질(존재하는 경우), 또는 기질 혼합물(모노머 기질 포함), 또는 입자-형성 단백질의 기질을 형성하기 위해 숙주세포에 의해 대사작용될 수 있는 전구체 기질의 존재하에 유지된다.
- [0460] 여러 실시양태에서, 숙주 세포는 2 이상의 상이한 발현 구조물들을 포함한다.
- [0461] 숙주 세포가 2 이상의 상이한 발현 구조물들을 포함하는, 여러 실시양태에서, 발현 구조물 중 하나는:
- [0462] 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0463] 입자-크기 결정 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물, 또는
- [0464] 폴리머 조절제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물
- [0465] 을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0466] 여러 실시양태에서, 융합 폴리펩티드에 대하여 코딩하는 핵산 서열은 하기를 포함한다:
- [0467] 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산 서열의 5' 또는 3' 말단과 인접한, 피험체에 세포-매개 반응을 유도하거나, 또는 피험체에 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원에 결합할 수 있는 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열; 또는
- [0468] 원하는 길이의 폴리뉴클레오티드 링커 또는 스페이서 서열을 통해, 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산 서열의 5' 또는 3' 말단과 간접적으로 융합된, 피험체에 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역 또는 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원을 코딩하는 핵산 서열; 또는
- [0469] 선택적으로 원하는 길이의 폴리뉴클레오티드 링커 또는 스페이서 서열을 통해, 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열로 삽입된 피험체에 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역 또는 피험체에 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원을 코딩하는 핵산 서열; 또는
- [0470] 피험체에 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역 또는 피험체에 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원을 코딩하는 핵산 서열과 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산 서열 사이에 개재된 프로테아제 분해 부위를 코딩하는 핵산 서열; 또는
- [0471] 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역 또는 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원을 코딩하는 핵산 서열과 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산 서열 사이에 개재된 자가-스플라이싱 요소를 코딩하는 핵산 서열; 또는
- [0472] 이들 중 2 이상의 조합.
- [0473] 여러 실시양태에서, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 하기를 포함한다:
- [0474] 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 포함하는 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단과 인접한, 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원을 포함하고, 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원과 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 아미노산 서열; 또는
- [0475] 원하는 길이의 펩티드 링커 또는 스페이서 서열을 통해, 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 포함하는 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단과 간접적으로 융합된, 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원에 결합할 수 있는 결합 영역 또는 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원을 포함하는 아미노산 서열; 또는
- [0476] 원하는 길이의 펩티드 링커 또는 스페이서 서열을 통해, 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 포함하는 아미노산서열에 삽입된, 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원에 결합할 수 있는 결합 영역, 또는 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원을 포함하는 아미노산 서열; 또는
- [0477] 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원에 결합할 수 있는 결합 영역, 또는 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원을 포함하는 아미노산 서열과 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 코딩하는 아미노산 서열 사이에 개재된 프로테아제 분해 부위를 포함하는 아미노산 서열; 또는
- [0478] 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원에 결합할 수 있는 결합 영역 또는 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 항원을 포함하는 아미노산 서열과, 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 코딩하는 아미노산 서열 사

이에 개제된 자가-스플라이싱 요소를 포함하는 아미노산 서열; 또는

- [0479] 이들 중 2 이상의 조합.
- [0480] 여러 실시양태에서, 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 하기를 포함한다:
- [0481] 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 5' 또는 3' 말단과 인접한 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원 또는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열; 또는
- [0482] 원하는 길이의 폴리뉴클레오티드 링커 또는 스페이서를 통해 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 5' 또는 3' 말단과 간접적으로 융합된 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 또는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열; 또는
- [0483] 원하는 길이의 폴리뉴클레오티드 링커 또는 스페이서 서열을 통해 선택적으로 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열로 삽입된 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 또는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열; 또는
- [0484] 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 또는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열과 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열 사이에 개제된 프로테아제 분해 부위를 코딩하는 핵산 서열; 또는
- [0485] 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 또는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산 서열과 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열 사이에 개제된 자가-스플라이싱 요소를 코딩하는 핵산 서열; 또는
- [0486] 이들 중 2 이상의 조합.
- [0487] 여러 실시양태에서, 1 이상의 융합 폴리펩티드는 하기를 포함한다:
- [0488] 입자-형성 단백질을 포함하는 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단과 인접한 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 또는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 포함하는 아미노산 서열; 또는
- [0489] 원하는 길이의 펩티드 링커 또는 스페이서 서열을 통해 입자-형성 단백질을 포함하는 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단과 간접적으로 융합된 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 또는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 포함하는 핵산 서열; 또는
- [0490] 원하는 길이의 펩티드 링커 또는 스페이서 서열을 통해 입자-형성 단백질을 포함하는 아미노산 서열에 삽입된 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 또는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 포함하는 아미노산 서열; 또는
- [0491] 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 또는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 포함하는 아미노산 서열과 입자-형성 단백질을 코딩하는 아미노산 서열 사이에 개제된 프로테아제 분해 부위를 포함하는 아미노산 서열; 또는
- [0492] 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 또는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역을 포함하는 아미노산 서열과 입자-형성 단백질을 코딩하는 아미노산 서열 사이에 개제된 자가-스플라이싱 요소를 포함하는 아미노산 서열; 또는
- [0493] 이들 중 2 이상의 조합.
- [0494] 여러 실시양태에서, 발현 구조물은 구성적 또는 조절가능한 프로모터 시스템을 포함한다.
- [0495] 여러 실시양태에서, 조절가능한 프로모터 시스템은 유도성 또는 억제가능한 프로모터 시스템이다.
- [0496] 여러 실시양태에서, 조절가능한 프로모터 시스템은 *Lad*, *Trp*, *파아지* γ 및 *파아지* RNA 폴리머라제로부터 선택된다.
- [0497] 한 실시양태에서, 프로모터는 당 분야에 통상의 기술을 가진 자에게 공지된 강한 프로모터이다. 적당한 강한 프로모터는 아데노바이러스 프로모터, 예를 들면 아데노바이러스 메이저 레이트 프로모터(adenoviral major late promoter); 또는 이중 프로모터, 예를 들면, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus, CMV) 프로모터; 호흡기 세포 융합 바이러스(respiratory syncytial virus, RSV) 프로모터; 시미안 바이러스(simian virus) 40 (SV40) 프로모터; 유도성 프로모터, 예를 들면 MMT 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터(metallothionein promoter); 열충격 프로모터; 알부민 프로모터; ApoAI 프로모터; 인간 글로빈 프로모터; 바이러스성 티미딘 키나제 프로모터, 예를 들면 단순포진 티미딘 키나제 프로모터(Herpes simplex thymidine kinase promoter); 레트로바이러스성

(retroviral) LTRs; b-액틴(actin) 프로모터; 인간성장호르몬 프로모터; 파아지 프로모터, 예를 들면 T7, SP6 및 T3 RNA 폴리머라제 프로모터 및 꽃양배추 모자이크(cauliflower mosaic) 35 S (CaMV 35S) 프로모터를 포함한다.

- [0498] 여러 실시양태에서, 프로모터는 T7 RNA 폴리머라제 프로모터, 예를 들면, WO 2007/037706로 공개된 PCT/NZ2006/000251에 개시되어 있는 T7 RNA 폴리머라제 프로모터이다.
- [0499] 여러 실시양태에서, 세포는 상이한 융합 폴리펩티드를 각각 코딩하는 2 이상의 상이한 발현 구조물들을 포함한다.
- [0500] 여러 실시양태에서, 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원은 세포내 병원체로부터 유도된 항원이다.
- [0501] 여러 실시양태에서, 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원은,
- [0502] 마이코박테리움(Mycobacterium)[예컨대, 마이코박테리움 보비스(M. bovis), 마이코박테리움 투버쿨로시스(M. tuberculosis), 마이코박테리움 레프래(M. leprae), 마이코박테리움 칸사시이(M. kansasii), 마이코박테리움 아비움(M. avium), 마이코박테리움 아비움 파라투버쿨로시스(M. avium paratuberculosis), 마이코박테리움종], 리스테리아(Listeria)[예컨대, 리스테리아 모노사이토겐스(L. monocytogenes), 리스테리아종], 살모넬라(Salmonella)[예컨대, 살모넬라 티파이(S. typhi)], 예시니아(Yersinia)[예컨대, 예시니아 페스티스(Y. pestis), 예시니아 엔테로콜리티카(Y. enterocolitica), 예시니아 슈도투버쿨로시스(Y. pseudotuberculosis)], 바실러스 안트라시스(Bacillus anthracis), 레지오넬라(Legionella)[예컨대, 레지오넬라 뉴모필라(L. pneumophila), 레지오넬라 롱베아캐(L. longbeachae), 레지오넬라 보제마니이(L. bozemanii), 레지오넬라종], 리케치아(Rickettsia)[예컨대, 리케치아 리케치이(R. rickettsii), 리케치아 아카리(R. akari), 리케치아 코노리이(R. conorii), 리케치아 시베리카(R. siberica), 리케치아 아우탈리스(R. australis), 리케치아 자포니카(R. japonica), 리케치아 아프리카(R. africae), 리케치아 프로와제키이(R. prowazekii), 리케치아 티파이(R. typhi), 리케치아종], 클라미디아(Chlamydia)[예컨대, 클라미디아 뉴모니아(C. pneumoniae), 클라미디아 트라코마티스(C. trachomatis), 클라미디아종], 클라미도필라(Chlamydia)[예컨대, 클라미도필라 시타시(C. psittaci), 클라미도필라 아보르투스(C. abortus)], 스트렙토코커스(Streptococcus)[예컨대, 스트렙토코커스 뉴모니아(S. pneumoniae), 스트렙토코커스 표케네스(S. pyogenes), 스트렙토코커스 아갈락티에(S. agalactiae)], 메티실린 저항성 스탕필로코커스 아우레우스(Methicillin resistant Staphylococcus aureus, MRSA)를 포함하는 스탕필로코커스(Staphylococcus)[스타필로코커스 아우레우스(S. aureus)], 에를리키아(Ehrlichia)[예컨대, 에를리키아 차프렌시스(E. chaffeensis), 에를리키아파고사이토피라 제노군(Ehrlichia phagocytophila geno group), 에를리키아종], 콕시엘라 부르네티이(Coxiella burnetii), 리슈마니아종(Leishmania sp.), 톡스플라스마 곤디이(Toxoplasma gondii), 트리파노소마 크루지(Trypanosoma cruzi), 히스토플라스마종(Histoplasma sp.), 프란시셀라 툴라렌시스(Francisella tularensis), 및 C형 간염 바이러스, 아데노바이러스(Adenoviruses), 콕사키바이러스(coxsackievirus), A형 간염 바이러스, 폴리오바이러스(poliovirus)를 포함하는 피코르나바이러스(Picornaviruses), 에프스테인-바 바이러스(epstein-barr virus), 헤르페스 심플렉스 타입 1, 헤르페스 심플렉스 타입 2, 사람 사이토메갈로바이러스(human cytomegalovirus), 사람 헤르페스바이러스 타입 8, 바리셀라-조스테르 바이러스(varicella-zoster virus)를 포함하는 헤르페스바이러스(Herpesviruses), B형 간염 바이러스를 포함하는 헤파드나바이러스(Hepadnaviruses), C형 간염 바이러스, 황열 바이러스(yellow fever virus), 땡기 바이러스(dengue virus)를 포함하는 플라비바이러스(Flaviviruses), 웨스트 나일 바이러스(West Nile virus), 사람 면역결핍 바이러스(HIV)를 포함하는 레트로바이러스(Retroviruses), 인플루엔자 바이러스(influenza virus)를 포함하는 오르토믹소바이러스(Orthomyxoviruses), 홍역 바이러스(measles virus), 볼거리 바이러스(mumps virus), 파라인플루엔자 바이러스(parainfluenza virus), 호흡기 세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus)를 포함하는 파라믹소바이러스(Paramyxoviruses), 파필로마바이러스(papillomavirus)를 포함하는 파필로마바이러스(Papillomaviruses), 라비에스 바이러스(rabies virus)를 포함하는 람도바이러스(Rhabdoviruses), 루벨라 바이러스(Rubella virus)를 포함하는 토가바이러스(Togaviruses) 및 백신니아(vaccinia), 아비폭스(avipox), 아데노-결합 바이러스(adeno-associated virus), 변형된 백신니아 스트레인 안카라(modified Vaccinia Strain Ankara), 쉼리키 포레스트 바이러스(Semliki Forest virus), 폭스바이러스(poxvirus), 코로나 바이러스를 포함하는 기타 바이러스를 포함하는 병원체 그룹으로부터 유래된 항원으로부터 선택되거나, 또는 상기 기술된 항원의 1 이상의 항원성 일부 또는 T-세포 에피토프(epitope)이다.
- [0503] 여러 실시양태에서, 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원은 조기 분비항원 타겟(ESAT)-6, Ag85A, Ag85B (MPT59),

Ag85B, Ag85C, MPT32, MPT51, MPT59, MPT63, MPT64, MPT83, MPB5, MPB59, MPB64, MTC28, Mtb2, Mtb8.4, Mtb9.9, Mtb32A, Mtb39, Mtb41, TB10.4, TB10C, TBI 1B, TB12.5, TB13A, TB14, TB15, TB15A, TB16, TB16A, TB17, TB18, TB21, TB20.6, TB24, TB27B, TB32, TB32A, TB33, TB38, TB40.8, TB51, TB54, TB64, CFP6, CFP7, CFP7A, CFP7B, CFP8A, CFP8B, CFP9, CFP10, CFP11, CFP16, CFP17, CFP19, CFP19A, CFP19B, CFP20, CFP21, CFP22, CFP22A, CFP23, CFP23A, CFP23B, CFP25, CFP25A, CFP27, CFP28, CFP28B, CFP29, CFP30A, CFP30B, CFP50, CWP32, hspX (알파-결정성), APA, 투버쿨린 정제된 단백질 유도체(PPD), ST-CF, PPE68, LppX, PstS-1, PstS-2, PstS-3, HBHA, GroEL, GroEL2, GrpES, LHP, 19kDa 리포단백질, 71kDa, RD1-ORF2, RD1-ORF3, RD1-ORF4, RD1-ORF5, RD1-ORF8, RD1-ORF9A, RD1-ORF9B, Rv1984c, Rv0577, Rv1827, BfrB, Tpx. Rv1352, Rv1810, PpiA, Cut2, FbpB, FbpA, FbpC, DnaK, FecB, Ssb, RplL, FixA, FixB, AhpC2, Rv2626c, Rv1211, Mdh, Rv1626, Adk, ClpP, SucD (Belisle et al, 2005; US 7,037,510; US 2004/0057963; US 2008/0199493; US 2008/0267990)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 항원, 또는 상기 기술된 항원의 1 이상의 항원성 일부 또는 T-세포 에피토프(epitope)이다.

[0504] 한 실시양태에서, 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원은 조기분비 항원 타겟(ESAT)-6, Ag85A, ESAT-6의 1 이상의 항원성 일부, Ag85A의 1 이상의 항원성 일부, 또는 이들 중 2 이상의 조합, 예를 들면 ESAT-6 및 Ag85A 둘다이다.

[0505] 여러 실시양태에서, 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역은 단백질, 단백질 단편, 결합 영역, 타겟-결합 영역, 결합 단백질, 결합 단백질 단편, 항체, 항체 단편, 항체 중쇄, 항체 경쇄, 단일쇄 항체, 단일-영역 항체(예를 들면, VHH), Fab 항체 단편, Fc 항체 단편, Fv 항체 단편, F(ab')₂ 항체 단편, Fab' 항체 단편, 단일쇄 Fv (scFv) 항체 단편, T-세포 수용체, MHC 클래스 I 분자, MHC 클래스 II 분자, 또는 이들의 결합체로부터 선택된다.

[0506] 예를 들면, 여러 실시양태에서, 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역은 단백질, 단백질 단편, 결합 영역, 타겟-결합 영역, 결합 단백질, 결합 단백질 단편, 항체, 항체 단편, 항체 중쇄, 항체 경쇄, 단일쇄 항체, 단일-영역 항체(예를 들면, VHH), Fab 항체 단편, Fc 항체 단편, Fv 항체 단편, F(ab')₂ 항체 단편, Fab' 항체 단편, 단일쇄 Fv (scFv) 항체 단편, T-세포 수용체, MHC 클래스 I 분자, MHC 클래스 II 분자, 또는 이들의 결합체로부터 선택된다.

[0507] 여러 실시양태에서, 조성물은 폴리머 입자들의 균일한 군집을 포함한다.

[0508] 여러 실시양태에서, 조성물은 폴리머 입자들의 혼합 군집을 포함한다.

[0509] 면역 반응은 세포-매개 면역 반응이거나, 또는 체액성 면역 반응이거나, 또는 세포-매개 면역 반응과 체액성 면역 반응 둘다의 결합체이다.

[0510] 예를 들면, 면역 반응은 큰 체액성 반응없는 세포-매개 면역 반응이다. 예를 들면, 면역 반응은 세포-매개 면역 반응, 예를 들면 큰 IgA 반응의 부재하에, 또는 큰 IgE 반응의 부재하에, 또는 큰 IgG 반응(큰 IgG1 반응, 또는 큰 IgG2 반응 포함), 또는 큰 IgM 반응의 부재하에, IFN- γ 반응으로 표시되는 반응이다.

[0511] 다른 예에서, 면역 반응은 큰 세포-매개 반응없는 체액성 반응이다.

[0512] 질병들 또는 여기에 기재된 증상의 치료 또는 예방에 효과적이 되도록 면역 반응을 유도하는 것이 본 발명의 초점이라는 것을 알 것이다. 이와 유사하게, 본 발명의 방법에 대한 피험체의 반응이 실제로 세포-매개 면역 반응과 체액성 면역 반응의 결합체가 되도록, 세포-매개 면역 반응을 유도하는 면역 반응의 주어진 성질이 도한 체액성 반응을 유도할 수도 있다는 것을 알 것이다.

[0513] 본 명세서에 개시된 숫자 범위(예를 들면 1 ~ 10)에 대한 참조번호는 그 범위내의 모든 유리수 범위(예를 들면, 1, 1.1, 2, 3, 3.9, 4, 5, 6, 6.5, 7, 8, 9 및 10) 및 그 범위내의 특정 유리수 범위(예를 들면, 2 내지 8, 1.5 내지 5.5 및 3.1 내지 4.7)에 대한 참조번호를 통합하며, 그러므로, 본 명세서에 개시된 모든 범위의 모든 하위범위들은 여기에 명확하게 개시되어 있다. 이들은 특별히 정해진 것의 예들일뿐, 단지 열거된 최저값과 최고값 사이의 모든 가능한 수치조합들은 유사한 방법으로 본 명세서에서 특별히 기술될 것으로 고려된다.

[0514] 본 발명의 또다른 측면 및 이점들은 단지 실시예의 방법에 의해 주어진 설명들을 설명하게 함으로써 분명해질 것이다.

[0515] 참고문헌이 특허 명세서, 다른 외부 문서 또는 다른 정보원인 본 명세서에서, 이는 일반적으로 본 발명의 특징

들을 설명하기 위해 문맥을 제공하기 위한 것이다. 특별히 다르게 지정하지 않는 한, 상기 외부 문서에 대한 참고는 관할내의 상기 문서들 또는 상기 정보원들이 선행 기술이거나 또는 당 분야의 통상적인 일반지식의 일부를 형성한다고 인정되는 것으로 해석되지 않는다.

도면의 간단한 설명

[0516]

본 발명의 또다른 측면은 실시예의 방법에 의해서 주어진 하기 설명들로부터, 및 첨부된 도면들을 참조하여, 분명해질 것이다.

도 1은 Hep C 폴리머 입자들에 대한 항-Hep C 항체의 결합을 나타낸다. 본 명세서의 실시예 4를 참조한다.

도 2는 간염 C에 대한 여러 폴리머 입자 백신에 의해 예방접종된 마우스내 IgG1 항체 반응을 나타낸다. EC50은 반-최대 광학밀도를 제공하는 상호혈청역가를 의미한다. 검출수준은 25이다. *는 다른 그룹에 대한 큰 차이를 나타낸다. ($p < 0.05$). 막대들은 SEM을 나타낸다. 본 명세서의 실시예 4를 참조한다.

도 3은 간염 C에 대한 여러 폴리머 입자 백신에 의해 예방접종된 마우스내 IgG2c 항체 반응을 나타낸다. EC50은 반-최대 광학밀도를 제공하는 상호혈청역가를 의미한다. 검출수준은 25이다. *는 다른 그룹에 대한 큰 차이를 나타낸다. ($p < 0.05$). 막대들은 SEM을 나타낸다. 본 명세서의 실시예 4를 참조한다.

도 4는 간염에 대한 여러 폴리머 입자 백신에 의해 예방접종된 마우스내 IFN- γ 반응을 나타낸다. *는 다른 그룹에 대한 큰 차이를 나타낸다. ($p < 0.05$). 막대들은 SEM을 나타낸다. 본 명세서의 실시예 4를 참조한다.

도 5는 Ag85A-ESAT-6을 나타내는 폴리머 입자 0-90 μ g 또는 제조함 Ag85A-ESAT-6 30 μ g에 의해 3회 예방접종받은 마우스내 항체 반응을 나타낸다. *는 PBS 예방접종된 대조군보다 매우 큰 반응을 나타낸다. ($p < 0.01$). **는 다른 모든 백신군보다 매우 큰 반응을 나타낸다 ($p < 0.01$). 본 명세서의 실시예 5를 참조한다.

도 6은 30 μ g의 야생형 폴리머 입자들, Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자들, Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자들(Emulsigen 가짐)에 의해 3회 예방접종되거나 또는 예방접종되지 않은 마우스내의 항체 반응을 나타낸다. *는 PBS 예방접종된 대조군보다 매우 큰 반응을 나타낸다 ($p < 0.01$). **는 다른 모든 백신군보다 매우 큰 반응을 나타낸다 ($p < 0.01$). 본 명세서의 실시예 5를 참조한다.

도 7은 Ag85A-ESAT-6을 표시하는 0-90 μ g 폴리머 입자들 또는 30 μ g 제조함 Ag85A-ESAT-6에 의해 3회 예방접종된 마우스내의 IFN- γ 반응을 나타낸다. *는 PBS 예방접종된 대조군보다 매우 큰 반응을 나타낸다 ($p < 0.01$). **는 다른 모든 백신군보다 매우 큰 반응을 나타낸다 ($p < 0.01$). 본 명세서의 실시예 5를 참조한다.

도 8은 30 μ g의 야생형 폴리머 입자들, Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자들, Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자들(Emulsigen 가짐)에 의해 3회 예방접종되거나 또는 예방접종되지 않은 마우스내의 IFN- γ 반응을 나타낸다. *는 PBS 예방접종된 대조군보다 매우 큰 반응을 나타낸다 ($p < 0.01$). **는 다른 모든 백신군보다 매우 큰 반응을 나타낸다 ($p < 0.01$). 본 명세서의 실시예 6을 참조한다.

도 9는 Ag85a-ESAT-6 폴리머 입자들에 대한 항-ESAT-6 항체의 결합을 나타낸다. 본 명세서의 실시예 5를 참조한다.

도 10은 여러 폴리머 입자 백신들에 의해 마우스를 백신화한후 마이크로박테리움 보비스(M. bovis)로 도전된 폐배양 결과를 나타낸다. *는 비백신화군과 통계적인 차이를 나타낸다 ($p < 0.05$). 막대들은 SEM을 나타낸다. 본 명세서의 실시예 6을 참조한다.

도 11은 여러 폴리머 입자 백신들에 의해 마우스를 백신화한후의 비장 배양 결과를 나타낸다. *는 비백신화군과 통계적인 차이를 나타낸다 ($p < 0.05$). 막대들은 SEM을 나타낸다. 본 명세서의 실시예 6을 참조한다.

도 12는 여러 폴리머 입자 백신들에 의해 마우스를 백신화한후 마이크로박테리움 보비스(M. bovis)로 도전된 IgG1 항체 반응을 나타낸다. EC50은 반-최대 광학밀도를 제공하는 상호 혈청 역가를 의미한다. 검출 수준은 25이다. *는 다른 군들과 큰 차이를 나타낸다 ($p < 0.05$). 막대들은 SEM을 나타낸다. 본 명세서의 실시예 6을 참조한다.

도 13은 여러 폴리머 입자 백신들에 의해 마우스를 백신화한후 마이크로박테리움 보비스(M. bovis)로 도전된 IgG2c 항체 반응을 나타낸다. EC50은 반-최대 광학밀도를 제공하는 상호 혈청 역가를 의미한다. 검출 수준은 25이다. *는 다른 군들과 큰 차이를 나타낸다 ($p < 0.05$). 막대들은 SEM을 나타낸다. 본 명세서의 실시예 6을 참조한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0517] 본 발명은 폴리머 입자들 및 이들의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 관능화된 폴리머 입자, 예를 들면 관능화 폴리머 입자들의 제조 방법 및, 본 명세서에서 확인되거나 설명된 것들을 포함하는 병원체에 의해 야기되는 또는 병원체와 관련된 여러 질병 또는 증상의 치료 또는 예방에 사용되는 이의 용도에 관한 것이다.
- [0518] 본 발명의 관능화된 폴리머 입자들은 1 이상의 표면-결합된 융합 폴리펩티드들을 포함하며, 또한 폴리머 입자 코어로 통합 또는 흡수된 1 이상의 물질들, 표면 결합된 융합 폴리펩티드들에 결합된 1 이상의 물질들, 또는 이들의 조합을 포함할 수도 있다.
- [0519] **1. 정의**
- [0520] 용어 "코딩 영역" 또는 "오픈 리딩 프레임(ORF)"은 적당한 조절서열의 조절하에 전사 생성물 및/또는 폴리펩티드를 생성할 수 있는 게놈 DNA 서열 또는 cDNA 서열의 센스 가닥을 의미한다. 코딩 서열은 5' 해독 개시 코돈 및 3' 해독 정지 코돈의 존재에 의해 확인된다. 유전자 구조물에 삽입될때, "코딩 서열"은 프로모터 및 종결 서열들에 조작가능하게 결합될 때 발현될 수 있다.
- [0521] 본 명세서에서 사용된 용어 "포함하는"은 "적어도 일부 포함하는"을 의미한다. 용어 "포함하는"을 포함하는 본 명세서에서 각 설명을 해석할때, 상기 용어의 특징과 다른 특징들도 또한 존재할 수 있다. 관련 용어, 예를 들면 "포함하다" 및 "포함한다"는 같은 방법으로 해석된다.
- [0522] 본 명세서에 사용된 용어 "결합 제제"는 한 쪽에 결합 제제를, 다른 한 쪽에 1 이상의 물질을 결합시키기에 적당한 추가의 결합 제제 또는 1 이상의 물질을 결합시키기에 적당한 무기 또는 유기 화합물을 의미한다. 적당한 결합 제제의 예 뿐만 아니라, 본 발명의 입자들 또는 융합 단백질들의 화학적 변형에 적당한 방법들을 포함하는 이들의 용도를 위한 예시방법들은 PCT/DE2003/002799(WO 2004/020623으로 공개됨 (Bernd Rehm), 이후 참고문헌으로 통합됨)에 개시되어 있다.
- [0523] 용어 "발현 구조물"은 삽입 폴리뉴클레오티드 분자를 전사하고, 선택적으로 전사물을 폴리펩티드로 해독하는 것을 허용하는 요소들을 포함하는 유전자 구조물을 의미한다. 발현 구조물은 통상적으로 5' 내지 3' 방향으로 하기를 포함한다:
- [0524] (1) 구조물이 도입될 숙주 세포내에서 작용하는 프로모터,
- [0525] (2) 발현될 폴리뉴클레오티드, 및
- [0526] (3) 구조물이 도입될 숙주 세포에서 작용하는 종결자.
- [0527] 본 발명의 발현 구조물은 클로닝 또는 발현을 위한 복제가능한 벡터로 삽입되거나, 또는 숙주 게놈으로 통합된다.
- [0528] 본 발명에 사용하기 위해 개작되기 위해 처리할 수 있는 발현 구조물들의 예는 PCT/DE2003/002799 (WO 2004/020623 (Bernd Rehm)로 공개됨) 및 PCT/NZ2006/000251 (WO 2007/037706 (Bernd Rehm)으로 공개됨)(각각 이후에 참고문헌으로 포함됨)에 개시되어 있다.
- [0529] 본 명세서에서 사용된 용어 "폴리머 입자를 형성" 및 "폴리머 입자의 형상"은 설명된 바와 같이 입자-형성 단백질의 활성을 의미한다.
- [0530] 폴리펩티드의 "단편"은 효소적 또는 결합 활성화에 필요한 기능을 수행하고/하거나 폴리펩티드의 3차원 구조를 제공하는 폴리펩티드의 물질이다.
- [0531] 본 명세서에서 사용된 용어 "융합 폴리펩티드"는 펩티드 결합에 의해 각 아미노 및 카르복실 잔기를 통해 융합되어, 단일의 연속 폴리펩티드를 형성하는 2 이상의 아미노산 서열, 예를 들면 2 이상의 폴리펩티드 영역을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 2 이상의 아미노산 서열은 링커 또는 스페이커 또는 추가의 폴리펩티드를 통해 이들의 각 아미노 및 카르복실 말단을 통해 직접 융합 또는 간접 융합될 수 있다고 이해되어야 한다.
- [0532] 한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드를 포함하는 아미노산 서열들 중 하나는 입자-형성 단백질을 포함한다.
- [0533] 한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드를 포함하는 아미노산 서열들 중 하나는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원, 또는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역 또는 융합 인자(fusion partner)를 포함한다.
- [0534] 본 명세서에 사용된 용어 "융합 인자"는 폴리펩티드 예를 들면, 단백질 단편, 결합 영역, 타겟-결합 영역, 결합

단백질, 결합 단백질 단편, 항체, 항체 단편, 항체 중쇄, 항체 경쇄, 단일쇄 항체, 단일-영역 항체(예를 들면, VHH), Fab 항체 단편, Fc 항체 단편, Fv 항체 단편, F(ab')₂ 항체 단편, Fab' 항체 단편, 단일쇄 Fv (scFv) 항체 단편, 항체 결합 영역(예를 들면, ZZ 영역), 항원, 항원성 결정요인, 에피토프, 합텐, 면역원, 면역원 단편, 비오틴, 비오틴 유도체, 아비딘, 스트렙타비딘, 기질, 효소, 항체효소, 보조인자, 수용체, 수용체 단편, 수용체 서브유닛, 수용체 서브유닛 단편, 리간드, 억제제, 호르몬, 렉틴, 폴리히스티딘, 결합 영역, DNA 결합 영역, FLAG 에피토프, 시스테인 잔기, 라이브러리 펩티드, 리포터 펩티드, 친화도 정제 펩티드 또는 이들 중 2 이상의 조합을 의미한다.

[0535] 상기 열거된 2 이상의 폴리펩티드들은 융합 인자를 형성할 수 있다고 이해되어야 한다.

[0536] 한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드의 아미노산서열은 링커 또는 스페이서를 통해 간접 융합되며, 상기 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 폴리머 신타제-링커-면역반응을 유도할 수 있는 항원, 또는 면역 반응을 유도할 수 있는 항원-링커-폴리머 신타제, 또는 폴리머 신타제-링커-면역 반응을 유도할 수 있는 항원의 결합 영역, 또는 면역 반응을 유도할 수 있는 항원의 결합 영역-링커-폴리머 신타제 순서로 배열된다. 다른 실시양태에서, 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 폴리머 신타제-추가 폴리펩티드-면역 반응을 유도할 수 있는 항원, 또는 폴리머 신타제-추가 폴리펩티드-면역 반응을 유도할 수 있는 항원의 결합 영역, 또는 폴리머 신타제-링커-면역 반응을 유도할 수 있는 항원-추가 폴리펩티드, 또는 폴리머 신타제-링커-면역 반응을 유도할 수 있는 항원의 결합 영역-추가 폴리펩티드 순서로 배열된 추가 폴리펩티드를 통해 간접 융합되거나, 이를 포함한다. 다시, 폴리머 신타제의 N-말단 확장은 본 명세서에 분명하게 고려된다.

[0537] 면역 반응은 세포-매개 면역 반응 및 체액성 면역 반응을 포함한다.

[0538] 한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 링커 또는 스페이서를 통해 간접적으로 융합되며, 상기 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 예를 들면, 폴리머 신타제-링커-마이코박테리움 투버쿨로시스 항원, 또는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원-링커-폴리머 신타제, 또는 폴리머 신타제-링커-마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역, 또는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역-링커-폴리머 신타제 순서로 배열된다. 다른 실시양태에서, 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 폴리머 신타제-추가 폴리펩티드-마이코박테리움 투버쿨로시스 항원, 또는 폴리머 신타제-추가 폴리펩티드-마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역, 또는 폴리머 신타제-링커-마이코박테리움 투버쿨로시스 항원-추가 폴리펩티드 또는 폴리머 신타제-링커-마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역-추가 폴리펩티드 순서로 배열된 추가 폴리펩티드를 통해 간접 융합되거나, 또는 이를 포함한다. 다시, 폴리머 신타제의 N-말단 확장은 본 명세서에 분명하게 고려된다.

[0539] 본 발명에 따른 융합 폴리펩티드는 다른 폴리펩티드의 서열내에 삽입된 1 이상의 폴리펩티드 서열들을 또한 포함할 수 있다. 예를 들면, 폴리펩티드 서열, 예를 들면 프로테아제 인지 서열은 입자 결합 영역을 포함하는 단백질의 가변영역으로 삽입된다.

[0540] 편리하게도, 본 발명의 융합 폴리펩티드는 단일 핵산 서열에 의해 코딩되며, 상기 핵산 서열은 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 영역을 각각 코딩하는 2 이상의 서열들을 포함한다. 특정 실시양태에서, 2 이상의 서브서열들은 단일의 오픈 리딩 프레임으로서 "프레임으로(in frame)" 존재할 것이며, 따라서, 본 명세서에서 고려된 융합 폴리펩티드를 코딩할 것이다. 다른 실시양태에서, 2 이상의 서브서열들은 "프레임 밖에" 존재하며, 해독시에 융합 폴리펩티드가 형성되도록 리딩 프레임에서 시프트를 촉진하는 리보솜 프레임-시프트 부위 또는 다른 서열에 의해 분리된다. 다른 실시양태에서, 상기 설명된 바와 같이, 2 이상의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 영역은 추가의 폴리펩티드를 통해 간접 융합되는 곳에서, 2 이상의 서브서열들은 연속적이지 않다.

[0541] "결합 영역" 또는 "결합할 수 있는 영역"에 대한 참고는 상보결합쌍의 1/2을 의미하며, 상기 리스트로부터의 결합쌍들을 포함한다. 예를 들면, 항체-항원, 항체-항체 결합 영역, 비오틴-스트렙타비딘, 수용체-리간드, 효소-억제제 쌍들이 있다. 타겟-결합 영역은 시료내 타겟 분자를 결합할 것이며, 예를 들면 항체, 또는 항체 단편이다. 폴리펩티드-결합 영역은 폴리펩티드를 결합할 것이며, 예를 들면 항체 또는 항체 단편, 또는 수용체 또는 신호 단백질로부터의 결합 영역이다.

[0542] 결합 영역에 의해 결합되는 물질들의 예로는 단백질, 단백질 단편, 펩티드, 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편, 항체, 항체 단편, 항체 결합 영역, 항원, 항원 단편, 항원성 결정체, 에피토프, 합텐, 면역원, 면역원 단편, 약학적으로 활성인 제제, 생물학적으로 활성인 제제, 보조제 또는 이들의 2 이상의 결합체가 포함된다. 상기 물질들은 본 발명에 따라 분석된 시료내 "타겟 성분들"이다.

[0543] 따라서, "면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 영역" 및 문법적 균등물은 상보적 결합쌍의 한 성

분을 의미하는 것으로 이해될 것이며, 다른 성분은 면역 반응을 유도할 수 있는 항원이다.

- [0544] 마찬가지로, "세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 영역" 및 문법적 균등물은 상보적 결합쌍의 한 성분을 의미하는 것으로 이해될 것이며, 다른 성분은 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원이다. 예를 들면, 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 결합할 수 있는 영역(마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역이라고도 함)은 1 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원에 결합될 수 있는 영역이다.
- [0545] 따라서, "마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역"은 2 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원을 결합시킬 수 있는 영역이다.
- [0546] 본 명세서에 사용된 "마이코박테리움 투버쿨로시스 항원"은 마이코박테리움 투버쿨로시스로부터 유도된 항원이다. 마찬가지로, 다른 항원들은 이들이 유도된 유기체에 의해 확인된다.
- [0547] "면역 반응을 유도할 수 있는 항원"이라는 구절은 1 이상의 항체들 또는 1 이상의 세포들과 같은 면역 시스템의 1 이상의 제제들과 접촉될 때, 면역 시스템의 반응을 유도 또는 상향조절, 예를 들면 1 이상의 T 세포 군집에서 상향조절(예를 들면, CD8+ T-세포 또는 CD4+ T 세포 활성화 또는 수 증가), 또는 항원에 대하여 특이적인 항체들을 제조할 수 있거나, 또는 항원에 결합할 수 있는 1 이상의 1 이상의 B 세포 군집에서 상향조절, 또는 1 이상의 항체 군집들의 양 또는 활성을 증가시킬 수 있다.
- [0548] 구절 "세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원"은 면역계의 1 이상의 세포들과 접촉될 때, 면역계의 반응을 유도 또는 상향조절, 예를 들면, 증가된 CD8+ T-세포 또는 CD4+ T 세포 활성화 또는 수와 같은 1 이상의 T 세포 군집을 상향조절할 수 있는 항원을 의미한다.
- [0549] 용어 "유전자 구조물"은 폴리뉴클레오티드 분자, 보통 이중가닥 DNA를 의미하며, 이는 cDNA 분자와 같은(여기에 국한되지 않음) 다른 폴리뉴클레오티드 분자(삽입 폴리뉴클레오티드 분자)에 삽입될 수 있다. 유전자 구조물은 삽입 폴리뉴클레오티드 분자를 전사하고, 선택적으로 전사물을 폴리펩티드로 해독하는 것을 허용하는 필수 요소들을 포함할 수 있다. 삽입 폴리뉴클레오티드 분자는 숙주세포로부터 유도되거나, 또는 다른 세포 또는 유기체로부터 유도되고/되거나 재조합 폴리뉴클레오티드이다. 숙주 세포에 일단 들어가면, 유전자 구조물은 숙주 염색체 DNA에 통합된다. 한 예로, 유전자 구조물은 벡터에 결합된다.
- [0550] 용어 "숙주 세포"는 박테리아 세포, 균류 세포, 효모 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 동물 세포, 예를 들면 1) 천연 PHA 입자생성 숙주세포, 또는 2) 티올라제 및 리덕타제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구조물 및 파신을 운반하는 숙주 세포인, 포유동물 숙주세포를 의미한다. 폴리머 입자 형성에 부족한 숙주 세포를 증가시키기 위해 어떤 유전자들이 필요한 지는 숙주 세포의 유전적 형성 및 배양배지에 어떤 기질들이 제공되는지에 따라 다를 것이다.
- [0551] 본 명세서에 사용된 용어 "링커 또는 스페이서"는 2 이상의 폴리펩티드들을 코딩하는 2 이상의 핵산 서열 또는 2 이상의 폴리펩티드들에 간접 융합하는 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 링커 또는 스페이서는 길이가 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 약 100개의 아미노산 또는 뉴클레오티드이다. 다른 실시양태에서, 링커 또는 스페이서는 길이가 약 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 또는 약 1000개의 아미노산 또는 뉴클레오티드이다. 또다른 실시양태에서, 링커 또는 스페이서는 길이가 약 1 내지 약 1000개의 아미노산 또는 뉴클레오티드, 약 10 내지 약 1000개, 약 50 내지 약 1000개, 약 100 내지 약 1000개, 약 200 내지 1000개, 약 300 내지 약 1000개, 약 400 내지 약 1000개, 약 500 내지 약 1000개, 약 600 내지 약 1000개, 약 700 내지 약 1000개, 약 800 내지 약 1000개, 또는 약 900 내지 약 1000개의 아미노산 또는 뉴클레오티드이다.
- [0552] 한 실시양태에서, 링커 또는 스페이서는 제한효소 인지부위를 포함한다. 다른 실시양태에서, 링커 또는 스페이서는 프로테아제 제거 인지 서열, 예를 들면, 엔테로키나제, 트롬빈 또는 요소 Xa 인지 서열, 또는 자가-스플라이싱 요소, 예를 들면 루테인을 포함한다. 다른 실시양태에서, 링커 또는 스페이서는 융합 폴리펩티드의 독립적인 중첩을 용이하게 한다.
- [0553] 본 명세서에 사용된 용어 "혼합 군집"은 2 이상의 성분들의 군집들을 의미하며, 혼합 군집내 각 성분들의 군집은 어떤 측면에서, 혼합된 군집내 다른 성분들의 군집과 상이하다. 예를 들면, 발현 구조물의 혼합된 군집을 참고하여 사용될 때, 이는 발현 구조물의 각 군집이 그 군집의 구성원들에 의해 코딩된 융합 폴리펩티드와 관련해, 또는 구조물내에 존재하는 프로모터의 동일성과 같은 구조물의 다른 측면과 관련해 상이한 2 이상의 발현 구조물의 군집들을 의미한다. 선택적으로, 융합 폴리펩티드의 혼합된 군집을 참고하여 사용될 때, 이는 융합 폴리펩

티드의 각 군집이 폴리머 신타제와 같은 폴리펩티드와 관련하여, 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원, 또는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역, 군집이 포함하는 구성원들과 상이한 2 이상의 융합 폴리펩티드의 군집들을 의미한다. 예를 들면, 투버쿨로시스를 처리하는데 있어서의 용도 문맥에서, 융합 폴리펩티드의 혼합된 군집은 각 융합 폴리펩티드의 군집이 폴리머 신타제, 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 또는 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원 결합 영역, 군집이 포함하는 구성원들과 같은 폴리펩티드의 측면에서 상이한, 2 이상의 융합 폴리펩티드의 군집을 의미한다. 이와 유사하게, 간염 또는 인플루엔자의 문맥에서, 융합 폴리펩티드의 혼합된 군집은 융합 폴리펩티드의 각 군집이 폴리펩티드, 예를 들면 폴리머 신타제, 간염 항원, 간염 항원 결합 영역, 인플루엔자 항원 또는 인플루엔자 항원 결합 영역, 군집이 포함하는 구성원들의 측면에서 상이한 2 이상의 융합 폴리펩티드 군집들을 의미한다. 또한, 폴리머 입자들의 혼합 군집을 참고로 사용할때, 이는 군집의 구성원들이 운반하는 융합 폴리펩티드 및 융합 폴리펩티드의 측면에서 각 폴리머 입자들의 군집이 상이한 2 이상의 폴리머 입자들의 군집 또는 융합 폴리펩티드를 의미한다.

[0554] 본 명세서에 사용된 용어 "핵산"은 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드 염기 또는 천연 뉴클레오티드의 천연 유사물 또는 이의 혼합물들의 단일 가닥 또는 이중 가닥 폴리머를 의미한다. 상기 용어들은 특별히 지시하지 않는한, 특정 서열 뿐만 아니라 이 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 서로 교환하며 사용된다.

[0555] "조작가능하게-결합된"은 발현되는 서열이 프로모터, 조직-특이적 조절요소들, 일시적인 조절 요소들, 개선제, 억제제 및 종결제를 포함하는 조절 요소들의 조절하에, 위치되는 것을 의미한다.

[0556] 용어 "과잉-발현"은 보통 정상 또는 비-형질전환된 숙주 세포내 제조수준을 넘어서는 숙주 세포내 유전자 생성물의 제조를 의미한다. 전령 RNA의 수준과 관련하여 사용되는 경우, 용어 "과잉발현"은 바람직하게는, 대조군 또는 비-형질전환 세포내 숙주세포에서 통상적으로 발견된 것보다 적어도 약 3배 이상의 발현 수준을 가리킨다. 보다 바람직하게는, 발현 수준은 대조군 숙주 세포 또는 비-형질전환 세포에서 통상적으로 발견된 것보다 적어도 약 5배 이상, 약 10배 이상, 약 15배 이상, 약 20배 이상, 약 25배 이상, 약 30배 이상, 약 35배 이상, 약 40배 이상, 약 45배 이상, 약 50배 이상, 약 55배 이상, 약 60배 이상, 약 65배 이상, 약 70배 이상, 약 75배 이상, 약 80배 이상, 약 85배 이상, 약 90배 이상, 약 95배 이상, 또는 약 100배 이상이다.

[0557] mRNA 수준은 노던 블롯 분석법 및 RT-PCR(정량적 RT-PCR 포함)을 포함하는 당 분야에 통상의 기술을 가진 자들에게 공지된 여러 기술들을 사용하여 측정되며, 여기에 국한되지는 않는다.

[0558] 본 명세서에 사용된 용어 "입자-형성 단백질"은 입자 형성에 관여되는 단백질들을 의미한다. 예를 들면, 폴리머 디폴리머라제, 폴리머 조절제, 폴리머 신타제 및 입자크기-결정 단백질을 포함하는 단백질 그룹으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 입자-형성 단백질은 티올라제, 리덕타제, 폴리머 신타제 및 파신을 포함하는 그룹으로부터 선택된다. 신타제와 같은 입자-형성 단백질은 기질 또는 기질의 유도체를 중합시켜, 폴리머 입자를 형성함으로써 폴리머 입자의 형성을 촉매할 수 있다. 선택적으로, 티올라제, 리덕타제 또는 파신과 같은 입자-형성 단백질은 중합을 용이하게 함으로써 폴리머 입자의 형성을 용이하게 할 수 있다. 예를 들면, 티올라제 또는 리덕타제는 폴리머라제에 적당한 기질의 제조를 촉매할 수 있다. 파신은 형성된 폴리머 입자의 크기를 조절할 수 있다. 바람직하게는, 입자-형성 단백질은 입자 결합 영역 및 입자 형성 영역을 포함한다.

[0559] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "입자-형성 반응 혼합물"은, 숙주 세포 또는 발현 구조물이 신타제 촉매성 영역 또는 폴리머 신타제를 포함하는 경우 적어도 폴리머 신타제 기질, 숙주 세포 또는 발현 구조물이 폴리머 신타제 촉매성 영역이 아닌 입자 결합 영역 또는 다른 입자-형성 단백질을 포함하는 경우 이의 기질을 의미한다.

[0560] "입자크기-결정 단백질"은 폴리머 입자의 크기를 조절하는 단백질을 의미한다. 예를 들면, 바람직하게는 랄스토니아속(*Ralstonia*), 알칼리게네스속(*Alcaligenes*) 및 슈도모나스속(*Pseudomonas*), 보다 바람직하게는 랄스토니아 유트로파(*Ralstonia eutropha*)로부터의 파신 유전자 *phaP* 및 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*)로부터의 파신 유전자 *phaF*로부터 선택되는 파신-류 단백질 과(family)로부터 유래될 수 있다. 파신은 폴리머 입자들의 소수성 표면에 단단하게 결합하는 분자량 14~28kDa의 양쪽성 단백질이다. 이는 또한, 입자와 결합하여, 입자 크기에 영향을 미치는 다른 숙주 세포 단백질들을 포함할 수도 있다.

[0561] 용어 "병원체" 또는 "세포내 병원체" 또는 "미생물"은 이의 재생주기 또는 생명주기의 적어도 일부동안 세포질 내에 또는 엑포내에, 숙주 세포에 존재하는 유기체를 의미한다. 세포내 병원체로는 바이러스(예를 들면, CMV, HIV), 박테리아(마이코박테리움(*Mycobacterium*), 리스테리아(*Listeria*), 살모넬라(*Salmonella*), 쉬겔라

(*Shigella*), 여시니아(*Yersinia*), 브루셀라(*Brucella*), 바실루스(*Bacillus*), 레지오넬라(*Legionella*), 리켓시애(*Rickettsiae*), 클라미디아(*Chlamydia*), 클라미도필라(*Chlamydophila*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 스타필로코커스(*Staphylococcus*), 에르리키아(*Ehrlichia*), 프란시셀라(*Francisella*), 장관병원성 대장균(*enteropathogenic Escherichia coli*), 장출혈성 대장균(*enterohaemorrhagic Escherichia coli*), 원생동물(예를 들면, 톡소플라즈마(*Toxoplasma*)), 균류 및 세포내 기생동물(예를 들면, 플라스모디움(*Plasmodium*))가 포함된다.

[0562] 병원체들이 통상적으로 숙주-특이적이라는 것은 알려져 있을 것이다. 따라서, 본 발명의 방법들 및 조성물은 종-특이적 병원체를 포함한 특정 병원체에 대한 특정 숙주 종류들을 예방접종하는데 변형(사용)하기 위해 처리될 수 있다. 예를 들면, 인간은 인간-특이적 병원체, 예를 들면, 마이코박테리움(*Mycobacterium*)[예컨대, 마이코박테리움 보비스(*M. bovis*), 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*), 마이코박테리움 레프래(*M. leprae*), 마이코박테리움 칸사시이(*M. kansasii*), 마이코박테리움 아비움(*M. avium*), 마이코박테리움 아비움 파라투버쿨로시스(*M. avium paratuberculosis*), 마이코박테리움종], 리스테리아(*Listeria*)[예컨대, 리스테리아 모노사이토젠스(*L. monocytogenes*), 리스테리아종], 살모넬라(*Salmonella*)[예컨대, 살모넬라 티파이(*S. typhi*)], 여시니아(*Yersinia*)[예컨대, 여시니아 페스티스(*Y. pestis*), 여시니아 엔테로콜리타카(*Y. enterocolitica*), 여시니아 슈도투버쿨로시스(*Y. pseudotuberculosis*)], 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 레지오넬라(*Legionella*)[예컨대, 레지오넬라 뉴모필라(*L. pneumophila*), 레지오넬라 롱비치아(*L. longbeachae*), 레지오넬라 보제마니이(*L. bozemanii*), 레지오넬라종], 리케치아(*Rickettsia*)[예컨대, 리케치아 리케치이(*R. rickettsii*), 리케치아 아카리(*R. akari*), 리케치아 코노리이(*R. conorii*), 리케치아 시베리카(*R. siberica*), 리케치아 아우랄리스(*R. australis*), 리케치아 자포니카(*R. japonica*), 리케치아 아프리카(*R. africae*), 리케치아 프로와제키이(*R. prowazekii*), 리케치아 티파이(*R. typhi*), 리케치아종], 클라미디아(*Chlamydia*)[예컨대, 클라미디아 뉴모니아(*C. pneumoniae*), 클라미디아 트라코마티스(*C. trachomatis*), 클라미디아종], 클라미도필라(*Chlamydophila*)[예컨대, 클라미도필라 시타시(*C. psittaci*), 클라미도필라 아보르투스(*C. abortus*)], 스트렙토코커스(*Streptococcus*)[예컨대, 스트렙토코커스 뉴모니아(*S. pneumoniae*), 스트렙토코커스 표게네스(*S. pyogenes*), 스트렙토코커스 아갈락티애(*S. agalactiae*)], 메티실린 저항성 스타필로코커스 아우레우스(*Methicillin resistant Staphylococcus aureus*, *MRSA*)를 포함하는 스타필로코커스(*Staphylococcus*)[스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)], 에를리키아(*Ehrlichia*)[예컨대, 에를리키아 차프펜시스(*E. chaffeensis*), 에를리키아파고사이토폴라 제노군(*Ehrlichia phagocytophila* *geno group*), 에를리키아종], 콕시엘라 부르네티이(*Coxiella burnetii*), 리슈마니아종(*Leishmania* *sp.*), 톡소플라즈마 곤다이(*Toxoplasma gondii*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 히스토플라즈마종(*Histoplasma* *sp.*), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*) 및 아데노바이러스(*Adenoviruses*), 백신니아(*vaccinia*), 아비폭스(*avipox*), 아데노-결합 바이러스(*adeno-associated virus*), 변형된 백신니아 스트레인 안카라(modified *Vaccinia Strain Ankara*), 샘리키 포레스트 바이러스(*Semliki Forest virus*), 폭스바이러스(*poxvirus*) 및 헤르페스 바이러스를 포함하는 병원체에 대하여 예방접종된다.

[0563] 세포내 병원체의 다른 유전자는 넓은 숙주 특이성을 가지며, 예를 들어 브루셀라종(*Brucella* *species*)을 포함한다. 브루셀라(*Brucella*)는 그람-음성 비-운동성 비-포도 구균(*coccobacilli*)의 속이다. 브루셀라는 브루셀라 종의 원인이 된다. 다른 브루셀라종들의 예로는 브루셀라 멜리텐시스(*B. melitensis*), 브루셀라 아보르투스(*B. abortus*), 브루셀라 수이스(*B. suis*), 브루셀라 오비스(*B. ovis*), 브루셀라 핀니페디아(*B. pinnipediae*) 및 브루셀라 네오토매(*B. neotomae*)가 있다.

[0564] 다른 실시예에서, 비-인간 피험체는 종-특이적 병원체를 포함하는 병원체들에 대하여 예방접종된다. 예를 들면, 소, 까마귀 및 양 피험체들은 예를 들면, 마이코박테리움 보비스(*M. bovis*), 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*), 마이코박테리움 레프래(*M. leprae*), 마이코박테리움 칸사시이(*M. kansasii*), 마이코박테리움 아비움(*M. avium*), 마이코박테리움 아비움 파라투버쿨로시스(*M. avium paratuberculosis*) 및 다른 마이코박테리움종(*Macobacterium* *spp.*)을 포함하는 마이코박테리움종(*Mycobacterium* *spp.*)에 대하여 예방접종된다.

[0565] 따라서, "피험체"는 포유동물 동반 동물 또는 인간을 포함하는 포유류와 같은 동물이다. 대표적인 동반 동물들로는 고양이, 말 및 개가 포함된다. 대표적인 농장 가축들로는 소, 양, 사슴 및 돼지가 포함된다. 한 실시양태에서, 인간은 성인, 어린이 또는 유아이며, 면역이 저하된 성인, 어린이 또는 유아, 또는 병원체에 대하여 예방접종받은 성인, 어린이 또는 유아, 병원체에 감염된 성인, 어린이 또는 유아, 병원체에 감염될 위험 또는 병원체에 노출되는 성인, 어린이 또는 유아가 포함된다.

[0566] 용어 "치료" 및 ("치료"를 포함하는) 이의 파생어는 이들의 가장 넓은 가능한 문맥으로 해석되어야 한다. 상기

용어는 피험체가 완전히 회복될때까지 처리되는 것을 암시하는 것으로 간주되어서는 안된다. 따라서, "치료"는 넓은 의미로 증상 개시 또는 특정 증상의 심각성의 개선 및/또는 예방을 포함한다.

[0567] 본 명세서에 사용된 "폴리머 조절제"는 폴리머 입자들의 형성에 관여되는 유전자 *phaA*, *phaB* 및 *phaC*의 전사를 조절하는 단백질을 의미한다. 입자 표면에 결합함으로써 전사 조절이 취소된다. 상기 조절제의 한 예로는 랄스토니아 유트로파(*Ralstonia eutropha*) YP 725943으로부터의 파신 억제물질(*phaR*)이 있으며, 이는 형성된 폴리머 입자의 크기를 조절하고 유전자가 해독되는 것을 방지하는 발현 구조물인 파신류 유전자의 프로모터에 결합한다. 파신 억제물질은 형성된 폴리머 입자들의 표면에 결합되기 때문에, 프로모터 위의 상기 부위가 풀려져서 기본 유전자의 전사가 개시될 수 있다. 본 명세서에 사용된 "폴리머 신타제"는 기질 또는 기질 유도체를 중합하여 폴리머 입자를 형성함으로써 폴리머 입자의 형성을 촉매할 수 있는 단백질을 의미한다. >45의 다른 박테리아로부터, 1차 구조, 기질 특이성 및 서브유닛 조성(Rehm, 2007)이 상이한, 88 PHA 신타제 유전자들의 누클레오타이드 서열이 얻어졌다.

[0568] 폴리머 신타제는 폴리머 중합과 입자 코어에 대한 신타제 단백질의 부착을 매개하는 신타제 단백질의 C-말단에 서 적어도 신타제 촉매성 영역을 포함한다. 본 발명에 사용하기 위한 폴리머 신타제는 Rehm, 2003에 상세히 설명되어 있으며, 이는 이후에 참고문헌으로 전문통합된다. 예를 들면, 폴리머 신타제는 클래스 1 아시네토박터속(class 1 genera *Acinetobacter*), 비브리오속(*Vibrio*), 에어로모나스속(*Aeromonas*), 크로모박테리움(*Chromobacterium*), 슈도모나스속(*Pseudomonas*), 주글레아속(*Zoogloea*), 알칼리게네스속(*Alcaligenes*), 델프트리아속(*Delftia*), 버크홀데리아속(*Burkholderia*), 랄스토니아속(*Ralstonia*), 로도코쿠스속(*Rhodococcus*), 고도니아속(*Gordonia*), 로도박터속(*Rhodobacter*), 파라코쿠스속(*Paracoccus*), 리켓시아속(*Rickettsia*), 카울로박터속(*Caulobacter*), 메틸로박테리움속(*Methylobacterium*), 아조리조비움속(*Azorhizobium*), 아그로박테리움속(*Agrobacterium*), 라이조븀속(*Rhizobium*), 시노리조븀속(*Sinorhizobium*), 리켓시아속(*Rickettsia*), 크레나케오타속(*Crenarchaeota*), 시네킨코사이스티스속(*Synechocystis*), 엑토티오호도스피라속(*Ectothiorhodospira*), 티오캡사속(*Thiocapsa*), 티오사이스티스속(*Thyocystis*) 및 알로크로마티움속(*Allochrochromatium*), 클래스 2 버크홀데리아속(*Burkholderia*) 및 슈도모나스속(*Pseudomonas*), 또는 클래스 4 바실루스속(*Bacillus*)으로부터의 PHA 신타제, 보다 바람직하게는 클래스 1 아시네토박터(*Acinetobacter*) sp. RA3849, 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*), 지느러미적병(*Aeromonas punctata*) FA440, 솔방울병(*Aeromonas hydrophila*), 크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. 61-3, 주글레아 라미제라(*Zoogloea ramigera*), 알칼리게네스 라투스(*Alcaligenes latus*), 알칼리게네스(*Alcaligenes*) sp. SH-69, 델프트리아 아시도보란스(*Delftia acidovorans*), 버크홀데리아(*Burkholderia*) sp. DSMZ9242, 랄스토니아 유트로피아(*Ralstonia eutrophia*) H16, 버크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*), 로도코쿠스 루버(*Rhodococcus rubber*) PP2, 고르도니아 루브리퍼팅쿠스(*Gordonia rubripertinctus*), 리켓시아 프로와제키(*Rickettsia prowazekii*), 시네킨코사이스티스(*Synechocystis*) sp. PCC6803, 엑토티오호도스피라 샤포쉬니코비(*Ectothiorhodospira shaposhnikovii*) N1, 티오캡사 페니기(*Thiocapsa pfennigii*) 9111, 알로크로마티움 비노숨(*Allochrochromatium vinosum*) D, 티오사이스티스 비올라세아(*Thyocystis violacea*) 2311, 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*), 파라코쿠스 데니트리피칸스(*Paracoccus denitriβcans*), 로도박터 캡슐라투스(*Rhodobacter capsulatus*), 카울로박터 크레센투스(*Caulobacter crescentus*), 메틸로박테리움 엑스토퀸스(*Methylobacterium extorquens*), 아조리조븀 카울리노단스(*Azorhizobium caulinodans*), 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 시노리조븀 멜리로티(*Sinorhizobium meliloti*) 41, 로도스피릴럼 루브럼(*Rhodospirillum rubrum*) HA, 및 로도스피릴럼 루브럼(*Rhodospirillum rubrum*) ATCC25903, 클래스 2 버크홀데리아 캐리오펠리(*Burkholderia caryophylli*), 슈도모나스 클로라피스(*Pseudomonas chloraphis*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. 61-3, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) U, 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 레지노보란스(*Pseudomonas resinovorans*), 슈도모나스 스투트제리(*Pseudomonas stutzeri*), 슈도모나스 멘도시나(*Pseudomonas mendocina*), 슈도모나스 슈돌칼리게네스(*Pseudomonas pseudocaligenes*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) BMO1, 슈도모나스 니트로레듀신스(*Pseudomonas nitroreducins*), 슈도모나스 클로라피스(*Pseudomonas chloraphis*), 및 클래스 4 바실루스 메가테리움(*Bacillus megaterium*) 및 바실루스(*Bacillus*) sp. INT005를 포함하는 그룹으로부터의 PHA 신타제이다.

[0569] 본 발명에 사용하기에 적당한 다른 폴리머 신타제로는 각각이 하기 유기체들로부터 등록번호로 확인되는 폴리머 신타제가 포함된다: 쿠프리아비두스 네카토(*C. necator*)(AY836680), 녹농균(*P. aeruginosa*)(AE004091), 에이. 비노숨(*A. vinosum*)(AB205104), 바실루스 메가테리움(*B. megaterium*)(AF109909), 할로아르쿨라 마리스모르투이(*H. marismortui*)(YP137339), 슈도모나스 아우레오파시엔스(*P. aureofaciens*)(AB049413), 또는 슈도모나스 푸

티다(*P. putida*)(AF150670), 알. 유트로파(*R. eutropha*) (A34341), 티. 프페니기(*T. pfennigii*) (X93599), 에이. 팅타타(*A. punctata*) (032472), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. 61-3 (AB014757 및 AB014758), 알. 스페로이데스(*R. sphaeroides*) (AAA72004), 시. 비올라세움(*C. violaceum*) (AAC69615), 에이. 보르쿠멘시스(*A. borkumensis*) SK2 (CAL17662), 에이. 보르쿠멘시스(*A. borkumensis*) SK2 (CAL16866), 알. 스페로이데스(*R. sphaeroides*) KD131 (ACM01571 및 YP002526072), 알. 오파쿠스(*R. opacus*) B4 (BAH51880 및 YP002780825), 비. 멀티보란스(*B. multivorans*) ATCC 17616 (YP001946215 및 BAG43679), 에이. 보르쿠멘시스(*A. borkumensis*) SK2(YP693934 및 YP693138), 알 루브룸(*R. rubrum*) (AAD53179), 감마 프로테오박테리움(*gamma proteobacterium*) HTCC5015 (ZP05061661 및 EDY86606), 아조아르쿠스(*Azoarcus*) sp. BH72 (YP932525), 시. 비올라세움(*C. violaceum*) ATCC 12472 (NP902459), 림노박터(*Limnobacter*) sp. MED105 (ZP01915838 및 EDM82867), 엠. 알기콜라(*M. algicola*) DG893 (ZP01895922 및 EDM46004), 알. 스페로이데스(*R. sphaeroides*) (CAA65833), 시. 비올라세움(*C. violaceum*) ATCC 12472 (AAQ60457), 에이. 라투스(*A. latus*) (AAD10274, AAD01209 및 AAC83658), 에스. 말토틸라(*S. maltophilia*) K279a (CAQ46418 및 YP001972712), 알. 솔라나세아룸(*R. solanacearum*) IPO1609 (CAQ59975 및 YP002258080), 비. 멀티보란스(*B. multivorans*) ATCC 17616 (YP001941448 및 BAG47458), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. gl13 (ACJ02400), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. gl06 (ACJ02399), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. gl01 (ACJ02398), R. sp. gl32 (ACJ02397), 알. 레구미노사룸(*R. leguminosarum*) bv. 비시아(viciae) 3841 (CAK10329 및 YP770390), 아조아르쿠스(*Azoarcus*) sp. BH72 (CAL93638), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. LDC-5 (AAV36510), 엘. 니트로페룸(*L. nitroferum*) 2002 (ZP03698179), 타우에라(*Thauera*) sp. MZ1T (YP002890098 및 ACR01721), 엠. 라디오톨레란스(*M. radiotolerans*) JCM 2831 (YP001755078 및 ACB24395), 메틸로박테리움(*Methylobacterium*) sp. 4-46 (YP001767769 및 ACA15335), 엘. 니트로페룸(*L. nitroferum*) 2002 (EEG08921), 피. 데니트리피칸스(*P. denitrificans*) (BAA77257), 엠. 그리피스발덴세(*M. gryphiswaldense*) (ABG23018), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. USM4-55 (ABX64435 및 ABX64434), 에이. 하이드로필라(*A. hydrophila*) (AAT77261 및 AAT77258), 바실루스(*Bacillus*) sp. INT005 (BAC45232 및 BAC45230), 피. 푸티다(*P. putida*) (AAM63409 및 AAM63407), 지. 루브리페르틴투스(*G. rubripertinctus*) (AAB94058), 비. 메가테리움(*B. megaterium*) (AAD05260), 디. 아시도보란스(*D. acidovorans*) (BAA33155), 피. 세리니필루스(*P. seriniphilus*) (ACM68662), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. 14-3 (CAK1 8904), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. LDC-5 (AAX1 8690), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. PC17 (ABV25706), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. 3Y2 (AAV35431, AAV35429 및 AAV35426), 피. 멘도시나(*P. mendocina*) (AAM10546 및 AAM10544), 피. 니트로레두켄스(*P. nitroreducens*) (AAK19608), 피. 슈도알칼리게네스(*P. pseudoalcaligenes*) (AAK1 9605), 피. 레지노보란스(*P. resinovorans*) (AAD26367 및 AAD26365), 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp. USM7-7 (ACM90523 및 ACM90522), 피. 플루오레스세스(*P. fluoresces*) (AAP58480) 및 다른 미배양 박테리아 (BAE02881, BAE02880, BAE02879, BAE02878, BAE02877, BAE02876, BAE02875, BAE02874, BAE02873, BAE02872, BAE02871, BAE02870, BAE02869, BAE02868, BAE02867, BAE02866, BAE02865, BAE02864, BAE02863, BAE02862, BAE02861, BAE02860, BAE02859, BAE02858, BAE02857, BAE07146, BAE07145, BAE07144, BAE07143, BAE07142, BAE07141, BAE07140, BAE07139, BAE07138, BAE07137, BAE07136, BAE07135, BAE07134, BAE07133, BAE07132, BAE07131, BAE07130, BAE07129, BAE07128, BAE07127, BAE07126, BAE07125, BAE07124, BAE07123, BAE07122, BAE07121, BAE07120, BAE07119, BAE07118, BAE07117, BAE07116, BAE07115, BAE07114, BAE07113, BAE07112, BAE07111, BAE07110, BAE07109, BAE07108, BAE07107, BAE07106, BAE07105, BAE07104, BAE07103, BAE07102, BAE07101, BAE07100, BAE07099, BAE07098, BAE07097, BAE07096, BAE07095, BAE07094, BAE07093, BAE07092, BAE07091, BAE07090, BAE07089, BAE07088, BAE07053, BAE07052, BAE07051, BAE07050, BAE07049, BAE07048, BAE07047, BAE07046, BAE07045, BAE07044, BAE07043, BAE07042, BAE07041, BAE07040, BAE07039, BAE07038, BAE07037, BAE07036, BAE07035, BAE07034, BAE07033, BAE07032, BAE07031, BAE07030, BAE07029, BAE07028, BAE07027, BAE07026, BAE07025, BAE07024, BAE07023, BAE07022, BAE07021, BAE07020, BAE07019, BAE07018, BAE07017, BAE07016, BAE07015, BAE07014, BAE07013, BAE07012, BAE07011, BAE07010, BAE07009, BAE07008, BAE07007, BAE07006, BAE07005, BAE07004, BAE07003, BAE07002, BAE07001, BAE07000, BAE06999, BAE06998, BAE06997, BAE06996, BAE06995, BAE06994, BAE06993, BAE06992, BAE06991, BAE06990, BAE06989, BAE06988, BAE06987, BAE06986, BAE06985, BAE06984, BAE06983, BAE06982, BAE06981, BAE06980, BAE06979, BAE06978, BAE06977, BAE06976, BAE06975, BAE06974, BAE06973, BAE06972, BAE06971, BAE06970, BAE06969, BAE06968, BAE06967, BAE06966, BAE06965, BAE06964, BAE06963, BAE06962, BAE06961, BAE06960, BAE06959, BAE06958, BAE06957, BAE06956, BAE06955, BAE06954, BAE06953, BAE06952, BAE06951, BAE06950, BAE06949, BAE06948, BAE06947, BAE06946, BAE06945, BAE06944, BAE06943, BAE06942, BAE06941, BAE06940, BAE06939, BAE06938, BAE06937, BAE06936, BAE06935, BAE06934, BAE06933, BAE06932, BAE06931, BAE06930,

BAE06929, BAE06928, BAE06927, BAE06926, BAE06925, BAE06924, BAE06923, BAE06922, BAE06921, BAE06920, BAE06919, BAE06918, BAE06917, BAE06916, BAE06915, BAE06914, BAE06913, BAE06912, BAE06911, BAE06910, BAE06909, BAE06908, BAE06907, BAE06906, BAE06905, BAE06904, BAE06903, BAE06902, BAE06901, BAE06900, BAE06899, BAE06898, BAE06897, BAE06896, BAE06895, BAE06894, BAE06893, BAE06892, BAE06891, BAE06890, BAE06889, BAE06888, BAE06887, BAE06886, BAE06885, BAE06884, BAE06883, BAE06882, BAE06881, BAE06880, BAE06879, BAE06878, BAE06877, BAE06876, BAE06875, BAE06874, BAE06873, BAE06872, BAE06871, BAE06870, BAE06869, BAE06868, BAE06867, BAE06866, BAE06865, BAE06864, BAE06863, BAE06862, BAE06861, BAE06860, BAE06859, BAE06858, BAE06857, BAE06856, BAE06855, BAE06854, BAE06853 및 BAE06852).

- [0570] PHA 신타제 단백질의 N-말단 단편(약 아미노산 1 ~ 200, 또는 1 ~ 150, 또는 1 ~ 100)은 매우 가변적이며, 어떤 실시예에서는 폴리머 입자 결합 영역(즉, C-말단 단편)을 통해 폴리머 코어에 공유결합하는 것을 막거나, 또는 효소를 불활성화시키지 않으면서 다른 융합 인자 또는 항원, 항원 결합 영역에 의해 결실 또는 치환된다. 신타제를 결합할 수 있는 결합 영역을 갖는 폴리머 입자는 폴리머 코어의 중합 및 폴리머 입자들의 형성을 매개하는 신타제 단백질의 촉매 영역을 적어도 포함한다.
- [0571] 일부 실시양태에서, PHA 신타제 단백질의 C-말단 단편은 면역 반응을 유도할 수 있는 항원, 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역, 또는 효소를 불활성화시키거나, 또는 폴리머 입자에 신타제를 공유결합하는 것을 막지 않는 다른 융합 인자에 의해 변형, 부분적으로 결실 또는 부분적으로 치환된다.
- [0572] 특정 경우, 면역 반응을 유도할 수 있는 항원, 면역 반응을 결합시킬 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역, 또는 다른 융합 인자는 효소의 불활성화 없이, 또는 폴리머 입자의 신타제의 공유결합을 막지 않으면서 PHA 신타제 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된다. 이와 유사하게, 다른 경우에 면역 반응을 유도할 수 있는 항원, 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역, 또는 다른 융합 인자는 PHA 신타제 단백질내에 삽입되거나, 또는 입자-형성 단백질내에 삽입된다. PhaC 융합의 예는 당 분야에 공지되어 있으며, 본 명세서에 개시되어 있다.
- [0573] 한 실시예에서, PHA 신타제 단백질의 N-말단 단편(약 아미노산 1 ~ 200, 또는 1 ~ 150, 또는 1 ~ 100)은 매우 가변적이며, 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원, 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역, 간염 항원, 간염 항원 결합 영역, 인플루엔자 항원 또는 인플루엔자 항원 결합 영역 또는, 폴리머 입자에 대한 폴리머 입자 결합 영역(즉, C-말단 단편(이 영역은 소수성 상호작용을 통해 결합함))을 통한 신타제의 공유결합(공유결합은 인접한 폴리에스테르 돌출부로부터의 활성부를 통해 일어남)을 막지 않거나, 또는 효소 불활성화 없이 다른 융합 인자에 의해 결실 또는 치환된다. 신타제의 폴리머 입자 결합 영역은 폴리머 입자의 중합 및 폴리머 입자의 형성을 매개하는 신타제 단백질의 촉매성 영역을 포함한다.
- [0574] PHA 신타제 단백질의 C-말단 단편은 또한 변형될 수 있으며, 효소 불활성화없이 또는 폴리머 입자에 대한 신타제의 공유결합을 막지 않으면서, 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원, 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역, 간염 항원, 간염 항원 결합 영역, 인플루엔자 항원 또는 인플루엔자 항원 결합 또는 다른 융합 인자에 의해 부분적으로 결실 또는 부분적으로 치환될 수 있다.
- [0575] 특정 경우, 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원, 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역, 간염 항원, 간염 항원 결합 영역, 인플루엔자 항원 또는 인플루엔자 항원 결합 또는 다른 융합 인자는 효소 불활성화없이 또는 폴리머 입자에 대한 신타제의 공유결합을 막지 않으면서, PHA 신타제 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된다. 이와 유사하게, 다른 경우에, 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원, 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원 결합 영역, 간염 항원, 간염 항원 결합 영역, 인플루엔자 항원 또는 인플루엔자 항원 결합 또는 다른 융합 인자는 PHA 신타제 단백질내에 삽입되거나, 또는 입자-형성 단백질내에서 확인된다. PhaC 융합의 예는 당 분야에 공지되어 있으며, 본 명세서에 개시되어 있다.
- [0576] 본 명세서에 사용된 "폴리머 디폴리머라제"는 폴리머 입자에서 발견된 것과 같은 기존의 폴리머를 수용성 모노머 및 올리고머로 가수분해시킬 수 있는 단백질을 의미한다. 폴리머 디폴리머라제의 예들은 매우 다양한 PHA-분해 박테리아 및 균에 존재하며, 퍼시모나스 레모이그네이(*Paucimonas lemoignei*)로부터의 PhaZ1 - PhaZ7 세포외 디폴리머라제, 에이. 시도보락스 종(*A. cidovorax* sp.), 에이. 패칼리스(*A. faecalis*) (균주 AE122 및 T1), 델프티아(*Delftia*) (코마모나스(*Comamonas*)) 아시도보란스(*acidovorans*) 균주 YM 1069, 코마모나스 테스트스테로니(*Comamonas testosteroni*), 코마모나스종(*Comamonas* sp.), 랩토트릭스종(*Leptothrix* sp.) 균주 HS, 슈도모나스종(*Pseudomonas* sp.) 균주 GM101 (수탁번호 AF293347), 피.플루오레센스(*P. fluorescens*) 균주 GK13, 피.스투

체리(*P. stutzeri*), 알. 피켓티(*R. pickettii*) (균주 AI 및 K1, 수탁번호. J04223, D25315), 에스. 엑스포리아투스(*S. exfoliatus*) K10 및 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*)로부터의 PhaZ 디폴리머라제를 포함한다(Jendrossek D., and Handrick, R., *Microbial Degredation of Polyhydroxyalkanoates*, Annual Review of Microbiology, 2002, 56:403-32 참조).

[0577] 본 명세서에 사용된 용어 "폴리펩티드"는 전장 단백질을 포함하는 5 이상의 아미노산의 특정 길이의 아미노산 사슬들을 포함하며, 아미노산 잔기들은 공유 펩티드 결합에 의해 결합된다. 본 발명의 폴리펩티드는 천연 생물로부터 정제되거나, 또는 재조합기술 또는 합성기술을 사용하여 부분적으로 또는 전체적으로 생성된다. 상기 용어는 다이머 또는 다른 멀티머, 융합 폴리펩티드, 폴리펩티드 변이체 또는 이들의 유도체와 같은 폴리펩티드의 응집체, 폴리펩티드를 의미할 수 있다.

[0578] 용어 "프로모터"는 유전자 전사를 조절하는 코딩 영역의 상류의 전사되지 않은 cis-조절 요소들을 의미한다. 프로모터는 TATA 박스와 같은 컨서브 박스 및 전사 개시 부위를 특징하는 cis-개시제 요소들, 및 전사요소들에 의해 결합되는 모티프를 포함한다.

[0579] 용어 "종결자"는 전사를 종결시키는 서열을 의미하며, 이는 해독된 서열의 하류의 유전자들의 3' 해독되지 않은 단부에서 발견된다. 종결자는 mRNA 안정성의 중요한 결정요인이며, 일부 경우 공간적인 조절 기능을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0580] 폴리머 입자내에 결합된, 또는 흡수된, 또는 통합된 것과 관련하여 의미할 경우, 용어 "물질"은 폴리머 입자내에 흡수 또는 통합될 수 있는 융합 인자 또는 물질에 의해 결합된 물질을 의미하는 것으로 의도된다.

[0581] 본 명세서에 사용된 용어 "변이체"는 특별히 확인된 서열들과 상이한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열을 의미하며, 1 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기는 결실, 치환 또는 추가된다. 변이체는 자연발생 대립유전자 변이체, 또는 비-자연발생 변이체이다. 변이체들은 동일한 또는 다른 종류로부터 유래되며, 호모로고스, 파라로고스 및 오르토로고스를 포함한다. 특정 실시양태에서, 뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 변이체들은 야생형 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 활성과 같거나 또는 유사한 생물학적 활성을 가진다. 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드와 연관된 용어 "변이체"는 본 명세서에서 정의된 모든 형태의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드를 포함한다.

[0582] *폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 변이체*

[0583] 본 명세서에 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드(들)"은 특정 길이의 단일 또는 이중-가닥 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 폴리머, 바람직하게는 15 이상의 뉴클레오티드를 의미하며, 유전자의 코딩 및 비-코딩 서열, 센스 및 안티센스 서열 보체, 엑손, 인트론, 게놈 DNA, cDNA, 프리-mRNA, mRNA, rRNA, siRNA, miRNA, tRNA, 리보솜, 재조합 폴리펩티드, 분리된 및 정제된 자연발생 DNA 또는 RNA 서열, 합성 RNA 및 DNA 서열, 핵산 프로브, 프라이머 및 단편들을 포함하며, 여기에 국한되지는 않는다. 여러 핵산 유사체들은 당 분야에 잘 알려져 있으며, 또한 고려된다.

[0584] 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오티드 서열의 "단편"은 길이 15 이상의 뉴클레오티드인 것이 바람직한 인접한 뉴클레오티드의 서브서열이다. 본 발명의 단편은 바람직하게는 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 20 이상의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 30 이상의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 40 이상의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 50 이상의 뉴클레오티드 및 가장 바람직하게는 60 이상의 인접한 뉴클레오티드를 포함한다. 폴리뉴클레오티드 서열의 단편은 안티센스, 유전자 침묵(gene silencing), 트리플 헬릭스 또는 리보자임 기술에, 또는 마이크로어레이에 포함된 프라이머, 프로브로서, 또는 폴리뉴클레오티드계 선택방법에 사용될 수 있다.

[0585] 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열에 관한 용어 "단편"은 단편이 조작가능하게 결합된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절할 수 있는 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열의 영역들 및 cis-요소들을 포함하는 서열들을 포함하는 것으로 의도된다.

[0586] 바람직하게는, 본 발명의 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열의 단편은 본 발명의 프로모터 폴리뉴클레오티드의 20 이상, 보다 바람직하게는 30 이상, 보다 바람직하게는 40 이상, 보다 바람직하게는 50 이상, 보다 바람직하게는 100 이상, 보다 바람직하게는 200 이상, 보다 바람직하게는 300 이상, 보다 바람직하게는 400 이상, 보다 바람직하게는 500 이상, 보다 바람직하게는 600 이상, 보다 바람직하게는 700 이상, 보다 바람직하게는 800 이상, 보다 바람직하게는 900 및 가장 바람직하게는 1000 이상의 인접한 뉴클레오티드들을 포함한다.

[0587] 용어 "프라이머"는 주형에 교잡되고, 주형에 상보적인 폴리뉴클레오티드의 중합을 프라이밍하기 위해 사용되는,

자유 3'OH기를 갖는 짧은 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 상기 프라이머는 길이가 바람직하게는 5 이상, 보다 바람직하게는 6 이상, 보다 바람직하게는 7 이상, 보다 바람직하게는 9 이상, 보다 바람직하게는 10 이상, 보다 바람직하게는 11 이상, 보다 바람직하게는 12 이상, 보다 바람직하게는 13 이상, 보다 바람직하게는 14 이상, 보다 바람직하게는 15 이상, 보다 바람직하게는 16 이상, 보다 바람직하게는 17 이상, 보다 바람직하게는 18 이상, 보다 바람직하게는 19 이상, 보다 바람직하게는 20 이상의 뉴클레오티드이다.

[0588] 용어 "프로브"는 교잡-기반 분석법에서, 프로브에 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열을 검출하기 위해 사용되는 짧은 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 프로브는 본 명세서에 정의된 폴리뉴클레오티드의 "단편"으로 구성될 수 있다. 바람직하게는 상기 프로브는 길이가 5 이상, 보다 바람직하게는 10 이상, 보다 바람직하게는 20 이상, 보다 바람직하게는 30 이상, 보다 바람직하게는 40 이상, 보다 바람직하게는 50 이상, 보다 바람직하게는 100 이상, 보다 바람직하게는 200 이상, 보다 바람직하게는 300 이상, 보다 바람직하게는 400 이상, 및 가장 바람직하게는 500 이상의 뉴클레오티드이다.

[0589] 본 명세서에 사용된 용어 "변이체"는 특별히 확인된 서열들과 상이한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열을 의미하며, 1 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기는 결실, 치환 또는 부가된다. 변이체들은 자연발생 대립 유전자 변이체, 또는 비-자연발생 변이체들이다. 변이체들은 같은 종으로부터 또는 다른 종으로부터 유래되며, 호모로고스, 파라로고스 및 오르토로고스를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 변이체들은 야생형 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 생물학적 활성과 동일하거나 유사한 생물학적 활성을 가진다. 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드와 관련된 용어 "변이체"는 본 명세서에 정의된 모든 형태의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드들을 포함한다.

[0590] 폴리뉴클레오티드 변이체

[0591] 변이체 폴리뉴클레오티드 서열은, 바람직하게 특정 폴리뉴클레오티드 서열에 대하여, 50% 이상, 보다 바람직하게는 51% 이상, 52% 이상, 53% 이상, 54% 이상, 55% 이상, 56% 이상, 57% 이상, 58% 이상, 59% 이상, 60% 이상, 61% 이상, 62% 이상, 63% 이상, 64% 이상, 65% 이상, 66% 이상, 67% 이상, 68% 이상, 69% 이상, 70% 이상, 71% 이상, 72% 이상, 73% 이상, 74% 이상, 75% 이상, 76% 이상, 77% 이상, 78% 이상, 79% 이상, 80% 이상, 81% 이상, 82% 이상, 83% 이상, 84% 이상, 85% 이상, 86% 이상, 87% 이상, 88% 이상, 89% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 동일성을 나타낸다. 동일성은 20 이상의 뉴클레오티드 위치, 바람직하게는 50 이상의 뉴클레오티드 위치, 100 이상의 뉴클레오티드 위치의 대조창에 대하여 또는 특정 폴리뉴클레오티드 서열의 전장에 대하여 발견된다.

[0592] 폴리뉴클레오티드 서열 동일성을 하기 방법으로 측정될 수 있다. 피험체 폴리뉴클레오티드 서열은 b12seq (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250)에서, BLASTN(from the BLAST suite of programs, version 2.2.10 [Oct 2004])을 사용하여, 후보의 폴리뉴클레오티드 서열에 대조되며, 이는 NCBI (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/)에서 공개적으로 사용가능하다. b12seq의 디폴트 파라미터는 낮은 복잡도 부분의 필터링이 꺼져야 하는 것을 제외하고 사용된다.

[0593] 폴리뉴클레오티드 서열의 동일성은 하기 유닉스 커맨드 라인 파라미터(unix command line parameters)를 사용하여 조사될 수 있다:

[0594] b12seq -i 뉴클레오티드 서열1 -j 뉴클레오티드 서열2 -F F -p 블라스튼

[0595] 변수 -F F는 낮은 복잡도 섹션의 필터링을 끈다. 변수 -p는 한 쌍의 서열로부터 적당한 알고리즘을 선택한다. b12seq 프로그램은 라인 "동일성="에 있어서 동일한 뉴클레오티드의 수와 비율로 서열 동일성을 보고한다.

[0596] 폴리뉴클레오티드 서열 동일성은 광역 서열 정렬 프로그램을 사용하여 후보체와 피험체 사이의 겹치는 부분의 전체 길이에 대하여 계산될 수 있다(예를 들면, Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453).

[0597] Needleman-Wunsch 광역 정렬 알고리즘의 완전 구현은 <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/>에서 얻을 수 있는 EMBOSS 패키지 (Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Trends in Genetics June 2000, vol 16, No 6. pp.276-277)의 니들 프로그램(needle program)에서 얻어진다. 유럽 바이오인포메틱스 인스티튜트(The European Bioinformatics Institute) 서버는 또한, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>에서 온라인에서 두 서열간의 EMBOSS-니들 광역 정렬을 수행하기 위

한 기능을 제공한다.

- [0598] 선택적으로, 터미널 갭(*terminal gap*)을 페널라이징하지 않으면서 두 서열들의 최적의 광역 정렬을 계산하는 GAP 프로그램이 사용될 수 있다. GAP은 하기 논문: Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. *Computer Applications in the Biosciences* 10, 227-235에 설명되어 있다.
- [0599] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 변이체는 상기 서열의 기능적 균등물을 보호하기 쉬운 특이적으로 확인된 1 이상의 서열들에 대하여 유사성을 나타내고, 랜덤한 기회에 의해 발생될 것으로 합리적으로 기대될 수 없는 것들도 포함한다. 폴리펩티드에 대한 상기 서열의 유사성은 NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>)로부터의 프로그램(버전 2.2.10 [Oct 2004])의 BLAST 슈트(*suite*)로부터의 공용으로 사용가능한 *bl2seq* 프로그램을 사용하여 측정된다.
- [0600] 폴리뉴클레오티드 서열의 유사성은 하기 유닉스 커맨드 라인 변수들을 사용하여 시험될 수 있다:
- [0601] *bl2seq -i* 뉴클레오티드 서열1 *-j* 뉴클레오티드 서열2 *-F F -p tblastx*
- [0602] 변수 *-F F*는 낮은 복잡도 영역의 필터링을 끈다. 변수 *-p*는 서열 쌍에 대하여 적당한 알고리즘을 선택한다. 본 프로그램은 무작위 서열들을 포함하는 고정된 참고크기의 데이터베이스에서 우연히 상기 매치를 볼 것으로 기대하는 시간의 기대횟수인 "E 값"을 각 상기 영역에 대하여 보고하고, 서열들 사이의 유사성의 영역을 발견한다. 상기 데이터베이스의 크기는 *bl2seq* 프로그램에서 디폴트로 설정된다. 1 보다 훨씬 작은 E 값에 대하여, E 값은 상기 랜덤 매치의 대략적인 확률이다.
- [0603] 변이체 폴리뉴클레오티드 서열은 특이적으로 확인된 서열들 중 어느 하나와 비교할때, 바람직하게는, 1 x 10⁻¹⁰ 미만, 보다 바람직하게는 1 x 10⁻²⁰ 미만, 1 x 10⁻³⁰ 미만, 1 x 10⁻⁴⁰ 미만, 1 x 10⁻⁵⁰ 미만, 1 x 10⁻⁶⁰ 미만, 1 x 10⁻⁷⁰ 미만, 1 x 10⁻⁸⁰ 미만, 1 x 10⁻⁹⁰ 미만, 1 x 10⁻¹⁰⁰ 미만, 1 x 10⁻¹¹⁰ 미만, 1 x 10⁻¹²⁰ 또는 1 x 10⁻¹²³ 미만의 E 값을 나타낸다.
- [0604] 선택적으로, 본 발명의 변이체 폴리뉴클레오티드는 엄격한 조건하에서 특정 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 이들의 보체로 교잡한다.
- [0605] 용어 "엄격한 조건하에서 교잡하는" 및 이의 문법적인 동일어는 정해진 온도 및 염 농도의 조건하에서, 타겟 폴리뉴클레오티드 분자(예를 들면, 서던 블롯 또는 노던 블롯과 같은 DNA 또는 RNA 블롯상에서 부동화된 타겟 폴리뉴클레오티드 분자)에 교잡할 수 있는 폴리뉴클레오티드 분자의 능력을 의미한다. 엄격한 교잡 조건하에서 교잡할 수 있는 능력은 덜 엄격한 조건에서 초기에 교잡한후, 원하는 엄격성으로 엄격성을 높임으로써 측정될 수 있다.
- [0606] 길이가 약 100 염기 이상인 폴리뉴클레오티드 분자와 관련하여, 전형적인 엄격한 교잡 조건들은 네이티브 듀플렉스(*native duplex*)의 용융 온도(*T_m*) 이하의 25-30 °C(예를 들면, 10°C) 이하이다.(일반적으로, Sambrook et al., Eds, 1987, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press; Ausubel et al., 1987, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing 참조). 약 100염기 이상의 폴리뉴클레오티드 분자들을 위한 *T_m*은 식 $T_m = 81.5 + 0.41\% (G + C - \log (Na^+))$ 에 의해 계산될 수 있다. (Sambrook et al., Eds, 1987, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press; Bolton and McCarthy, 1962, *PNAS* 84:1390). 길이가 약 100 염기 이상인 폴리뉴클레오티드를 위한 전형적인 엄격한 조건은 6X SSC, 0.2% SDS 용액에서 프리세척하고; 65 °C, 6X SSC, 0.2% SDS에서 밤새 교잡하고; IX SSC, 0.1% SDS at 65°C에서 각각 30분간 2회 세척하고, 0.2X SSC, 0.1% SDS at 65°C에서 각각 30분간 2회 세척하는 것과 같은 교잡조건이다.
- [0607] 100 염기 미만의 길이를 갖는 폴리뉴클레오티드 분자들과 관련하여, 예시적인 엄격한 교잡 조건은 5 ~ 10°C 이하의 *T_m*이다. 평균, 길이가 100 bp 미만인 폴리뉴클레오티드 분자의 *T_m*은 약 (500/올리고뉴클레오티드 길이)°C에 의해 감소된다.
- [0608] 펩티드 핵산(PNAs)으로 공지된 DNA 모방물과 관련하여(Nielsen et al., *Science*. 1991 Dec 6;254(5037): 1497-500), *T_m* 값은 DNA-DNA 또는 DNA-RNA 하이브리드에 대한 값보다 높으며, Giesen et al., *Nucleic Acids Res.* 1998 Nov 1;26(21):5004-6에 기술된 식을 사용하여 계산될 수 있다. 100 염기 미만의 길이를 갖는 DNA-PNA 하이브리드에 대한 예시적인 엄격한 교잡 조건은 5 ~ 10 °C 이하의 *T_m*이다.
- [0609] 본 발명의 변이체 폴리뉴클레오티드는 또한, 본 발명의 서열과 상이하지만, 유전자 코드의 퇴보 결과로서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드와 유사한 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오

티드를 포함한다. 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변경시키지 않는 서열 변형은 "침묵 변이(silient variation)"이다. ATG (메티오닌) 및 TGG (트립토판)에 대한 것 외에, 일부 실시예에서, 같은 아미노산에 대한 다른 코돈들은 특정 숙주 유기체의 코돈 발현을 최적화하는 것과 같은 당 분야의 공지기술에 의해 변경된다.

- [0610] 폴리뉴클레오티드 서열 변형은 서열의 생물학적 활성을 크게 변경시키지 않으면서 상기 코딩된 폴리펩티드 서열 내에서 1개의 또는 여러 아미노산들을 보존적 치환하게 되며, 이는 본 발명에 포함된다. 당업자는 표현형적으로 침묵의 아미노산 치환을 형성하기 위한 방법들을 알 것이다(예를 들면, Bowie et al., 1990, Science 247, 1306 참조).
- [0611] 코딩된 폴리펩티드 서열에서 침묵 변이 및 보존적 치환으로 인한 다양한 폴리뉴클레오티드들은 상기 설명된 tblastx 알고리즘을 통해 NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>)로부터의 프로그램(버전 2.2.10 [Oct 2004])의 BLAST 슈트(suite)로부터의 공용으로 사용가능한 b12seq 프로그램을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0612] 폴리펩티드 변이체
- [0613] 폴리펩티드와 관련된, 용어 "변이체"는 자연발생 재조합적으로 및 합성 제조된 폴리펩티드를 포함한다. 다양한 폴리펩티드 서열은, 본 발명의 서열에 대하여 바람직하게는 50% 이상, 보다 바람직하게는 51% 이상, 52% 이상, 53% 이상, 54% 이상, 55% 이상, 56% 이상, 57% 이상, 58% 이상, 59% 이상, 60% 이상, 61% 이상, 62% 이상, 63% 이상, 64% 이상, 65% 이상, 66% 이상, 67% 이상, 68% 이상, 69% 이상, 70% 이상, 71% 이상, 72% 이상, 73% 이상, 74% 이상, 75% 이상, 76% 이상, 77% 이상, 78% 이상, 79% 이상, 80% 이상, 81% 이상, 82% 이상, 83% 이상, 84% 이상, 85% 이상, 86% 이상, 87% 이상, 88% 이상, 89% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 동일성을 나타낸다. 동일성은 20 이상의 아미노산 위치들, 바람직하게는 50 이상의 아미노산 위치들, 100 이상의 아미노산 위치들의 대조창에 대하여, 또는 본 발명의 폴리펩티드의 전장에 대하여 확인된다.
- [0614] 폴리펩티드 서열 동일성은 하기 방법으로 측정될 수 있다. 피험체 폴리펩티드 서열은 b12seq에서 BLASTP (from the BLAST suite of programs, version 2.2.10 [Oct 2004])를 사용하여 후보 폴리펩티드 서열과 대조되며, 이는 NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>)로부터 공용으로 사용된다. 낮은 복잡도 영역들의 필터링이 꺼져야 하는 것 외에는 b12seq의 디폴트 변수들이 사용된다.
- [0615] 폴리펩티드 서열 동일성은 또한, 광역 서열 정렬 프로그램을 사용하여 후보체 및 피험체 폴리뉴클레오티드 서열들 사이의 겹치는 부분의 전체 길이에 대하여 계산될 수 있다. 상기 설명된, EMBOSS-니들 (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>에서 사용가능) 및 GAP (Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227-235.)이 폴리펩티드 서열 동일성을 계산하기 위한 적당한 광역 서열 정렬 프로그램이다.
- [0616] 본 발명의 폴리펩티드 변이체들은 상기 서열들의 기능적 균등물을 보존하기 쉬운 특이적으로 확인된 1 이상의 서열들에 대하여 유사성을 나타내고 무작위 우연으로 발생할 것으로 타당하게 기대되지 않는 것들을 포함한다. 폴리펩티드와 관련된 상기 서열 유사성은 프로그램의 BLAST 슈트(version 2.2.10 [Oct 2004]) from NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>)로부터의 공용으로 사용가능한 b12seq 프로그램을 사용하여 측정될 수 있다. 폴리펩티드 서열의 유사성은 하기 유닉스 커맨드 라인 변수들을 사용하여 조사될 수 있다:
- [0617] `b12seq -i 펩티드서열1 -j 펩티드서열2 -F F -p blastp`
- [0618] 변이체 폴리펩티드 서열은 특이적으로 확인된 서열들 중 하나와 비교할때, 바람직하게, 1 x 10⁻¹⁰ 미만, 보다 바람직하게는 1 x 10⁻²⁰ 미만, 1 x 10⁻³⁰ 미만, 1 x 10⁻⁴⁰ 미만, 1 x 10⁻⁵⁰ 미만, 1 x 10⁻⁶⁰ 미만, 1 x 10⁻⁷⁰ 미만, 1 x 10⁻⁸⁰ 미만, 1 x 10⁻⁹⁰ 미만, 1 x 10⁻¹⁰⁰ 미만, 1 x 10⁻¹¹⁰ 미만, 1 x 10⁻¹²⁰ 미만 또는 1 x 10⁻¹²³ 미만의 E 값을 나타낸다.
- [0619] 변수 -F F는 복잡도가 낮은 섹션의 필터링을 벗어난다. 변수 -p는 서열 쌍들을 위한 적당한 알고리즘을 선택한다. 이 프로그램은 서열들 간의 유사성의 영역들을 발견하며, 상기 각 영역에 대하여, 무작위 서열들을 함유하는 고정된 참고크기의 데이터베이스에서 우연히 정합(match)을 볼 것으로 기대하는 기대횟수인 "E 값"을 보고한다. 1보다 훨씬 작은, 작은 E 값들에 대하여, 이는 대략 상기 무작위 정합 가능성이다.
- [0620] 생물학적 활성을 크게 변형시키지 않으면서 폴리펩티드 서열의 1 이상의 아미노산들을 보존적 치환하는 것도 또한 본 발명에 포함된다. 당업자는 표현형적으로 침묵의 아미노산 치환을 형성하기 위한 방법들을 알 것이다(예를 들면, Bowie et al., 1990, Science 247, 1306 참조).

- [0621] 본 발명은 폴리펩티드를 코딩하는 핵산으로부터 제조되지만, 변형된 아미노산 서열을 갖도록 다르게 처리되는 야생형 폴리펩티드와 상이한 폴리펩티드 변이체들도 포함한다. 예를 들면, 야생형 폴리펩티드를 생성하기 위한 1차 RNA 전사물의 패턴을 선택적으로 스플라이싱함으로써 변이체가 생성된다.
- [0622] 용어 "백터"는 숙주 세포에 유전자 구조물을 수송하기 위해 사용되는, 통상적으로 이중가닥인 DNA인 폴리뉴클레오타이드 분자를 의미한다. 특정 실시예에서, 백터는 추가의 이. 콜리와 같은 1 이상의 숙주 시스템에서 복제할 수 있다.
- [0623] **2. 병원체**
- [0624] 본 발명의 폴리머 입자, 방법 및 조성물은 세포내 병원체들을 포함하는 병원체들에 의해 야기되는 질병들을 예방 또는 치료하는 것에 일부 관한 것임을 알 것이다. 따라서, 세포내 병원체로부터 유도된 항원들은 본 발명에 사용하기에 적당하며, 당업자에 의해 선택될 수 있다. 대표적인 세포내 병원체들은 이하에 보다 상세히 설명되지만, 당업자는 본 발명이 타겟 세포내 병원체로부터 1 이상의 항원들, 또는 세포내 병원체로부터의 항원을 결합할 수 있는 1 이상의 결합 영역을 선택함으로써, 본 명세서에 기술된 방법들에 따라 세포내 병원체와 관련된 질병 또는 증상을 치료 또는 예방하는데 용도를 가짐을 알 것이다.
- [0625] 마이코박테리움(*Mycobacterium*)은 악티노박테리아속(*Actinobacteria*)이다. 상기 속은 결핵 및 한센병을 포함한, 포유동물에 심각한 질병을 유발하는 것으로 알려진 병원체들을 포함한다. 병원체 종들의 예로는 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*), 마이코박테리움 보비스(*M. bovis*), 마이코박테리움 아프리카눔(*M. africanum*), 마이코박테리움 마이크로티(*M. microti*); 마이코박테리움 레프래(*M. leprae* 레프로시(leprosy)), 마이코박테리움 아비움 파라투버쿨로시스(*M. avium paratuberculosis*)(사람의 크론병 및 양의 요네병과 연관됨)가 포함된다.
- [0626] 리스테리아(*Listeria*)종은 그람-양성 바실러스이다. 본 속에서 가장 알려진 병원체는 리스테리아증의 원인 제제인 리스테리아 모노사이토게네스(*L. monocytogenes*)이다. 리스테리아 이바노비(*Listeria ivanovii*)는 반추동물의 병원체이며, 인간 질병의 원인으로는 드물다.
- [0627] 쉬겔라(*Shigella*)는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 및 살모넬라(*Salmonella*)와 밀접하게 관련된 그람-음성, 비-스포어 형성 막대형 박테리아의 속이다. 쉬겔라(*Shigella*)는 다른 포유류를 제외하고, 오직 영장류만 감염시키는 인간 세균성 이질(이질)의 원인 제제이다.
- [0628] 예시니아(*Yersinia*)는 그람-음성 막대형 박테리아이다. 특정 인간 병원체들로는 예시니아증을 유발하는 예시니아 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*), 역병의 원인제제인 예시니아 페스티스(*Y. pestis*), 및 가장 덜 흔한 병원체인 예시니아 슈도투버쿨로시스(*Y. pseudotuberculosis*)가 포함된다. 예시니아는 반응성 관절염의 원인인 병원체 중 하나로 관련되어 있다.
- [0629] 브루셀라(*Brucella*)는 그람-음성 비-운동성 비-피포된 코코바실러스의 속이다. 브루셀라는 블루셀라증의 원인이다. 다른 블루셀라 종의 예로는 양 종류를 감염시키는 블루셀라 멜리텐시스(*B. melitensis*) 및 브루셀라 오비스(*B. ovis*), 소를 감염시키는 브루셀라 아보르투스(*B. abortus*), 돼지 종류를 감염시키는 브루셀라 수이스(*B. suis*), 바다 포유동물로부터 분리된 브루셀라 핀니페디아(*B. pinnipediae*) 및 브루셀라 네오토매(*B. neotomae*)가 포함된다. 인간은 전형적으로 저온살균되지 않은 우유와 치즈와 같은 유도성 식품 또는 감염된 동물들(양, 소 또는 돼지)로부터의 체액과 접촉함으로써 감염된다.
- [0630] 레지오넬라(*Legionella*)는 그람-음성 박테리아이다. 가장 주목할만한 종류인 레지오넬라 뉴모필라(*L. pneumophila*)는 레지오넬라증 또는 재향군인병을 유발한다.
- [0631] 리켓시아(*Rickettsia*)는 운동성, 그람-음성, 비-스포어 형성 박테리아이다. 리켓시아종은 많은 진드기, 벼룩 및 이에 의해 기생동물로 전달되며, 록키산 홍반열(Rocky Mountain spotted fever)(리켓시아 리켓시아(*R. rickettsii*)), 리켓시아성 두창(Rickettsialpox)(리켓시아 아카리(*R. akari*)), 부톤네즈 열(Boutonneuse fever)(리켓시아 코노리이(*R. conorii*)), 시베리아 진드기 티푸스(Siberian tick typhus)(리켓시아 시베리카(*R. siberica*)), 오스트랄리아 진드기 티푸스(Australian tick typhus)리켓시아 오스트랄리스(*R. australis*), 동양반점열(Oriental spotted fever)리켓시아 자포니카(*R. japonica*), 남아프리카 진드기열(African tick bite fever)리켓시아 아프리카(*R. africae*), 발진티푸스(Epidemic typhus)리켓시아 프로와제키(*R. prowazekii*), 및 지방병 티푸스(Endemic typhus)리켓시아 티피(*R. typhi*)와 같은 질병들을 유발한다.
- [0632] 살모넬라(*Salmonella*)는 장티푸스, 파라티푸스 및 살로넬라증을 포함하여 인간 및 많은 동물들에 질병을 야기하

는 막대형 그람-음성, 비-스포어 형성, 운동성 장내세균의 속이다.

[0633] 클라미디아(*Chlamydia*)는 인간 병원체 클라미디아 트라코마티스를 포함하는, 박테리아속을 의미한다. 클라미도필라는 폐렴을 유발하는 인간 병원체 클라미도필라 뉴모니아(*Chlamydomphila pneumoniae*), 호흡기 앵무새병을 유발하는 클라미도필라 시타키(*Chlamydomphila psittaci*) 및 인간에게 유산과 연관된 클라미도필라 아보르투스(*Chlamydomphila abortus*)를 포함하는, 관련 박테리아이다.

[0634] 스트렙토코커스(*Streptococcus*)는 뇌막염, 세균성 폐렴(스트렙토코커스 뉴모니아(*S. pneumoniae*)), 심내막염, 단독 및 괴사성 근막염(스트렙토코커스 파이오게네스(*S. pyogenes*))을 포함하는 여러 인간 질병들을 유발하는 것으로 알려진 구형 그람-양성 박테리아의 속이다.

[0635] 스태필로코커스(*Staphylococcus*)는 그람-양성 박테리아의 속이며, 식중독의 주요 원인이다.

[0636] 플라스모디움(*Plasmodium*)은 원충의 속이다. 상기 원충에 의한 감염은 말라리아를 유발하는 것으로 알려져 있다 (플라스모디움 팔시파룸(*P. falciparum*)).

[0637] 2.1 결핵(Tuberculosis)

[0638] 결핵은 연간 2백만명 이상이 사망하는 심각한 세계적인 건강질병이다. 이 질병은 박테리아 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*)에 의해 유발된다. 박테리아는 통상적으로 흡입을 통해 폐에 침입하여, 폐 감염을 일으켜서, 결국 신체의 다른 부분, 중추신경계, 림프계, 순환계, 비뇨생식기계, 위장관계, 뼈, 관절 및 피부로 변질 수 있다(Dietrich, 2006; Mustafa, 2001). 농가 가족들의 여러 형태의 결핵들, 예를 들면 소결핵병 및 요네병은 제품에 큰 부정적인 효과를 가진다.

[0639] 마이코박테리움 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*)에 의한 감염 확산은 면역계에 의해 제한된다. 많은 개체들은 감기 및 열외에 드문 증상들을 나타낸다. 그러나, 개체들의 약 30%는 감염을 충분히 조절할 수 없어 1차 질병을 전개시킨다. 그럼에도 불구하고, 상기 질병은 휴면으로 개체에 정착하고, 수십년후 다시 감염시킬 수 있다. 이 때문에, 마이코박테리움 투버쿨로시스는 면역 반응을 피할 수 있고, 긴 시간동안 난치의 비-복제 또는 느린 복제 시기로 생존할 수 있으므로, 감염성 박테리아중 독특하다.

[0640] 결핵 감염은 그 자체로 3단계로 발현한다. 제1 급성 단계는 신체기간내 박테리아 증식에 의해 확인된다. 면역 반응이 신속하게 뒤따라, 감염을 조절하고, 결국 박테리아 로딩을 감소시킨다. 급성단계후, 제2 잠복단계가 수행된다. 제2 단계중에, 박테리아 로딩은 안정적이고 낮은 수준으로 유지된다. 마이코박테리움 투버쿨로시스는 급성 단계에서의 활성 다중복제 단계로부터 잠복기간에서 휴면 상태로 변경한다. 제3 재활성화 단계는 박테리아가 다시 복제를 시작함으로써 일어날 수 있다. 상기 제3 단계에 영향을 미치는 요소는 여전히 주로 알려져 있지 않다(Barnes and Cave, 2003).

[0641] 박테리아는 활성 복제에서 휴면으로 전이하는 중에 유전자 발현을 조절할 수 있으므로, 면역 반응의 항원 특이성 변화는 감염의 다른 단계 내내 일어나는 것으로 생각된다.

[0642] 2.2 간염

[0643] 간염은 여러 간염 바이러스들에 의해 통상적으로 야기되는 질병에 대한 총칭이다. 간염에 기여하는 다른 원인들은 알콜, 독소, 약물, 및 자가면역 질환을 포함한다.

[0644] 간염은 불안, 근육통 및 관절통, 식용감소 및 황달 및 어떤 경우 궁극적인 간부전을 포함한 증상을 동반하는, 간의 염증이다. 간염은 질병의 만성 환자들에게서 관찰되는 간경변과 함께 급성 및 만성 둘다일 수 있다.

[0645] 2.3 인플루엔자

[0646] 인플루엔자(보통, '플루(flu)'라고 함)는 오르토믹소바이러스과의 RNA 바이러스에 의해 야기된다. 인플루엔자는 연간 250,000명 내지 500,000명이 사망한다. 일반적인 증상으로는 오한, 열, 인후염, 근육통 및 통증, 두통, 기침, 무기력, 및 피로가 포함된다. 심각한 경우, 인플루엔자는 노약자에게서 잠재적으로 치명적인 증상인 폐렴을 유발할 수 있다. 인플루엔자는 공기중을 통해, 또는 감염된 새의 똥 또는 코 분비물과의 직접 접촉을 통해 전염될 수 있다.

[0647] 3 계층의 인플루엔자 바이러스가 존재하며(A, B 및 C), 모두 유사한 구조를 공유한다. 두 큰 글리코단백질들인 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제는 바이러스 입자의 표면에 나타나며, 바이러스를 타겟 세포에 결합시키고 타겟 세포에 바이러스 게놈을 전달하여, 감염된 세포로부터 바이러스 프로게니를 방출하는데 관여된다. 16가지의 공

지된 헤마글루티닌 서브타입들(H1~H16) 및 9가지의 뉴라미니다제의 서브타입들(N1~N9)이 있다.

2.4 현행 치료전략

세포내 병원체들에 대하여 보호하기 위한 현행 치료전략들은 세포내 박테리아 병원체들에 의해 감염된 환자들의 항생 치료 또는 공지된 항원들에 대한 특정 백신들을 포함한다.

감염되기 전에 예방적으로, 또는 감염개시후 치료적으로, 세포내 병원체에 대한 재활성화에 대하여 보호하기 위하여 적당한 백신들이 없으므로, 세포내 병원체들에 대한 새롭고 개선된 치료전략들의 필요하다.

예를 들면, 결핵에 대하여 유일하게 현재 사용가능한 백신은 바실루스 칼메트-게랭(Bacille Calmette-Geurin)(BCG)이며, 이는 마이코박테리움 보비스의 약독균주를 함유한다. 결핵감염을 조절하는데 있어서 BCG의 효능은 제한되어 있다. 백신이 1차 질병에 대하여 어린이를 보호하지만, 성인에 대한 질병보호효능(잠복후 재활성화)은 감소된다(세계보건기구 - <http://www.who.int>). 또한, 결핵이 일반적인 많은 제3세계 국가들에서 BCG의 효능은 제한된다고 보고되어 있다. 그리고, BCG 백신이 생백신이므로, 면역-저하된 환자에게 투여하기에는 적당하지 않다. 보고에 의하면, BCG 백신은 마이코박테리움 투버쿨로시스가 비장(및 다른 기관들)으로 퍼지는 것을 감소시키는 반면, 폐에서의 박테리아 성장을 막지 못한다.

생백신과 관련된 다른 문제들과 함께, 감염전에 예방적으로 또는 감염개시후 치료적으로, 재활성에 대하여 보호하기 위한 적당한 백신이 없으므로, 결핵, 간염 또는 인플루엔자를 포함한 세포내 병원체들에 대하여 새롭고 개선된 치료전략들의 필요가 촉구되고 있다.

3. 면역 반응

3.1. 세포-매개 반응

세포-매개 면역력은 T-림프구에 의해 1차적으로 매개된다. 병원성 항원은, 주요 조직친화성 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 분자들 상에 결합된 항원존제세포들(예를 들면, 대식세포, B-림프구 및 수지상세포)의 표면상에 발현된다. MHC 클래스 II에 결합된 병원성 항원의 존재는 헬퍼 (CD4+) T-세포 반응을 활성화시킨다. 항원-MHC II 복합체에 T-세포를 결합할때, CD4+ T-세포는 증식하고, 인터페론-감마 (IFN- γ) 및 인터류킨 2 (IL-2), IL-4, IL-7, 및 IL-12를 포함하는 사이토킨을 방출한다.

MHC 클래스 I 분자들에 결합된 병원성 항원들의 존재는 세포독성 (CD8+) T-세포 반응을 활성화시킨다. 항원-MHC I 복합체에 T-세포를 결합할때, CD8+ 세포 분비가 수행하여, 병원체 세포분해, 팽창 및 사망을 일으킨다. 선택적으로, CD8+ 세포들은 프로그램된 세포사 또는 세포소멸을 유도한다. CD8+ T-세포의 활성화는 CD4+ T-세포에 의한 특정 사이토킨 방출에 의해 증폭된다.

세포-매개 면역 반응은 마이코박테리움 투버쿨로시스와 같은 세포내 병원체를 포함하는 여러 병원체들에 대한 면역력에 중요한 것으로 고려된다.

피험체에서 세포-매개 반응을 개시 또는 진행하는 것을 평가 및 모니터링하는 방법은 당 분야에 잘 알려져 있다. 편리한 예시방법들로는 본 명세서에 확인된 것과 같은 세포-매개 반응과 연관된 1 이상의 사이토킨의 수준 또는 존재를 평가하는 방법이 포함된다. 이와 유사하게, 세포-매개 반응의 개시 및 진행을 평가 또는 모니터링하기 위한 세포-기반 방법들은 본 발명에 사용하기에 적합하며, T-림프구와 같은, 면역세포의 1 이상의 군집들의 활성화 또는 확장을 확인하는데 타겟팅된 분석법을 포함하는, 세포 증식 또는 활성화 분석법이 포함된다.

특정 실시양태에서, 세포-매개 면역 반응 및 체액성 반응을 모두 유도하는 본 발명의 방법이 바람직하다.

다른 실시양태에서, 세포-매개 반응을 우선적으로 유도하는 본 발명의 방법이 바람직하다. 상기 방법들은 큰 체액성 반응 또는 검출가능한 체액성 반응없이 세포-매개 면역 반응을 유도하는 방법들을 포함한다. 한 실시예에서, 면역 반응은 세포-매개 면역반응, 예를 들면 중요한 IgA 반응의 부재하에, 또는 중요한 IgE 반응의 부재하에, 또는 중요한 IgG 반응의 부재(중요한 IgG1 반응의 부재 또는 중요한 IgG2 반응의 부재)하에, 또는 중요한 IgM 반응의 부재하에, IFN- γ 반응에 의해 표시되는 것과 같은 세포-매개 면역반응이다.

3.2. 체액성 반응

체액성 면역 반응은 B 세포에 의해 생성된 분비 항체들에 의해 매개된다. 항원들에 결합하는 분비 항체들은 구별을 위해 이들을 플레깅하여, 침입 병원체의 표면에 존재한다.

결합된 세포-매개 및 체액성 반응(개시된 세포-매개 반응의 결과와 같음)은 더욱더 민감한 면역 반응을 얻거나,

또는 세포내 병원체에 대한 보호수준을 개선시키기에 유리하다는 것이 제시되고 있다.

[0664] 다시, 체액성 반응의 개시 또는 진행을 평가 및 모니터하기 위한 방법은 당 분야에 잘 알려져 있다. 이들은 항체결합 분석법, ELISA, 피부단자시험(skin-prick test) 등을 포함한다.

[0665] 4. 항원

[0666] 여러 병원성 생물체들로부터의 많은 항원들은 본 발명에 사용하기 위해 특성화되고, 적당하다고 알고 있을 것이다. 현재 특성화되어 있든지 아니든지 면역 반응을 유도할 수 있는 모든 항원들이 고려된다.

[0667] 4.1 결핵 항원

[0668] 많은 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원들은 본 발명에서 특성화되고 사용하기에 적당한 것으로 알고 있을 것이다. 현재 특성화되어 있든지 아니든지, 면역 반응을 유도할 수 있는 모든 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원들이 고려된다.

[0669] 본 발명에 사용하기에 적당한 예시적인 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원들은 조기분비항원 타겟(ESAT)-6, Ag85A, Ag85B (MPT59), Ag85B, Ag85C, MPT32, MPT51, MPT59, MPT63, MPT64, MPT83, MPB5, MPB59, MPB64, MTC28, Mtb2, Mtb8.4, Mtb9.9, Mtb32A, Mtb39, Mtb41, TB10.4, TB10C, TBI 1B, TB12.5, TB13A, TB14, TB15, TB15A, TB16, TB16A, TB17, TB18, TB21, TB20.6, TB24, TB27B, TB32, TB32A, TB33, TB38, TB40.8, TB51, TB54, TB64, CFP6, CFP7, CFP7A, CFP7B, CFP8A, CFP8B, CFP9, CFP10, CFP11, CFP16, CFP17, CFP19, CFP19A, CFP19B, CFP20, CFP21, CFP22, CFP22A, CFP23, CFP23A, CFP23B, CFP25, CFP25A, CFP27, CFP28, CFP28B, CFP29, CFP30A, CFP30B, CFP50, CWP32, hspX (α -결정성), APA, 투버쿨린 정제단백질 유도체(Tuberculin purified protein derivative, PPD), ST-CF, PPE68, LppX, PstS-1, PstS-2, PstS-3, HBHA, GroEL, GroEL2, GrpES, LHP, 19kDa 리포단백질, 71kDa, RD1-ORF2, RD1-ORF3, RD1-ORF4, RD1-ORF5, RD1-ORF8, RD1-ORF9A, RD1-ORF9B, Rv1984c, Rv0577, Rv1827, BfrB, Tpx, Rv1352, Rv1810, PpiA, Cut2, FbpB, FbpA, FbpC, DnaK, FecB, Ssb, RplL, FixA, FixB, AhpC2, Rv2626c, Rv1211, Mdh, Rv1626, Adk, ClpP, SucD (Belisle et al, 2005; US 7,037,510; US 2004/0057963; US 2008/0199493; US 2008/0267990), 또는 상기 항원의 어느 하나의 1 이상의 항원성 부분 또는 T-세포 에피토프를 포함한다.

[0670] 본 발명은 단일의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원의 용도를 고려한다. 그러나, 2 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원의 용도와 관련된 실시양태들도 또한 구체적으로 고려된다.

[0671] 여러 실시예에서, 2 이상의 항원들은 상기 항원들로부터 선택된 2 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원들을 포함하는 2 이상의 마이코박테리움 투버쿨로시스 항원들을 포함하는 융합 단백질로서 생성된다.

[0672] 4.2 간염 항원

[0673] 여러 간염 항원들은 특성되어, 본 발명에 사용하기에 적당하다. 예시적인 간염 C 항원들로는 C - p22, E1 - gp35, E2 - gp70, NS1 -p7, NS2 - p23, NS3 - p70, NS4A - p8, NS4B - p27, NS5A - p56/58, 및 NS5B - p68이 포함되며, 각각(단독 또는 결합하든지)은 본 발명에 적용하기에 적당하다. 면역 반응을 유도할 수 있는 모든 간염 항원들은, 현재 특성화되어있는지의 여부와 상관없이 고려된다.

[0674] 4.3 인플루엔자 항원

[0675] 매우 많은 인플루엔자 항원들이 특성화되어, 본 발명에 사용하기에 적당하다. 본 발명에 사용하기에 적당한 예시적인 인플루엔자 항원들로는 PB, PB2, PA, 헤마글루티닌(HA) 또는 뉴라미니다제(NA) 단백질, NP, M, 및 NS 중 어느 하나가 포함되며, 각각(단독 또는 결합하든지)은 본 발명에 적용하기에 적당하다. 면역 반응을 유도할 수 있는 모든 인플루엔자 항원들은, 현재 특성화되어있는지의 여부와 상관없이, 고려된다.

[0676] 4.4 탄저병 항원

[0677] 여러 탄저균(*B. anthracis*) 항원들은 백신개발을 위한 잠재적 후보물로서 확인되었으며, 본 발명에 사용가능하다. 예를 들면, PA83은 백신개발을 위한 항원이다. 현재, 탄저균을 위해 유일한 FDA 허가받은 백신은 "Anthrax Vaccine Adsorbed" (AVA) 또는 BioThrax®이다. 이 백신은 알루미늄 보조제에 흡착된 탄저균의 비-피포 균주의 세포-유리 상층액으로부터 유도된다. PA는 AVA에서 1차 면역원이다. 본 발명에 사용하기에 적당한 다른 예시적인 탄저병 항원으로는 보호성 항원(PA 또는 PA63), LF 및 EF(단백질), 폴리-감마-(D-글루타메이트) 캡슐, 포자 항원(내포자 특이성분들), BcIA(외포자 특이단백질), BxpB(포자-관련 단백질), 및 분비단백질들이 포함된다. 면역 반응을 유도할 수 있는 모든 탄저병 항원들은 특성화되어있는지의 여부와 상관없이 고려된다.

[0678] 4.5 야토병 항원

[0679] 여러 야토병(*F. tularensis*) 항원들이 백신 개발을 위한 잠재적 후보물로서 확인되고, 본 발명에 사용가능하다. 예를 들면, AcpA 및 IgIC는 백신 개발에 적당한 항원이다. 본 발명에 사용하기에 적당한 다른 예시적인 야토병 항원들로는 O-항원, CPS, 외막 단백질(예를 들면, FopA), 리포단백질(예를 들면, TuW), 분비 단백질 및 리포다당류가 포함된다. 면역 반응을 유도할 수 있는 모든 야토병 항원들은 현재 특성화되어 있는지의 여부와 상관없이 고려된다.

[0680] 4.6 브루셀라병 항원

[0681] 여러 브루셀라병(*B. abortus*) 항원들이 백신 개발을 위한 잠재적 후보물로서 확인되고, 본 발명에 사용가능하다. 예를 들면, Omp1 β 는 백신 개발에 적당한 항원이다. 본 발명에 사용하기에 적당한 다른 예시적인 브루셀라병 항원들로는 -항원, 리포다당류, 외막 단백질(예를 들면, Omp1 β), 분비 단백질, 리보솜 항원(예를 들면, L7 및 L12), 박테리오펜틴, p39(추정 주변세포질 결합 단백질), groEL(열활성 단백질), 루마진 신타제, BCSP31 표면 단백질, PAL 16.5 OM 리포단백질, 카탈라제, 26 kDa 주변세포질 단백질, 31 kDa Omp31, 28 kDa Omp, 25 kDa Omp, 및 10 kDa Om 리포단백질이 포함된다. 면역 반응을 유도할 수 있는 모든 브루셀라병 항원들은 현재 특성화되어 있는지의 여부와 상관없이 고려된다.

[0682] 4.7 뇌수막염 항원

[0683] 여러 뇌수막염(*N. meningitidis*) 항원들이 백신 개발을 위한 잠재적 후보물로서 확인되고, 본 발명에 사용가능하다. 예를 들면, Cys6, PorA, PorB, FetA, 및 ZnuD는 백신 개발에 적당한 항원이다. 본 발명에 사용하기에 적당한 다른 예시적인 뇌수막염 항원들로는 O-항원, H인자 결합 단백질(fHbp), TbpB, NspA, NadA, 외막단백질, B 군 CPS, 분비 단백질 및 리포다당류가 포함된다. 면역 반응을 유도할 수 있는 모든 뇌수막염 항원들은 현재 특성화되어 있는지의 여부와 상관없이 고려된다.

[0684] 4.8 뎡기열 항원

[0685] 여러 뎡기열(*Flavivirus*) 항원들이 뎡기열 치료용 백신 개발을 위한 잠재적 후보물로서 확인되고, 본 발명에 사용가능하다. 예를 들면, 뎡기열 바이러스 엔벨로프 단백질 E1 - E4 및 막단백질 M1 - M4는 백신 개발에 적당한 항원이다. 본 발명에 사용하기에 적당한 다른 예시적인 뎡기열 항원들로는 C, preM, 1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B 및 5가 포함된다. 면역 반응을 유도할 수 있는 모든 뎡기열 항원들은 현재 특성화되어 있는지의 여부와 상관없이 고려된다.

[0686] 4.9 에볼라 바이러스 항원

[0687] 여러 에볼라 바이러스(*ebola virus*) 항원들이 에볼라 감염 치료용 백신 개발을 위한 잠재적 후보물로서 확인되고, 본 발명에 사용가능하다. 예를 들면, 필로비리데 자이레 에볼라바이러스(*Filoviridae Zaire ebolavirus*) 및 수단 에볼라바이러스 비리온 스파이크 당단백질 전구물질 항원(*Sudan ebolavirus virion spike glycoprotein precursor antigens*) ZEBOV-GP, 및 SEBOV-GP는 각각 백신 개발에 적당한 항원이다. 본 발명에 사용하기에 적당한 다른 예시적인 에볼라 바이러스 항원들로는 NP, vp35, vp40, GP, vp30, vp24 및 L이 포함된다. 면역 반응을 유도할 수 있는 모든 에볼라 바이러스 항원들은 현재 특성화되어 있는지의 여부와 상관없이 고려된다.

[0688] 4.10 웨스트 나일 항원

[0689] 여러 웨스트 나일(*West Nile*) 항원들이 감염 치료용 백신 개발을 위한 잠재적 후보물로서 확인되고, 본 발명에 사용가능하다. 예를 들면, 웨스트 나일 바이러스(WNV)로부터의 플라비바이러스 엔벨로프 항원(E)가 WNV 비리온(WNVE)의 표면상에서 발현된 비독성 단백질이며, 백신 개발에 적당하다. 본 발명에 사용하기에 적당한 다른 예시적인 WNV 항원들로는 Cp, Prm, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B 및 NS5가 포함된다. 면역 반응을 유도할 수 있는 모든 웨스트 나일 항원들은 현재 특성화되어 있는지의 여부와 상관없이 고려된다.

[0690] 상기 항원 또는 참고 항원들은 예시적일뿐, 본 발명을 한정하지는 않는다.

[0691] 5. 발현 구조물

[0692] 미생물, 식물세포 또는 동물세포(세포성 발현시스템)에서, 또는 세포유리 발현시스템에서, 융합 폴리펩티드의 발현을 위한 발현 구조물을 제조하고 사용하는 방법, 및 본 발명에 사용하기 위한 7개의 폴리머 입자들을 형성하기 위해 사용가능한 발현 구조물들을 포함하는 숙주 세포들은 당 분야에 잘 알려져 있다(예를 들면, Sambrook

et al., 1987; Ausubel et al., 1987).

- [0693] 하나의 실시양태에서 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 발현 구조물은 발현 또는 클로닝을 위한 복제가능한 벡터로 삽입되거나 또는 또 다른 실시양태에서는 숙주 계층으로 혼입된다. 다양한 벡터가 공공연히 이용가능하다. 예를 들면 벡터는 플라스미드, 코스미드, 바이러스 입자 또는 파아지의 형태이다. 적당한 핵산 서열을 다양한 절차에 의해서 벡터에 삽입할 수 있다. 일반적으로 DNA는 당업에 공지되어 있는 기술을 사용하여 적당한 제한 엔도뉴클레아제 부위(들)에 삽입될 된다. 벡터 성분은 일반적으로 이에 제한되지는 않지만 하나 이상의 신호 서열, 복제의 기원, 하나 이상의 선택가능한 마커 유전자, 인핸서 인자, 프로모터 및 전사 말단 서열을 포함한다. 하나 이상의 상기 성분들을 함유하는 적당한 벡터의 구성은 당업에 공지되어 있는 표준 라이제이션 기술을 이용한다.
- [0694] 발현 및 클로닝 벡터 둘 다는 하나 이상의 선택된 숙주 세포에서 벡터가 복제될 수 있도록 하는 핵산 서열을 함유한다. 적당한 서열이 다양한 박테리아, 효모 및 바이러스 용으로 잘 알려져 있다.
- [0695] 하나의 실시양태에서, 발현 구조물은 높은 복제수 벡터 상에 존재한다.
- [0696] 하나의 실시양태에서, 높은 복제수 벡터는 숙주 세포 당 20 내지 3000 복제수로 존재하는 것들로 부터 선택된다.
- [0697] 하나의 실시양태에서, 높은 복제수 벡터는 복제의 높은 복제수 기원(ori), 예컨대 복제의 ColE1 또는 ColE1-유래 기원을 함유한다. 예를 들면, 복제의 ColE1-유래 기원은 복제의 pUC19 기원을 포함할 수 있다.
- [0698] 본 발명의 벡터에 사용하기에 적당한 복제의 다수의 높은 복제수 기원이 당업에 통상의 기술을 가진 사람들에게 알려져 있다. 상기는 복제의 다른 높은 복제수 기원, 예컨대 M13 FR ori 또는 p15A ori 뿐만 아니라 pBR322로부터의 복제의 ColE1-유래 기원 및 이의 유도체를 포함한다. 2 μ 플라스미드 기원은 효모에 적합하며, 다양한 바이러스 기원(SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)는 포유류 세포에서 클로닝 벡터에 유용하다.
- [0699] 바람직하게, 복제의 높은 복제수 기원은 복제의 ColE1-유래 pUC19 기원을 포함한다.
- [0700] 제한 부위는 복제의 기원에 위치하여 제한 부위로의 삽입 클로닝이 기원을 불활성화시켜 벡터의 복제를 지시하지 못하도록 한다. 대안적으로, 하나 이상의 제한 부위는 기원내에 위치하여 제한 부위로의 삽입 클로닝으로 벡터의 복제가 단지 낮거나 또는 하나의 복제수로 하도록 할 수 있을 것이다.
- [0701] 발현 및 클로닝 벡터는 또한 형질전환된 숙주 세포에서 벡터의 존재를 검출하기 위한 적당한 마커라고도 하는 선택 유전자를 함유하는 것이 통상적이다. 통상적인 선택 유전자는 (a) 항생물질 또는 다른 독성, 예를 들면 암페실린, 네오마이신, 메토틱렉사트 또는 테트라사이클린에 대한 저항성을 부여하고, (b) 옥스트로픽(auxotrophic) 결함을 보충하고, 또는 (c) 바실러스용 D-알라닌 라세마제(racemase)를 암호화하는 유전자와 같이 복합 배지로부터 이용가능하지 않는 중요한 영양분을 공급하는 단백질을 암호화한다.
- [0702] 식물 형질전환에 통상적으로 사용되는 선택가능한 마커는 카나마이신 저항성을 부여하는 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 II 유전자(NPT II), 스펙티노마이신 및 스트렙토마이신 저항성을 부여하는 aadA 유전자, Ignite(AgrEvo) 및 Basta(Hoechst) 저항성용의 포스포노트리신 아세틸 트랜스퍼라아제(bar 유전자) 및 하이그로마이신 저항성 용의 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자(hpt)을 포함한다.
- [0703] 포유동물 세포용으로 적당한 선택가능한 마커의 예로는 발현 구조물, 예컨대 DHFR 또는 티미딘 키나아제를 취할 수 있는 세포 성분을 규명할 수 있는 것들이 있다. 야생형 DHFR을 이용하는 경우의 적당한 숙주 세포는 Urlaub 등, 1980이 기재하는 것과 같이 제조되고 번식되는 DHFR 활성이 결손된 CHO 세포주이다. 효모에 사용하기 위한 적당한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 trp1 유전자이다(Stinchcomb et al., 1979; Kingsman et al., 1979; Tschemper et al., 1980). 상기 trp1 유전자는 예를 들면 ATCC No. 44076 또는 PEP4-1로서 트립토판 중에 성장할 수 있는 능력이 없는 효모의 변주용 선택 마커를 제공한다[Jones, Genetics, 85:12 (1977)].
- [0704] 폴리머 입자를 형성하기에 유용한 발현 구조물은 폴리머 신타제를 암호화하는 하나 이상의 핵산, 입자-형성 단백질 또는 융합 폴리펩티드의 발현을 제어하는 프로모터를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0705] 다양한 잠재 숙주 세포에 의해 인식되는 프로모터가 잘 알려져 있다. 원핵생물 숙주 세포와 함께 사용하기 적당한 프로모터는 β -락타마제 또는 락토스 프로모터 시스템[Chang et al., 1978; Goeddel et al., 1979], 알카라인 포스파타아제, 트립토판(trp) 프로모터 시스템[Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776]

및 하이브리드 프로모터, 예컨대 tac 프로모터[deBoer et al., 1983)를 포함한다. 박테리아 시스템에 사용하기 위한 프로모터는 또한 폴리머 신타제를 암호화하는 핵산, 입자-형성 단백질 또는 융합 폴리펩티드와 연결되어 작동가능한 Shine-Dalgarno(S.D.) 서열을 포함할 것이다.

[0706] 효모 숙주와 사용하기 위한 적당한 프로모팅 서열의 예로는 3-포스포글리세라이트 키나아제[Hitzeman et al., 1980) 또는 다른 글리콜리틱 효소[Hess et al., 1968; Holland, 1978), 예컨대 에놀라아제, 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로게나아제, 헥소키나아제, 피루베이트 데카르복시라아제, 포스포프락토키아네제, 글루코스-6-포스페이트 아이소머라아제, 3-포스포글리세라트 뮤타아제, 피루베이트 키나아제, 트리세포스페이트 아이소머라아제, 포스포글루코스 아이소머라아제 및 글루코키나아제용 프로모터를 포함한다.

[0707] 성장 조건에 의해 제어되는 전사의 추가적 이점을 갖는 유도가능한 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알콜 디하이드로게나아제 2, 이소사이토크롬 C, 산 포스파타아제, 질소 대사와 관련된 분해성 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로게나아제, 및 말토스 및 갈락토스 이용의 원인이 되는 효소를 위한 프로모터 구역이다.

[0708] 모노코트 또는 다이코트 식물의 조직 또는 기관을 포함하는 식물 숙주 세포에 사용하기 위한 적당한 프로모터의 예로는 세포-, 조직- 및 기관-특이적 프로모터, 세포 주기 특이적 프로모터, 템포랄 프로모터, 유도가능한 프로모터, 대부분의 식물 조직에서 활성이 있는 구성 프로모터 및 재조합 프로모터를 포함한다. 프로모터의 선택은 목적한다면 클론형 폴리뉴클레오티드의 일시적 및 공간적 발현에 따라 달라질 것이다. 프로모터들은 다른 식물, 바이러스 및 식물 병원성 박테리아 및 곰팡이의 유전자로부터 유래된 프로모터 또는 숙주 세포로부터의 것들이다. 당업에 통상의 지식을 가진 자들은 실험을 하지 않아도 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전적 구조물을 사용하여 발현 구조물을 변형 및 조작하는데 사용하기에 적당한 프로모터를 선택할 수 있을 것이다. 구성 식물 프로모터의 예로는 CaMV 35S 프로모터, 노팔린 신타제 프로모터 및 옥토파인 신타제 프로모터, 및 메이쓰로부터의 Ubi 1 프로모터를 포함한다. 내부 발생 신호 또는 외부 비생물적 또는 생물적 스트레스에 반응하는 특이적인 조직에서 활성이 있는 식물 프로모터는 과학 문헌에 기재되어 있다. 대표적인 프로모터는 예를 들면 참고문헌으로 여기에 포함되어 있는 WO 02/00894에 기재되어 있다.

[0709] 포유동물 숙주 세포에 사용하기 위해 적당한 프로모터의 예로는 숙주 세포 시스템과 양립되는 프로모터로서 제공되며, 이종기원의 포유동물 프로모터, 예를 들면 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터 및 열-충격 프로모터로부터의 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스(예컨대 아데노바이러스 2), 보바인 파필로마 바이러스, 아비양 사르코마 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B-간염 바이러스 및 Simian Virus 40(SV40)와 같은 바이러스 계놈으로부터 수득된 것들을 포함한다.

[0710] 고등 진핵생물에 의한 발현 구조물의 전사는 몇몇 실시예에서 벡터로의 인헨서 서열을 삽입에 의해서 증가된다. 인헨서는 이의 전사를 증가시키기 위해 프로모터 상에서 활성을 갖는 일반적으로 약 10 내지 300 bp인 DNA의 시스-작용 요소이다. 현재 많은 인헨서 서열은 포유동물 유전자로부터 알려진 것이다(글로빈, 엘라스타아제, 알부민, α -페토프로테인 및 인슐린). 그러나 통상적으로 진핵 생물 세포 바이러스로부터의 인헨서를 사용할 것이다. 예로는 복제 기원의 후면 상의 SV40 인헨서(bp 100-270), 사이토메갈로바이러스 프로모터 인헨서, 복제 기원의 후면 상의 폴리오마 인헨서 및 아데노바이러스 인헨서를 포함한다. 통상적으로, 인헨서는 입자-형성 단백질 또는 융합 폴리펩티드 코딩 서열인 폴리머 신타제의 위치 5' 또는 3'에서 벡터로 스플라이싱되지만, 프로모터로부터의 5' 부위에 위치하는 것이 바람직하다.

[0711] 진핵생물 숙주 세포(효모, 곰팡이, 곤충, 식물, 동물, 인간 또는 다른 다세포 생물로부터의 핵 세포)에 사용하는 발현 벡터는 또한 전사의 종료 및 mRNA의 안정화를 위해 필수적인 서열을 포함할 것이다. 이러한 서열은 통상적으로 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 비전사 구역, 5' 및 간혹 3'으로부터 이용가능하다. 이러한 부위는 입자-형성 단백질 또는 융합 폴리펩티드, 폴리머 신타제를 코딩하는 mRNA의 비전사 위치에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사되는 뉴클레오티드 세그먼트를 함유한다.

[0712] 하나의 실시양태에서, 발현 구조물은 업스트림 유도 프로모터, 예컨대 아라비노스에 의해 유도되는 BAD 프로모터를 포함한다.

[0713] 하나의 실시양태에서, 발현 구조물은 구성 또는 조절가능한 프로모터 시스템을 포함한다.

[0714] 하나의 실시양태에서, 조절가능한 프로모터 시스템은 유도 또는 억제할 수 있는 프로모터 시스템이다.

[0715] 재조합 단백질의 제조에서 강한 프로모터로 사용하기에 바람직한 반면에, 이들 프로모터의 조절은 이중 단백질

의 구성 과잉제조로 성장 속도, 플라스미드 안정성 및 배양 생존능력을 감소시키므로 필수적이다.

- [0716] 다수의 프로모터가 오퍼레이터(프로모터의 다운스트림 부위)와 리프레서 단백질의 상호작용으로 조절된다. 가장 잘 알려진 오퍼레이터는 락토오스 오페론 및 박테리오파지 A로부터의 것이다. 대장균에서의 조절 프로모터의 개요는 Friehs & Reardon, 1991의 표 1에서 제공된다.
- [0717] 표준 박테리아 배양과 재조합 대장균과 관련된 것 사이의 주요한 차이는 성장의 분리 및 제조 또는 유도 상의 분리이다. 재조합 단백질 제조는 흔히 조절 프로모터의 이점을 취해서 (프로모터가 "오프"이고, 숙주 세포 상의 대사적 부담이 약한 경우) 성장 상에서의 높은 세포 밀도를 획득한 다음에 (이후에 유도로 프로모터가 "온"됨) 유도 상에서 이중 단백질 제조의 높은 비율을 획득한다.
- [0718] 하나의 실시양태에서, 조절가능한 프로모터 시스템은 LacI, Trp, 파아지 γ , 및 파아지 RNA 폴리머라아제로부터 선택된다.
- [0719] 하나의 실시양태에서, 프로모터 시스템은 lac 또는 Ptac 프로모터 및 lacI 리프레서, 또는 trp 프로모터 및 TrpR 리프레서로부터 선택된다.
- [0720] 하나의 실시양태에서, LacI 리프레서는 발현시키는 오퍼레이터로부터의 분리를 야기하는 활성 리프레서와 결합하는 이소프로필- β -D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)의 첨가에 의해서 불활성화된다.
- [0721] 하나의 실시양태에서, trp 프로모터 시스템은 규정된 트립토판 농도로 합성 배지를 사용하여 농도가 역가 수준 이하로 떨어지면 시스템의 스스로 유도될 수 있게 된다. 하나의 실시양태에서, 3- β -인돌-아크릴산을 첨가하여 TrpR 리프레서를 불활성화시킨다.
- [0722] 하나의 실시양태에서, 프로모터 시스템은 박테리오파지 리프레서 cI를 사용할 수 있게 한다. 상기 리프레서는 OL 및 OR이라고 하는 두 개의 오퍼레이터와의 상호작용하여 모든 용해 유전자의 발현을 막고, γ 프로파아지를 사용할 수 있게 한다. 이러한 오퍼레이터는 각각 두 개의 강한 프로모터 PL 및 PR과 겹친다. cI 리프레서의 존재하에 RNA 폴리머라아제의 결합이 방지된다. cI 리프레서는 미토마이신 C로 세포를 처리하거나 또는 UV-조사에 의해서 불활성화시킬 수 있다. 재조합 폴리펩티드를 발현시키는 보다 편리한 방법은 cI 리프레서 cI857의 온도-민감성 버전의 사용이다. γ -계 발현 시스템을 실행하는 숙주 세포는 저온에서 중기로 성장할 수 있으며, 고온으로 옮겨 재조합 폴리펩티드의 발현을 유도할 수 있다.
- [0723] 광범위하게 사용되는 발현 시스템은 T7 DNA 상에서 발견되지만 숙주 세포 크로모솜 상에는 존재하지 않는 프로모터를 인식하는 파아지 T7 RNA 폴리머라아제를 사용할 수 있다. 따라서, 발현 구조물은 재조합 유전자와 융합될 하나의 T7 프로모터(일반적으로 유전자 10의 앞쪽에 존재하는 프로모터)를 함유할 수 있다. T7 폴리머라아제를 코딩하는 유전자는 발현 구조물 상에 존재하거나, 두번째 양립가능한 발현 구조물 상에 존재하거나 또는 숙주 세포 크로모솜에 통합될 수 있다. 상기 모든 세 가지의 경우에, 유전자는 발현 상 중에 이의 전사 및 해독이 가능하도록 유도가능한 프로모터와 융합된다.
- [0724] 대장균 균주 BL21(DE3) 및 BL21(DE3) plysS(Invitrogen, CA)는 T7 RNA 폴리머라아제 유전자[T7RNA 폴리머라아제 유전자, 예컨대 예를 들면 KRX 및 XJ(자가용해)를 품는 몇몇 매우 적당하고 상업적으로 이용가능한 대장균 균주가 있음]을 운반하는 숙주 세포의 예이다. T7 RNA 폴리머라아제 유전자를 운반하는 다른 세포 균주는 당업에 잘 알려져 있으며, 예컨대 게놈에 통합된 T7 RNA 폴리머라아제를 품는 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) ADD1976 (Brunschwig & Darzins, 1992) 및 phaP 프로모터 제어 하에 게놈에 통합된 T7 RNA 폴리머라아제 유전자를 품는 쿠프리아비두스 네카(*Cupriavidus necator*, 이전에는 *Ralstonia eutropha*)가 있다 (Barnard et al., 2004).
- [0725] T7 RNA 폴리머라아제는 숙주 세포 효소에 대해 3가지 이점을 제공한다: 첫번째 상기는 오직 하나의 서브유닛(subunit)으로 구성되었고, 두번째 높은 공정성(processivity)을 발휘하며, 세번째는 리팜피신에 대한 반응을 나타내지 않는다. 후자의 특성은 T7 RNA 폴리머라아제에 대한 유전자 코딩을 유도하여 약 10분 후에 상기 항생제를 첨가함으로써 융합 폴리펩티드의 양을 특별히 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 상기 시간 동안, 충분한 폴리머라아제가 합성되어 융합 폴리펩티드의 고수준의 발현을 유도하고, 숙주 세포 효소의 저해는 플라스미드 및 크로모솜에 존재하는 모든 다른 유전자의 발현을 추가로 억제한다. 박테리아성 RNA 폴리머라아제를 저해하지만 T7 RNA 폴리머라아제는 저해하지 않는 다른 항생제로 예를 들면 스트렙토리디긴(streptolydigin) 및 스트렙토바리신(streptovaricin)이 당분야에 알려져 있다.
- [0726] 모든 프로모터 시스템이 믿을 수 없기 때문에, T7 RNA 폴리머라아제는 재조합 폴리펩티드가 독성 단백질을 코딩하

는 경우에 세포로 해로운 영향을 줄 수 있다. 성장 단계 중에 존재하는 상기 폴리머라제 분자는 리소자임에 대한 T7-코딩 유전자를 발현시킴으로써 저해될 수 있다. 상기 효소는 숙주 세포의 세포벽에서 결합을 끊고 T7 RNA 폴리머라제에 결합함으로써 T7 RNA 폴리머라제를 선택적으로 저해하는 2관능성 단백질이고, T7 감염 중에 전사가 조절되게 갑자기 시작되는 피드백 기작(feed-back mechanism)이다. 이/ 콜리 균주 BL21 (DE3) pLysS는 T7 리소자임을 본질적으로 발현하는 플라스미드 pLysS를 운반하는 숙주 세포의 예이다.

- [0727] 하나의 실시양태에서, 프로모터 시스템(promoter system)은 유도 사이클을 개시하기 위해서 약 30-37 °C에서 42 °C로 온도를 상승시키는 것과 같은 온도 전이에 의한 유도 사이클을 개시하도록 유도 또는 "스위치 온(turned on)"하는 API 또는 APR과 같은 프로모터를 사용한다.
- [0728] 강한 프로모터는 생체내 제조 중에 입자의 표면에서 융합 폴리펩티드 밀도를 향상시킬 수 있다.
- [0729] 바람직한 융합 폴리펩티드는 하기를 포함한다:
- [0730] 폴리머 신타제, 및
- [0731] (i) 번역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원, 또는
- [0732] (ii) 번역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역, 또는
- [0733] (iii) (i)와 (ii) 둘다를 포함하는 융합 인자.
- [0734] 본 명세서에서 사용하는 (i)와 (ii)를 코딩하는 핵산 서열은 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산과, 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 항원을 코딩하는 핵산, 또는 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산 서열과 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 코딩하는 핵산을 포함한다. 일단 발현되면, 융합 폴리펩티드는 폴리머 입자를 형성하거나 또는 폴리머 입자의 형성을 실시할 수 있다.
- [0735] 하나의 실시양태에서, 적어도 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산 서열은 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열과 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 항원을 코딩하는 핵산 또는 본 명세서에서 사용하는 (i)와 (ii)를 코딩하는 핵산 서열은 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산과, 세포-매개 번역 반응 또는 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 유도할 수 있는 항원을 코딩하는 핵산, 및 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 코딩하는 핵산과 목적하는 길이의 폴리뉴클레오티드 링커 또는 스페이서 서열을 통해서 간접적으로 융합된다.
- [0736] 하나의 실시양태에서, 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역 또는 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 코딩하는 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 폴리머 신타제를 포함하는 아미노산 서열의 C-말단과 접촉한다.
- [0737] 하나의 실시양태에서, 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역 또는 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 포함하는 융합 단백질의 아미노산 서열이 융합 폴리펩티드의 독립적인 폴딩(folding)을 실시하는 목적하는 길이의 펩티드 링커 또는 스페이서를 통한 폴리머 신타제 절편을 포함하는 아미노산 서열의 N-말단과 간접적으로 융합된다.
- [0738] 하나의 실시양태에서, 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역 또는 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 코딩하는 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제, 또는 C-말단 신타제 절편을 포함하는 아미노산 서열의 N- 말단과 접촉한다.
- [0739] 하나의 실시양태에서, 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역 또는 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 코딩하는 융합 단백질의 아미노산 서열은 융합 폴리펩티드의 독립적인 폴딩을 실시하기 위해서 목적하는 길이의 펩티드 링커 또는 스페이서를 통해서 N-말단 폴리머 신타제 절편 또는 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 포함하는 아미노산 서열의 C-말단에 간접적으로 융합된다.
- [0740] 하나의 실시양태에서, 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역 또는 세포-매개 번역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 코딩하는 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 디폴리머라제를 코딩하는 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단 디폴리머라제 절편과 접촉한다.
- [0741] 결핵의 치료 또는 예방과 관련된 다양한 실시양태에서, 실례의 융합 폴리펩티드는 하기를 포함한다:
- [0742] 폴리머 신타제, 및

- [0743] (i) 적어도 하나의 *엠. 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원, 또는
- [0744] (ii) 적어도 하나의 *엠. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역, 또는
- [0745] (iii) (i)와 (ii) 둘다를 포함하는 융합 인자.
- [0746] 본 명세서에 사용되는 (i)와 (ii)를 코딩하는 핵산 서열은 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산, *엠. 투버쿨로시스* 항원을 코딩하는 핵산, 또는 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산 서열과 *엠. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산을 포함한다. 일단 발현되면, 융합 폴리펩티드는 폴리머 입자를 형성하거나 또는 폴리머 입자의 형성을 실시할 수 있다.
- [0747] 하나의 실시양태에서, 적어도 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산 서열은 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열, *엠. 투버쿨로시스* 항원 또는 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산, 및 *엠. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산과 목적하는 길이의 폴리뉴클레오티드 링커 또는 스페이서 서열을 통해서 간접적으로 융합된다.
- [0748] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 *엠. 투버쿨로시스* 항원 또는 적어도 하나의 *엠. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 코딩하는 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 폴리머 신타제를 포함하는 아미노산 서열의 C-말단과 접촉한다.
- [0749] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 *엠. 투버쿨로시스* 항원 또는 적어도 하나의 *엠. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 포함하는 융합 단백질의 아미노산 서열은 융합 폴리펩티드의 독립적인 폴딩을 실시하는 목적하는 길이의 펩티드 링커 또는 스페이서를 통한 폴리머 신타제 절편을 포함하는 아미노산 서열의 N-말단과 간접적으로 융합된다.
- [0750] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 *엠. 투버쿨로시스* 항원 또는 적어도 하나의 *엠. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 코딩하는 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 C-말단 신타제 절편 또는 입자-형성 단백질을 포함하는 아미노산 서열의 N-말단과 접촉한다.
- [0751] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 *엠. 투버쿨로시스* 항원 또는 적어도 하나의 *엠. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 코딩하는 융합 단백질의 아미노산 서열이 융합 폴리펩티드의 독립적인 폴딩을 실시하기 위해서 목적하는 길이의 펩티드 링커 또는 스페이서를 통해서 N-말단 폴리머 신타제 또는 입자-형성 단백질을 포함하는 아미노산 서열의 C-말단과 간접적으로 융합된다.
- [0752] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 *엠. 투버쿨로시스* 항원 또는 적어도 하나의 *엠. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 코딩하는 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 C-말단 디폴리머라제(depolymerase) 절편 또는 디폴리머라제를 코딩하는 아미노산 서열의 N-말단과 접촉한다.
- [0753] 감염의 치료 또는 예방과 관련된 다양한 실시양태에서, 실험의 융합 폴리펩티드는 하기를 포함한다:
- [0754] 폴리머 신타제, 및
- [0755] (i) 적어도 하나의 감염 항원, 또는
- [0756] (ii) 적어도 하나의 감염 항원 결합 영역, 또는
- [0757] (iii) (i)와 (ii) 둘다를 포함하는 융합 인자.
- [0758] 본 명세서에 사용되는 (i)와 (ii)를 코딩하는 핵산 서열은 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산, 감염 항원을 코딩하는 핵산, 또는 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산 서열과 감염 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산을 포함한다. 일단 발현되면, 융합 폴리펩티드는 폴리머 입자를 형성하거나 또는 폴리머 입자의 형성을 실시할 수 있다.
- [0759] 하나의 실시양태에서, 적어도 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산 서열은 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열, 감염 항원 또는 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산, 및 감염 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산과 목적하는 길이의 폴리뉴클레오티드 링커 또는 스페이서 서열을 통해서 간접적으로 융합된다.
- [0760] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 감염 항원 또는 적어도 하나의 감염 항원 결합 영역을 코딩하는 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 폴리머 신타제를 포함하는 아미노산 서열의 C-말단과 접촉한다.
- [0761] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 감염 항원 또는 적어도 하나의 감염 항원 결합 영역을 포함하는 융합 단백질의 아미노산 서열은 융합 폴리펩티드의 독립적인 폴딩을 실시하는 목적하는 길이의 펩티드 링커 또는 스페이서를 통한 폴리머 신타제 절편을 포함하는 아미노산 서열의 N-말단과 간접적으로 융합된다.

- [0762] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 간염 항원 또는 적어도 하나의 간염 항원 결합 영역을 코딩하는 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 C-말단 신타제 절편 또는 입자-형성 단백질을 포함하는 아미노산 서열의 N-말단과 접촉한다.
- [0763] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 간염 항원 또는 적어도 하나의 간염 항원 결합 영역을 코딩하는 융합 단백질의 아미노산 서열이 융합 폴리펩티드의 독립적인 폴딩을 실시하기 위해서 목적하는 길이의 펩티드 링커 또는 스페이서를 통해서 N-말단 폴리머 신타제 절편 또는 입자-형성 단백질을 포함하는 아미노산 서열의 C-말단과 간접적으로 융합된다.
- [0764] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 간염 항원 또는 적어도 하나의 간염 항원 결합 영역을 코딩하는 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 C-말단 디폴리머라제 절편 또는 디폴리머라제를 코딩하는 아미노산 서열의 N-말단과 접촉한다.
- [0765] 인플루엔자의 치료 또는 예방과 관련된 다양한 실시양태에서, 실례의 융합 폴리펩티드는 하기를 포함한다:
- [0766] 폴리머 신타제, 및
- [0767] (i) 적어도 하나의 인플루엔자 항원, 또는
- [0768] (ii) 적어도 하나의 인플루엔자 항원 결합 영역, 또는
- [0769] (iii) (i)와 (ii) 둘다를 포함하는 융합 인자.
- [0770] 본 명세서에 사용되는 (i)와 (ii)를 코딩하는 핵산 서열은 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산, 인플루엔자 항원을 코딩하는 핵산, 또는 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산 서열과 인플루엔자 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산을 포함한다. 일단 발현되면, 융합 폴리펩티드는 폴리머 입자를 형성하거나 또는 폴리머 입자의 형성을 실시할 수 있다.
- [0771] 하나의 실시양태에서, 적어도 폴리머 신타제를 코딩하는 핵산 서열은 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산 서열, 인플루엔자 항원 또는 입자-형성 단백질을 코딩하는 핵산, 및 인플루엔자 항원 결합 영역을 코딩하는 핵산과 목적하는 길이의 폴리뉴클레오티드 링커 또는 스페이서 서열을 통해서 간접적으로 융합된다.
- [0772] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 인플루엔자 항원 또는 적어도 하나의 인플루엔자 항원 결합 영역을 코딩하는 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 폴리머 신타제를 포함하는 아미노산 서열의 C-말단과 접촉한다.
- [0773] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 인플루엔자 항원 또는 적어도 하나의 인플루엔자 항원 결합 영역을 포함하는 융합 단백질의 아미노산 서열은 융합 폴리펩티드의 독립적인 폴딩을 실시하는 목적하는 길이의 펩티드 링커 또는 스페이서를 통한 폴리머 신타제 절편을 포함하는 아미노산 서열의 N-말단과 간접적으로 융합된다.
- [0774] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 인플루엔자 항원 또는 적어도 하나의 인플루엔자 항원 결합 영역을 코딩하는 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 C-말단 신타제 절편 또는 입자-형성 단백질을 포함하는 아미노산 서열의 N-말단과 접촉한다.
- [0775] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 인플루엔자 항원 또는 적어도 하나의 인플루엔자 항원 결합 영역을 코딩하는 융합 단백질의 아미노산 서열이 융합 폴리펩티드의 독립적인 폴딩을 실시하기 위해서 목적하는 길이의 펩티드 링커 또는 스페이서를 통해서 N-말단 폴리머 신타제 절편 또는 입자-형성 단백질을 포함하는 아미노산 서열의 C-말단과 간접적으로 융합된다.
- [0776] 하나의 실시양태에서, 적어도 하나의 인플루엔자 항원 또는 적어도 하나의 인플루엔자 항원 결합 영역을 코딩하는 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 C-말단 디폴리머라제 절편 또는 디폴리머라제를 코딩하는 아미노산 서열의 N-말단과 접촉한다.
- [0777] 본 발명에 따른 융합 폴리펩티드의 하나의 이점은 폴리머 입자의 표면에 결합된 단백질의 변형이 폴리머 입자의 형성에 관여하는 단백질의 관능성에 영향을 주지 않는다는 것이다. 예를 들면, 폴리머 신타제의 관능성은 재조합 폴리펩티드가 이의 N-말단에 융합된 것을 보유함으로써 입자의 표면에서 재조합 폴리펩티드를 생성한다. 단백질의 관능성이 융합에 의해서 손상되면, 동일한 기능을 수행하고 활성 상태로 존재하는 부가의 입자-형성 단백질의 존재에 의해서 상기 단점이 오프셋(offset)된다.
- [0778] 상기 방식에서, 입자-형성 단백질을 통해서 폴리머 입자에 결합된 재조합 폴리펩티드의 안정한 결합을 유지할 수 있다.

- [0779] 융합 폴리펩티드에서 단백질의 배열은 플라스미드에 포함된 핵산에서 유전자 서열의 순서에 좌우되는 것을 이해해야 한다.
- [0780] 예를 들면, 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원 또는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역은 폴리머 신타제에 간접적으로 융합되는 융합 폴리펩티드를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 용어 "간접적으로 융합된(indirectly fused)"은 융합 폴리펩티드에서 발현되는 것이 바람직한 단백질일 수 있는 부가의 단백질에 의해서 분리되는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역 또는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원 및, 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 포함하는 융합 폴리펩티드를 나타낸다.
- [0781] 결핵의 치료에 사용되는 입자와 관련하여 사용될 때, *예. 투버쿨로시스* 또는 적어도 하나의 *예. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역이 폴리머 신타제에 간접적으로 융합되는 융합 폴리펩티드를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 유사하게, 간염 항원 또는 인플루엔자 항원 또는 적어도 하나의 간염 항원 결합 영역 또는 적어도 하나의 인플루엔자 항원 결합 영역이 폴리머 신타제에 간접적으로 융합되는 융합 폴리펩티드를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 용어 "간접적으로 융합된(indirectly fused)"은 융합 폴리펩티드에서 발현되는 것이 바람직한 단백질일 수 있는 부가의 단백질에 의해서 분리되는 입자-형성 단백질 및 적어도 *예. 투버쿨로시스* 항원 또는 적어도 하나의 *예. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 나타낸다. 유사하게, 상기 용어는 융합 폴리펩티드에서 발현되는 것이 바람직한 단백질일 수 있는 부가의 단백질에 의해서 분리된 입자-형성 단백질 및 적어도 하나의 간염 항원 또는 적어도 하나의 간염 항원 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 나타낸다. 선택적으로, 상기 용어는 융합 폴리펩티드에서 발현되는 것이 바람직한 단백질일 수 있는 부가의 단백질에 의해서 분리된 입자-형성 단백질 및 적어도 하나의 인플루엔자 항원 또는 적어도 하나의 인플루엔자 항원 결합 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 나타낼 수 있다.
- [0782] 하나의 실시양태에서, 부가의 단백질은 상기에 기술된 바와 같이 융합 폴리펩티드의 독립적인 폴딩을 실시하기 위해서 입자-형성 단백질 또는 융합 폴리펩티드, 또는 링커 또는 스페이서로부터 선택된다. 상기 실시양태에서, 융합 폴리펩티드의 목적하는 배열을 반영하기 위해서 플라스미드내 유전자의 서열을 결정하는 것이 필수적이다.
- [0783] 하나의 실시양태에서, 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원 또는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역은 폴리머 신타제에 직접적으로 융합될 수 있다. 상기 용어 "직접적으로 융합된(directly fused)"은 2개 이상의 펩티드가 펩티드 결합을 통해서 연결되는 것을 나타내는데 본 명세서에서 사용된다.
- [0784] 결핵의 치료 또는 예방과 관련된 다양한 실시양태에서, 예를 들면 *예. 투버쿨로시스* 항원 또는 적어도 하나의 *예. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역은 폴리머 신타제에 직접적으로 융합될 수 있다.
- [0785] 용어 "직접적으로 융합된(directly fused)"은 2개 이상의 펩티드가 펩티드 결합을 통해서 연결되는 것을 나타내는데 본 명세서에서 사용된다.
- [0786] 간염의 치료 또는 예방과 관련된 다양한 실시양태에서, 간염 항원 또는 적어도 하나의 간염 항원 결합 영역은 폴리머 신타제에 직접적으로 융합될 수 있다.
- [0787] 인플루엔자의 치료 또는 예방과 관련된 다양한 실시양태에서, 인플루엔자 항원 또는 적어도 하나의 인플루엔자 항원 결합 영역은 폴리머 신타제에 직접적으로 융합된다.
- [0788] 용어 "직접적으로 융합된(directly fused)"은 2개 이상의 펩티드가 펩티드 결합을 통해서 연결되는 것을 나타내는데 본 명세서에서 사용된다.
- [0789] 입자는 폴리머 입자에 결합되는 적어도 2개의 구별되는 융합 폴리펩티드를 포함하는 입자를 형성할 수 있다. 예를 들면, 폴리머 신타제에 융합되는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역 또는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 포함하는 제1 융합 폴리펩티드는 폴리머 입자에 결합할 수 있다. 결핵의 치료에 사용되는 입자와 관련하여 사용될 때, 상기 입자는 폴리머 입자에 결합될 수 있는 폴리머 신타제에 융합된 *예. 투버쿨로시스* 항원, 예를 들면 또는 적어도 하나의 *예. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 포함하는 제1 융합 폴리펩티드를 포함한다. 간염의 치료에 사용되는 입자와 관련하여 사용될 때, 입자는 폴리머 입자에 결합될 수 있는 폴리머 신타제에 융합된 간염 항원 또는 적어도 하나의 간염 항원 결합 영역을 포함하는 제1 융합 폴리펩티드를 포함한다. 인플루엔자의 치료에 사용하기 위한 입자와 관련하여 사용

될 때, 입자는 폴리머 입자에 결합될 수 있는 폴리머 신타제에 융합된 인플루엔자 항원 또는 적어도 하나의 인플루엔자 항원 결합 영역을 포함하는 제1 융합 폴리펩티드를 포함한다.

[0790] 하나의 실시양태에서, 발현 구조는 생체내에서 발현된다. 바람직하게, 발현 구조는 미생물, 바람직하게는 *에스케리치아 콜리*에서 발현되는 플라스미드이다.

[0791] 하나의 실시양태에서, 발현 구조는 생체내에서 발현된다. 바람직하게, 발현 구조는 세포 유리 발현 시스템을 사용하여 시험관내에서 발현된다.

[0792] 하나의 실시양태에서, 1 이상의 유전자는 단일 발현 구조로 삽입될 수 있거나, 또는 하나 이상의 유전자는 숙주 세포 계놈으로 포함될 수 있다. 모든 경우에, 발현은 상기에 기술된 바와 같이 프로모터를 통해서 조절될 수 있다.

[0793] 하나의 실시양태에서, 발현 구조는 상기에 기술된 바와 같이 세포-매개 면역을 유도할 수 있는 항원, 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 결합할 수 있는 결합 영역 및 입자-형성 단백질, 바람직하게는 폴리머 신타제를 포함하는 적어도 하나의 부가의 융합 폴리펩티드를 추가로 코딩한다.

[0794] 하나의 실시양태에서, 발현 구조는 상기에 기술된 바와 같이 입자-형성 단백질 및 *엠. 투버쿨로시스* 항원 또는 적어도 하나의 *엠. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 포함하는 적어도 하나의 부가의 융합 폴리펩티드를 추가로 코딩한다.

[0795] 하나의 실시양태에서, 발현 구조는 상기에 기술된 바와 같이 입자-형성 단백질 및 간염 항원 또는 적어도 하나의 간염 항원 결합 영역을 포함하는 적어도 하나의 부가의 융합 폴리펩티드를 추가로 코딩한다.

[0796] 하나의 실시양태에서, 발현 구조는 상기에 기술된 바와 같이 입자-형성 단백질 및 인플루엔자 항원 또는 적어도 하나의 인플루엔자 항원 결합 영역을 포함하는 적어도 하나의 부가의 융합 폴리펩티드를 추가로 코딩한다.

[0797] 본 명세서에서 사용하는 플라스미드가 실시예에 개시되었으며, PCT/DE2003/002799(WO 2004/020623(Bernd Rehm))으로 공개됨) 및 PCT/NZ2006/000251(WO 2007/037706(Bernd Rehm))으로 공개됨)에 상세하게 기술되었으며, 이들은 본 명세서에서 이의 전문이 참고문으로 포함된다.

[0798] 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원의 결합 영역은 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원, 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역이 투여되거나 또는 면역 반응이 유도될 수 있는 피험체내에 존재하는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0799] 결핵의 치료에 있어서 용도와 관련하여, *엠. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역은 적어도 하나의 *엠. 투버쿨로시스* 항원, 예를 들면 *엠. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역이 투여되거나 또는 면역 반응이 유도되는 피험체내에 존재하는 *엠. 투버쿨로시스* 항원을 결합할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 유사하게, 간염의 치료에 있어서 용도와 관련하여, 간염 항원 결합 영역은 적어도 하나의 간염 항원, 예를 들면 간염 항원 결합 영역이 투여되거나 또는 면역 반응이 유도되는 피험체내에 존재하는 간염 항원을 결합할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 인플루엔자의 치료에 있어서 용도와 관련하여, 인플루엔자 항원 결합 영역은 적어도 하나의 인플루엔자 항원, 예를 들면 인플루엔자 항원 결합 영역이 투여되거나 또는 면역 반응이 유도되는 피험체내에 존재하는 인플루엔자 항원을 결합할 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0800] 6. 입자 생성을 위한 숙주

[0801] 본 발명의 입자는 본 명세서에서 기술된 바와 같이 1 이상의 발현 구조를 사용하여 숙주 세포에서 편리하게 생성된다. 본 발명의 폴리머 입자는 숙주 세포에서 발현 구조물을 발현시킴으로써 생성될 수 있다. 상기는 숙주 세포 또는 숙주 세포의 조상(progenitor)으로 발현 구조물을 첫번째로 도입하는, 예를 들면 숙주 세포 또는 숙주 세포의 조상을 발현 구조물로 형질전환 또는 감염시키거나, 또는 다른 방법으로 발현 구조물이 숙주 세포내에 존재하도록 함으로써 수득될 수 있다.

[0802] 형질 전환 이후에, 형질 전환된 숙주 세포가 폴리머 입자의 형성 및 발현 구조물로부터 융합 폴리펩티드의 발현에 적당한 조건하에서 유지된다. 상기 조건은 예컨대 당분야에 알려져 있는 바와 같이 적당한 생물체내 플라스미드와 같이 선택된 발현 구조물의 발현에 적당한 것을 포함한다. 예를 들면, 특히 고수득율 또는 과잉 발현이 요구되는 경우, 배양 배지내 적당한 기질의 제공으로 융합 폴리펩티드의 입자-형성 단백질 성분이 폴리머 입자를 형성하도록 한다.

- [0803] 따라서, 본 발명은 폴리머 입자를 제조하는 방법을 제공하며,
- [0804] 적어도 하나의 발현 구조물을 포함하는 숙주 세포를 준비하는 단계(상기 발현 구조물은 입자-형성 단백질을, 바람직하게는 폴리머 신타제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열; 및 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원 또는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함함);
- [0805] 발현 구조물의 발현 및 폴리머 입자의 형성에 적당한 조건하에서 상기 숙주 세포를 유지하는 단계; 및
- [0806] 상기 숙주 세포로부터 상기 폴리머 입자를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0807] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 폴리머 입자를 제조하는 방법을 제공하며,
- [0808] 적어도 하나의 발현 구조물을 포함하는 숙주 세포를 준비하는 단계(상기 발현 구조물은 입자-형성 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열; 및 *옴. 투버쿨로시스* 항원 또는 *옴. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함함);
- [0809] 상기 폴리머 신타제에 의해서 발현 구조물의 발현 및 폴리머 입자의 형성에 적당한 조건하에서 상기 숙주 세포를 유지하는 단계; 및
- [0810] 상기 숙주 세포로부터 상기 폴리머 입자를 분리하여 폴리머 입자를 포함하는 조성물을 제조하는 단계를 포함한다.
- [0811] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 폴리머 입자를 제조하는 방법을 제공하며,
- [0812] 적어도 하나의 발현 구조물을 포함하는 숙주 세포를 준비하는 단계(상기 발현 구조물은 입자-형성 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열; 및 간염 항원 또는 간염 항원 결합 영역 또는 인플루엔자 항원 또는 인플루엔자-항원 결합 영역을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함함);
- [0813] 상기 폴리머 신타제에 의해서 발현 구조물의 발현 및 폴리머 입자의 형성에 적당한 조건하에서 상기 숙주 세포를 유지하는 단계; 및
- [0814] 상기 숙주 세포로부터 상기 폴리머 입자를 분리하여 폴리머 입자를 포함하는 조성물을 제조하는 단계를 포함한다.
- [0815] 바람직하게, 상기 숙주 세포는 예를 들면 박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 동물 세포, 바람직하게는 분리되거나 또는 비(非)인간의 숙주 세포이다. 재조합 폴리머 입자의 생성에 있어서 당 분야에 잘 공지된 방법에서 유용한 숙주 세포(예를 들면, Sambrook et al., 1987; Ausubel et al., 1987)는 본 명세서에서 토의된 고찰을 포함하는 본 발명의 방법에 사용하기에 종종 적당하다.
- [0816] 적당한 원시생물 숙주 세포는 예를 들면 유박테리아(eubacteria), 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 생물체, 예를 들면 *엔테로박테리아세(Enterobacteriaceae)*, 예컨대 *이. 콜리(E. coli)*를 포함한다. 다양한 *이. 콜리* 균주는 예컨대 *이. 콜리* K12 균주 MM294(ATCC 31,446); *이. 콜리* X1776(ATCC 31,537); *이. 콜리* 균주 W3110(ATCC 27,325) 및 K5 772(ATCC 53,635)로 공개적으로 이용가능하다. 다른 적당한 원핵생물 숙주 세포는 다른 엔테로박테리아세(Enterobacteriaceae), 예컨대 *에스케리치아 종(Escherichia spp.)*, *엔테로박터(Enterobacter)*, *에르위니아(Erwinia)*, *클레브시엘라(Klebsiella)*, *프로테우스(Proteus)*, *살모넬라(Salmonella)*, 예를 들면 *살모넬라 티피무리움(Salmonella typhimurium)*, *세라티아(Serratia)*, 예컨대 *세라티아 마르세스칸스(Serratia marcescans)* 및 *시겔라(Shigella)*, 뿐만 아니라 박실리(Bacilli), 예컨대 *비. 서브틸리스(B. subtilis)* 및 *비. 리체니포르미스(B. licheniformis)*, *슈도모나스(Pseudomonas)*, 예컨대 *피. 아에루기노사(P. aeruginosa)* 및 *악티노마이세테스(Actinomycetes)*, 예컨대, *스트렙토마이세스(Streptomyces)*, *로도코커스(Rhodococcus)*, *코리네박테리움(Corynebacterium)* 및 *마이코박테리움(Mycobacterium)*을 포함한다.
- [0817] 일부 실시양태에서, 예를 들면 *이. 콜리* 균주 W3110은 재조합 DNA 생성물 발효를 위한 통상의 숙주 균주이기 때문에 사용될 수 있다. 바람직하게, 숙주 세포는 단백질분해 효소의 최소량을 분비한다. 예를 들면 균주 W3110은 변형되어 숙주에 내인성인 단백질을 코딩하는 유전자에서 유전자 변이를 일으킬 수 있으며, 상기 숙주의 예로는 *이. 콜리* W3110 균주 1A2(완전한 유전형 tonA를 가짐); *이. 콜리* W3110 균주 9E4(완전한 유전형 tonA ptr3을 가짐); *이. 콜리* W3110 균주 27C7(ATCC 55,244)(완전한 유전형 tonA ptr3 phoA E15(argF-lac)169 degP ompT kanr을 가짐); *이. 콜리* W3110 균주 37D6(완전한 유전형 tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kanr을 가짐); *이. 콜리* W3110 균주 40B4(비(非)카나마이신 내성 degP 결실 변이를 갖는 균주 37D6

임)를 포함한다.

- [0818] 몇가지 바람직한 실시양태에서, 예를 들면 리포폴리사카라이드 엔도톡신을 생성하지 않는 *락토코커스 락티스* (*Lactococcus lactis*) 균주가 사용될 수 있다. *락토코커스 락티스* 균주의 예로는 MG1363 및 *락토코커스 락티스* 아종 *크레모리스* NZ9000를 포함한다.
- [0819] 원핵생물 뿐만 아니라, 진핵생물 미생물, 예컨대 필라멘토스 진균 또는 효모는 예를 들면 본 발명의 방법에 사용하는데 적당한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 예로는 *사카로마이세스 세레비시애*(*Saccharomyces cerevisiae*), 통상 사용되는 하등한 진핵생물 숙주 미생물을 포함한다. 다른 예로는 *시조사카로마이세스 폼베* (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach and Nurse, 1981; EP 139,383), *크루이베로마이세스*(*Kluyveromyces*) 숙주 (U.S. 특허 제4,943,529호; Fleer et al, 1991), 가령 예를 들면 *케이. 락티스*(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., 1983), *케이. 프라길리스*(*K.fragilis*) (ATCC 12,424), *케이. 불가리쿠스*(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), *케이. 위케라미이*(*K. wickeramii*) (ATCC 24,178), *케이. 월티이*(*K. waltii*) (ATCC 56,500), *케이. 드로소필라룸*(*K. drosophilorum*) (ATCC 36,906; Van den Berg et al, 1990), *케이. 서모톨레란스*(*K. thermotolerans*) 및 *케이. 마르시아누스*(*K. marxianus*); *야로위아*(*Yarrowia*) (EP 402,226); *피치아 파스토리스*(*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sreekrishna et al., 1988); *칸디다*(*Candida*); *트리코테마 레에시아* (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); *뉴로스포라 크라사*(*Neurospora crassa*) (Case et al., 1979); *시완니오마이세스*(*Schwanniomyces*), 예를 들면 *시완니오마이세스 옥시덴탈리스*(*Schwanniomyces occidentalis*) (EP 394,538, 1990년 10월 31일 공개); 및 필라멘토스 진균(filamentous fungi), 예를 들면 *뉴로스포라* (*Neurospora*), *펜실리움*(*Penicillium*), *톨리포클라디움*(*Tolypocladium*) (WO 91/00357, 1991년 1월 10일 공개됨), 및 *아스페르길루스*(*Aspergillus*) 숙주, 예를 들면 *에이. 니둘란스*(*A. nidulans*) (Ballance et al., 1983; Tilburn et al., 1983; Yelton et al., 1984) 및 *에이. 니거*(*A. niger*) (Kelly and Hynes, 1985)를 포함한다. 메틸로트로픽 효모(methylotrophic yeasts)는 본 명세서에서 적당하며, *한센울라*(*Hansenula*), *칸디다* (*Candida*), *클로에케라*(*Kloeckera*), *피치아*(*Pichia*), *사카로마이세스*(*Saccharomyces*), *토룰롭시스*(*Torulopsis*) 및 *로도토룰라*(*Rhodotorula*)로 구성된 종으로부터 선택된 매탄올에서 성장할 수 있는 효모를 포함한다. 효모 부류의 예인 특정 종의 목록은 Anthony, 1982에서 찾을 수 있다.
- [0820] 무척추동물 숙주 세포의 예로는 곤충 세포, 예컨대 *드로소필라*(*Drosophila*) S2 및 *스포돗테라*(*Spodoptera*) Sf9, 뿐만 아니라 식물 세포, 예컨대 면, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 세포 배양액을 포함한다. *스포돗테라 펠라노가스터*(*Spodoptera frugiperda*) (채기벌레), *아에테스 아에킵티*(*Aedes aegypti*) (모기), *아에테스 알보픽투스*(*Aedes albopictus*) (모기), *드로소필라 펠라노가스터*(*Drosophila melanogaster*) (과실파리), 및 *봄빅스 모리*(*Bombyx mori*)와 같은 숙주로부터 유래되는 다수의 바큇바이라균주 및 변이체 및 상응하는 허용되는 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질 감염에 대한 다양한 바이러스 균주, 예를 들면 *오토그라파 칼리포르니카*(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 *봄빅스 모리*(*Bombyx mori*) NPV의 Bm-5 균주가 공공연하게 이용가능하며, 상기 바이러스는 본 발명에 따른 명세서에서 특히 *스포돗테라 프루기퍼다*(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질 감염을 위해 바이러스로서 사용될 수 있다.
- [0821] 유용한 포유류 숙주 세포의 예로는 SV40으로 형질감염된 원숭이 신장 CV1 라인(COS-7, ATCC CRL 1651); 사람의 배아 신장 라인(human embryonic kidney line) (현탁 배양에서 성장을 위해서 서브클로닝된 293 또는 293 세포, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); 베이비 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 차이니스 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO, Urlaub et al., 1980); 마우스 고환 세포(TM4, Mather, 1980); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 사람 자궁경구암 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 사람 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 사람 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포(Mather et al., 1982); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 사람 헤마토마(hepatoma) 라인(Hep G2)이 있다.
- [0822] 진핵 세포 라인, 특히 포유류 세포 라인은 예를 들면 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원 또는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역, 또는 *엠. 투버쿨로시스* 항원 또는 *엠. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역 또는 간염 항원 또는 간염 항원 결합 영역 또는 인플루엔자 항원 또는 인플루엔자 항원 결합 영역은 예를 들면 당화(glycation)와 같은 1 이상의 해독후 변형(post-translational modifications)을 요구할 때 바람직할 것이다. 예를 들면, 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원은 면역성 또는 선택적 면역성인 해독후 변형을 요구할 수 있으므로, 상기 해독후 변형할 수 있는 발현 숙주에서 유용하게 발현될 수 있다.

- [0823] 하나의 실시양태에서, 숙주 세포는 산화 사이토솔(oxidising cytosol)을 갖는 세포, 예를 들면 이. 콜리 오리가미(Origami) 균주(Novagen)이다.
- [0824] 또 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 환원 사이토솔(reducing cytosol)을 갖는 세포, 바람직하게는 이. 콜리이다.
- [0825] 숙주 세포, 예를 들면 랄스토니아(*Ralstonia*), 아칼리게네스(*Acaligenes*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 및 할로비포르마(*Halobiforma*)를 포함하는 종으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게, 사용된 미생물은 예를 들면 랄스토니아 유티로파(*Ralstonia eutropha*), 알칼리게네스 라투스(*Alcaligenes latus*), 에스케리치아 콜리(*Escherichia coli*), 슈도모나스 프라기(*Pseudomonas fragi*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 플루레센스(*Pseudomonas fluorescens*) 및 할로비포르마 할로테레스트리스(*Halobiforma haloterrestis*)를 포함하는 그룹으로부터 선택된다. 상기 그룹은 생체적합성, 생분해성 입자를 자연적으로 제조할 수 있는 미생물과, 이들의 유전적 메이크업(genetic makeup)에 의해서 상기와 같이 하지 않는 이. 콜리와 같은 미생물을 포함한다. 입자를 생성할 수 있는 후자 상태의 미생물이 요구하는 유전자가 상기에 기술된 바와 같이 도입된다.
- [0826] 극도의 호염성 고세균(extremely halophilic archaea)은 낮은 수준의 비특이성 단백질 결합을 갖는 폴리머 입자를 생성하여 세포로부터 입자가 용이하게 분리 및 정제될 수 있다.
- [0827] 본래, 배양가능한 숙주 세포는 숙주 세포가 상이한 대사작용으로 인해 폴리머 입자를 형성하기에 요구되는 기제를 생성할 수 없을지라도 상기에 기술된 방법에 의해서 폴리머 입자의 생성에 사용될 수 있다. 상기 경우에, 필요한 기제가 배양 배지로 첨가된 후에, 세포로 도입되어진 유전자에 의해서 발현된 단백질에 의해서 폴리머 입자로 전환된다.
- [0828] 폴리머 입자를 제조하기 위한 후자-상태의 숙주 세포를 사용하는 유전자는 예를 들면 티올라제, 리덕타제 또는 폴리머 신타제, 예컨대 랄스토니아 유티로파(*Ralstonia eutropha*)로부터 유래된 phaA 티올라제, phaB 케토아실 리덕타제 또는 phaC 신타제를 포함한다. 숙주 세포가 폴리머 입자 형성을 위해 부족한 것을 증가시키기 위해 사용된 유전자는 숙주 세포의 유전적 메이크업에 좌우되며 기제가 배양 배지로 공급된다.
- [0829] 입자 형성을 위한 폴리히드록시알카노에이트(PHA) 입자의 형성에 관여하는 유전자 및 단백질, 및 입자 형성을 위한 일반적인 고려 사항은 Madison, et al, 1999; published PCT International Application WO 2004/020623 (Bernd Rehm); and Rehm, 2003; Brockelbank JA. et al., 2006; Peters and Rehm, 2006; Backstrom et al, (2006) 및 Rehm, (2006)에 보고되었으며, 이들 모두는 본 명세서에서 참고문으로 포함된다.
- [0830] 폴리머 신타제 단독은 기제로서 (R)-히드록시아실-CoA 또는 다른 CoA 티오에스테르 또는 이의 유도체를 갖는 숙주 세포에서 사용될 수 있다.
- [0831] 폴리머 입자는 또한 시험관내에서 형성될 수 있다. 바람직하게, 예를 들면, 세포 유리 발현 시스템이 사용된다. 상기 시스템에서, 폴리머 신타제가 제공된다. 정제된 폴리머 신타제, 예컨대 재조합 생성에서 수득 가능한 것, 또는 폴리머 신타제를 코딩하는 발현 구조물의 도입에 의해서 세포 유리 시스템에서 수득가능한 단백질 해독할 수 있는 세포 유리 시스템이 바람직할 것이다. 시험관내에서 입자 형성할 수 있는 환경을 생성하기 위해서, 폴리머 입자 형성을 위해 필요한 기제가 배지에 포함될 수 있다.
- [0832] 폴리머 신타제가 예를 들면 기제로서 (R)-히드록시아실-CoA 또는 다른 CoA 티오에스테르를 사용하여 관능화된 폴리머 입자의 시험관내 제조에 사용될 수 있다.
- [0833] 융합 폴리펩티드는 시험관내 폴리머 입자 생성에 사용하기 이전에 셀 소터(cell sorter), 원심분리, 여과 또는 친화성 크로마토그래피를 사용하여 분해된 세포로부터 정제될 수 있다.
- [0834] 시험관내 폴리머 입자 형성은 융합 폴리펩티드 피복의 수준, 포스포리피드 조성물 등의 수준을 포함하는 표면 조성물의 최적으로 조절할 수 있다.
- [0835] 폴리머 입자의 특성은 폴리머 입자가 생성되는 조건을 조절함으로써 영향을 받거나 또는 조절될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 상기는 예를 들면 숙주 세포의 유전적 메이크업, 예를 들면 Peters and Rehm, 2005에서 토의된 바와 같이 큰 과립을 생성하는 세포 분할 변이체(cell division mutants)를 포함한다. 숙주 세포가 유지되는 조건, 예를 들면 온도, 기체의 존재, 1 이상의 입자-형성 단백질의 존재, 가령, 입자 크기-결정 단백질, 폴리머 조절제의 존재 등이 있다.

- [0836] 하나의 실시양태에서, 폴리머 입자의 목적하는 특성은 지속성에 있다. 용어 "지속성(persistent)"은 선택된 환경에서 분해에 저항하는 폴리머 입자의 역량을 나타낸다. 폴리머 입자의 부가의 바람직한 특성은 폴리머 신타제 또는 입자-형성 단백질로부터 형성되고 입자 조합 중에 폴리머 신타제 또는 입자-형성 단백질의 C- 또는 N-말단에 결합하는 것이다.
- [0837] 본 발명의 몇가지 실시양태에서, 숙주 세포에서 발현 구조물의 과잉발현을 달성하는 것이 바람직하다. 특정 발현 구조물의 과잉발현 기작이 당분야에 잘 알려져 있으며, 상기 구조물 자체, 발현된 숙주 및 목적하거나 요구되는 과잉발현 정도에 좌우될 것이다. 예를 들면, 과잉발현은 (i) 강한 프로모터 시스템, 예를 들면 원핵생물 숙주에서 T7 RNA 폴리머라제 프로모터 시스템의 사용; (ii) 높은 카피수 플라스미드, 예를 들면 복제의 colE1 기원을 포함하는 플라스미드의 사용; 또는 (iii) 예를 들면 융합 서열의 사용을 통한 메신저 RNA의 안정화; 또는 (iv) 코돈 사용의 최적화를 통한 리보솜 결합 부위 또는 말단 부위 등의 해독의 최적화에 의해서 달성될 수 있다. 과잉 발현의 이점은 목적하는 더 작은 입자를 생성하고 더 많은 수의 폴리머 입자를 생성할 수 있다.
- [0838] 폴리머 입자를 형성하는 폴리머의 조성은 폴리머 입자의 기계적 또는 물리화학적 특성에 영향을 줄 것이다. 예를 들면, 이들 폴리머 조성물과 다른 폴리머 입자는 반감기가 다르거나, 또는 상이한 수준으로 생물학적 활성 물질, 특히 약학적 활성 성분을 분비할 것이다. 예를 들면, C6-C14 3-히드록시 지방산을 포함하는 폴리머 입자는 폴리머의 낮은 결정성에 의해서 높은 수준의 폴리머 분해를 나타낸다. 폴리머 백본에서 상대적으로 큰 결사슬을 갖는 폴리머 구성성분의 물 비율에서 증가는 통상 결정성을 감소시키므로 현저한 탄성 특성을 나타낸다. 본 발명에 기술된 방법에 따라 폴리머 조성물을 조절함에 의해서, 폴리머 입자의 생분해성에 영향을 줄 수 있으므로 폴리머 입자의 지속에 영향을 주며, 상기 입자에서 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원 또는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원의 결합 영역, 또는 상기 입자에서 1 이상의 *옴. 투버쿨로시스* 항원 또는 *옴. 투버쿨로시스* 항원 결합 영역, 또는 간염 항원 또는 간염 항원 결합 영역, 또는 인플루엔자 항원 또는 인플루엔자 항원 결합 영역이 존재할 때 예를 들면 투여되는 피험체에서 유지되거나, 또는 상기 폴리머 입자상에서 또는 폴리머 입자에 존재하는 생물학적 활성 물질, 특히 약학적 활성제 또는 스킨-케어 성분의 분비율에 영향을 준다.
- [0839] 관능성 측기(functional side groups)를 갖는 적어도 하나의 지방산이 폴리머 입자의 형성을 위한 기체로서 배양 배지로 도입되는 것이 바람직하며, 여기서 적어도 하나의 히드록시 지방산 및/또는 적어도 하나의 머캡토 지방산 및/또는 적어도 하나의 β -아미노 지방산이 도입되는 것이 특히 바람직하다. "관능성 측기를 갖는 지방산(Fatty acids with functional side groups)"은 포화 또는 불포화 지방산을 의미하는 것으로 해석되어야 한다. 상기는 메틸기, 알킬기, 히드록실기, 페닐기, 설프히드릴(sulfhydryl)기, 1차, 2차 및 3차 아미노기, 알데히드기, 케토기, 에테르기, 카르복실기, 0-에스테르기, 티오에스테르기, 카르복실산 아미드기, 헤미아세탈기, 아세탈기, 포스페이트 모노에스테르기 및 포스페이트 디에스테르기를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 관능성 측기를 포함하는 지방산을 또한 포함한다. 기체의 사용이 폴리머 입자의 목적하는 특성 및 목적하는 조성에 의해서 결정된다.
- [0840] 상기 기체 또는 기체 혼합물은 적어도 하나의 선택적으로 치환된 아미노산, 락테이트, 에스테르 또는 포화 또는 불포화 지방산, 바람직하게는 아세틸-CoA를 포함할 수 있다.
- [0841] 하나의 실시양태에서, 보조제(adjuvant), 면역조절제(immunomodulatory agent) 또는 분자, 예컨대 면역자극제 또는 분자, 또는 백신 제조에 유용한 다른 화합물이 기체 혼합물에 제공되고 폴리머 입자 형성 중에 폴리머 입자로 혼입되거나, 또는 폴리머 입자에 확산시킨다.
- [0842] 상기 폴리머 입자는 예를 들면 폴리-베타-아미노산, 폴리아세테이트, 폴리티오에스테르 및 폴리에스테르로부터 선택된 폴리머를 포함할 수 있다. 가장 바람직하게는, 상기 폴리머는 폴리히드록시알카노에이트(PHA), 바람직하게는 폴리(3-히드록시부티레이트)(PHB)를 포함한다.
- [0843] 상기 폴리머 신타제(synthase) 또는 폴리머 입자는 바람직하게는 폴리머 입자를 캡슐화(encapsulates)하는 포스포리피드 모노레이어(monolayer)를 포함한다. 바람직하게, 상기 입자-형성 단백질은 상기 리피드 모노레이어(lipid monolayer)에 이른다.
- [0844] 폴리머 신타제 또는 입자-형성 단백질은 폴리머 입자 또는 포스포리피드 모노레이어에 결합되거나 또는 상기 둘다에 결합되는 것이 바람직하다.
- [0845] 상기 입자-형성 단백질은 이를 형성하는 폴리머 입자에 공유 결합하거나 또는 비(非)공유 결합되는 것이 바람직하다.

- [0846] 바람직하게 상기 폴리머 입자의 표면적의 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%가 융합 폴리펩티드에 의해서 피복된다.
- [0847] 특정 상황에서, 예를 들면 주어진 용도에 특히 적합한 입자를 제조하기 위해서 본 발명에서 제조된 입자의 크기를 조절하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 강력한 세포-매개 면역 반응을 유도하기 위해, 상대적으로 큰 크기를 갖는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 폴리머 입자를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 결핵 치료에 사용하기 위한 입자와 관련하여, 강력한 세포-매개 면역 반응을 유도하기 위해, 상대적으로 큰 크기를 갖는 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원을 포함하는 폴리머 입자를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 유사한 조건이 간염 또는 인플루엔자의 치료에 적용할 수 있으며, 여기서 강력한 세포-매개 면역 반응을 유도하기 위해, 상대적으로 큰 크기를 갖는 1 이상의 간염 항원 또는 1 이상의 인플루엔자 항원을 포함하는 폴리머 입자를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 폴리머 입자의 크기를 조절하기 위한 방법은 PCT/DE2003/002799(WO 2004/020623으로 공개) 및 PCT/NZ2006/000251(WO 2007/037706으로 공개)에 기재되어 있다.
- [0848] 몇가지 실시양태에서, 입자 크기가 입자-형성 단백질의 발현을 조절함으로써 또는 예를 들면 존재하는 경우 입자 크기-결정 단백질의 발현을 조절함으로써 조절된다.
- [0849] 본 발명의 다른 실시양태에서, 예를 들면 입자 크기 조절은 기체의 이용가능성, 예를 들면 배양 배지에서 기체의 이용가능성을 조절함으로써 달성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 기체는 폴리머 입자의 크기를 조절하기에 충분한 양으로 배양 배지로 첨가될 수 있다.
- [0850] 상기 방법의 조합은 입자 크기에 대해서 더 효과적인 제어를 발휘하기 위해서 사용될 수 있다고 이해될 것이다.
- [0851] 다양한 실시양태에서, 예를 들면 입자 크기는 약 10 nm 내지 3 μ m, 바람직하게는 약 10 nm 내지 약 900 nm, 약 10 nm 내지 약 800 nm, 약 10 nm 내지 약 700 nm, 약 10 nm 내지 약 600 nm, 약 10 nm 내지 약 500 nm, 약 10 nm 내지 약 400 nm, 약 10 nm 내지 약 300 nm, 약 10 nm 내지 약 200 nm, 특히 바람직하게, 약 10 nm 내지 약 100 nm의 직경을 갖는 입자를 제조하기 위해서 조절될 수 있다.
- [0852] 다른 실시양태에서, 예를 들면 입자 크기는 약 10 nm 내지 약 90 nm, 약 10 nm 내지 약 80 nm, 약 10 nm 내지 약 70 nm, 약 10 nm 내지 약 60 nm, 약 10 nm 내지 약 50 nm, 약 10 nm 내지 약 40 nm, 약 10 nm 내지 약 30 nm, 또는 약 10 nm 내지 약 20 nm의 직경을 갖는 입자를 제조하기 위해서 조절될 수 있다.
- [0853] 상기에 기술된 범위내의 범위를 포함하는 평균 입자 크기의 다른 범위가 특별히 의도되며, 예를 들면 폴리머 입자는 약 50 내지 약 500 nm, 약 150 내지 약 250 nm, 또는 약 100 내지 약 500 nm, 등의 직경을 갖는다.
- [0854] 다양한 실시양태에서, 예를 들면, 제조된 입자의 90%는 약 200 nm 이하의 직경을 가지며, 80 %는 약 150 nm 이하의 직경을 가지고, 60 %는 약 100 nm 이하의 직경을 가지며, 45 %는 약 80 nm 이하의 직경을 가지고, 40 %는 약 60 nm 이하의 직경을 가지며, 25 %는 약 50 nm 이하의 직경을 가지고, 5 %는 약 35 nm 이하의 직경을 갖는다.
- [0855] 다양한 실시양태에서, 예를 들면 상기 방법은 약 200 nm 미만, 약 150 nm 미만, 또는 약 110 nm 미만의 평균 직경을 갖는 폴리머 입자를 제조한다.
- [0856] **7. 조성 및 조제**
- [0857] 본 발명의 폴리머 입자는 다양한 상이한 적용을 위해 본 발명의 방법에서 사용하기에 적당한 조성으로서 조제되며, 예를 들면 특별한 경로를 통한 투여를 위해 조제되거나 또는 보관을 위해서 조제되며, 상기를 제조하는 숙주 세포 외부에서 입자로서 안정하게 유지될 수 있으며, 상기 입자는 다양한 적용에 적합하도록 디자인될 수 있다.
- [0858] 하나의 실시양태에서, 예를 들면 본 명세서에서 유용한 조성이 이에 한정되는 것은 아니지만 경구 또는 비경구(국소, 피하, 근육내 또는 정맥내를 포함)를 포함하는 선택된 경로에 의해서 피험체에게 투여되도록 조제된다.
- [0859] 그러므로, 예를 들면 본 발명에 따른 유용한 약학적 조성물은 의도된 투여 경로 및 표준 약학적 실시와 관련하여 선택된 적당한 약학적 허용가능한 담체(부형제, 희석제, 보조제 및 이의 조합체)와 조제될 수 있다. 예를 들면, 백신용 약학적 조성물은 당분야의 통상의 지식을 가진 사람에게 잘 알려진 바와 같은 1 이상의 보조제 또는 면역자극제를 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 따른 유용한 조성물은 분말, 액체, 태블릿(tablet) 또

는 캡슐(capsule)과 같은 경구용, 연고, 크림 또는 로션과 같은 비경구용으로 투여될 수 있다. 적당한 조제는 요구되는 추가 제제(유화제, 향산화제, 풍미제 또는 착색제를 포함함)를 포함할 수 있으며, 즉시, 지연, 변형, 지속, 펄스 또는 제어된 방출에서 적당할 수 있다.

[0860] 그러므로, 본 발명은 또한 사람 및 기타 포유류에서 질병, 질환 및/또는 증상 및 본 명세서에서 기술된 바와 같은 기타 질환의 치료에 유용한, 본 명세서에 기술된 것을 포함하는 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자를 포함하는 투여량(doses), 투여 형태(dosage forms), 조제(formulations), 조성 및 장치에 관한 것이다. 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자를 포함하는 상기 투여 형태, 조제, 조성 및/또는 장치의 사용으로 상기 증상을 효과적으로 치료할 수 있다. 본 발명은 예를 들면 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자를 포함하는 투여 형태, 조제, 장치 및/또는 조성을 제공하며, 상기 1 이상의 폴리머 입자는 Tb 항원을 포함한다. 본 발명의 투여 형태, 조제, 장치 및/또는 조성은 연장된 기간 동안 생체이용성, 면역원성을 최적화하거나, 또는 면역학적 또는 치료적 범위내에서 혈장, 혈액 또는 조직 농도를 유지하도록 조절될 수 있다. 예를 들면 조절된 송달 조제는 작용 부위에서 항원 농도를 최적화하기 위해서 또한 사용될 수 있다.

[0861] 본 발명의 투여 형태, 조제, 장치 및/또는 조성은 예를 들면 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자에 계속된 노출을 제공하기 위해서 주기적 투여를 위해서 조절될 수 있다. 유익한 면역학적 반응, 예를 들면 1 이상의 "부스터(booster)" 백신화를 사용하는 것을 유도하기 위한 전략이 당 분야에 잘 알려져 있으며, 상기 전략은 본 발명의 실시에서 채택될 수 있다.

[0862] 약학적 조성물 및 투여 형태가 비경구 경로를 통해 투여될 수 있으며, 상기 경로는 본 명세서에 기술된 것과 같은 면역 반응을 유도하는 방법의 특정 실시양태에서 바람직할 것이다. 비경구 투여 형태의 예로는 활성제의 수용액, 등장성 식염수(isotonic saline) 또는 5% 글루코스, 또는 다른 잘 알려져 있는 약학적 허용가능한 부형제를 포함한다. 예를 들면 시클로덱스트린 또는 당 분야에 친숙한 것으로 잘 알려져 있는 다른 가용화제가 치료제의 송달을 위한 약학적 부형제로서 이용할 수 있다.

[0863] 경구 투여를 위해 적당한 투여 형태의 예로는 이에 한정되는 것은 아니지만, 본 발명의 폴리머 입자의 치료적 유효량을 제공할 수 있는, 태블릿, 캡슐, 로젠지(lozenges) 또는 유사 형태, 또는 시럽, 수용액, 에멀전 등과 같은 액체 형태를 포함한다. 캡슐은 표준 약학적 허용가능한 물질, 예컨대 젤라틴 또는 셀룰로스를 포함할 수 있다. 태블릿은 고형 담체 및 유효제와 활성 성분의 혼합물을 압축함으로써 종래 방법에 따라 조절될 수 있다. 고형 담체의 예로는 전분 및 슈거 벤토나이트를 포함한다. 활성 성분은 또한 결합제, 예를 들면 락토스 또는 만니톨, 종래 필러(filler) 및 정제화 제제(tabletting agent)를 포함하는 경질 셀의 태블릿 또는 캡슐의 형태로 투여될 수 있다.

[0864] 경피(transdermal) 투여에 적당한 투여의 예로는 이에 한정되는 것은 아니지만, 경피성 패치, 경피성 봉대 등을 포함한다. 본 발명의 조성물 및 조제의 국소 투여에 적당한 투여 형태의 예로는 로션, 스틱, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 젤 등이 있으며, 피부에 직접 도포되거나 또는 패드(pad), 패치 등과 같은 매개물(intermediary)을 통해서 도포될 수 있다.

[0865] 본 발명의 조성물 및 조제의 좌약 투여에 적당한 투여 형태의 예로는 몸의 구멍, 특히 직장, 질 및 요도로 삽입되는 고형 투여 형태를 포함한다.

[0866] 본 발명의 조성물 및 조제의 주사에 적당한 투여 형태의 예로는 정맥내 주사, 피하, 진피 및 근육내 투여 또는 경구 투여에 의해서 한번 또는 다수 투여와 같은 볼러스(bolus)를 통한 송달을 포함한다. 본 발명의 조성물 및 조제의 데폿(depot) 투여에 적당한 투여 형태의 예로는 본 발명의 폴리머 입자의 펠렛 또는 작은 실린더(cylinders) 또는 고체 형태를 포함하며, 본 발명의 폴리머 입자는 생분해성 폴리머의 매트릭스, 마이크로에멀전, 리포솜에 트래핑되거나 또는 마이크로캡슐화된다.

[0867] 본 발명의 조성물 및 조제를 위한 주입(infusion) 장치의 예로는 목적하는 투여 회수 또는 정상 상태 투여를 위한 목적하는 양으로 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자를 포함하는 주입 펌프를 포함하며, 이식성(implantable) 약물 펌프를 포함한다.

[0868] 본 발명의 조성물 및 조제용 이식성 주입 장치의 예로는 고체 형태를 포함하며, 본 발명의 폴리머 입자가 생분해성 폴리머 또는 합성, 폴리머, 예컨대 실리콘, 실리콘 고무, 실라스틱(silastic) 또는 유사한 폴리머내에 캡슐화되거나 또는 통해서 분산된다.

[0869] 본 발명의 조성물 및 조제의 경점막(transmucosal) 송달에 적당한 투여 형태의 예로는 활성 성분 뿐만 아니라 당 분야에 알려져 있는 적당한 담체에 포함된 관장제(enemas), 페서리(pessaries), 탐폰, 크림, 젤, 페이스트,

폼(foams), 분무형 용액, 분말 및 유사한 제제를 위한 보관 용액(depositories solution)을 포함한다. 특히, 약학적으로 허용가능한 용액 및/또는 현탁액, 수용액 또는 유기 용매, 또는 이의 혼합물 및/또는 분말을 포함하는 조성물을 포함하는, 본 발명의 조성물 및 조제의 흡입(inhalation) 또는 통기(insufflation)에 적당한 투여 형태가 의도된다. 본 발명의 조성물 및 조제의 경점막 투여는 점막을 이용할 수 있지만, 통상 코(nasal), 볼(buccal), 질 및 직장 조직을 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물 및 조제의 비강 투여에 적당한 조제는 액체 형태, 예를 들면 코 스프레이, 코 드롭(drops)으로 투여될 수 있거나, 또는 폴리머 입자의 수성 또는 유성 용액을 포함하는 네블라이저에 의한 에어로졸 투여에 의해서 투여될 수 있다. 담체가 고체인 비강 투여용 조제는 예를 들면 약 약 100 마이크로미터 이하, 가장 바람직하게는 약 50 이하의 마이크로미터의 입자 크기를 갖는 거친 분말을 포함하며, 코로 들어마서 섭취하는 방식으로 투여되며, 예를 들면 코에 가깝게 유지하여 분말 용기에서부터 비강을 통해서 빠르게 흡입되는 방식으로 투여될 수 있다. 본 발명의 조제는 벤질 알콜 또는 다른 적당한 보존제, 생체이용률을 향상시키기 위한 흡수 촉진제, 플루오로카본 및/또는 당 분야에 잘 알려져 있는 다른 가용화제 또는 분산제를 사용하는 식염수, 용액에 수용액의 형태로 제조될 수 있다.

[0870] 본 발명의 조성물 및 조제의 구강(buccal) 투여에 적당한 투여 형태의 예로는 로젠지, 태블릿 등을 포함하며, 상기 조성물은 약학적 허용가능한 용액 및/또는 현탁액, 수성 또는 유기 용매, 또는 이들의 혼합물 및/또는 분말을 포함한다.

[0871] 본 발명의 조성물 및 조제의 설하(sublingual) 투여에 적당한 투여 형태의 예로는 로젠지, 태블릿 등을 포함하며, 상기 조성물은 약학적 허용가능한 용액 및/또는 현탁액, 수성 또는 유기 용매, 또는 이들의 혼합물 및/또는 분말을 포함한다.

[0872] 본 발명의 조성물 및 조제의 눈(opthalmic) 투여에 적당한 투여 형태의 예로는 약학적 허용가능한 용액 및/또는 현탁액, 수성 또는 유기 용매를 포함하는 삽입물 및/또는 조성물을 포함한다.

[0873] 본 발명의 조성물 및 조제의 송달에 유용한 백식 및 조절된 약물 조제를 포함하는 조성물의 조제의 예로는 예를 들면, Sweetman, S. C. (Ed.). Martindale. The Complete Drug Reference, 33rd Edition, Pharmaceutical Press, Chicago, 2002, 2483 pp.; Aulton, M. E. (Ed.) Pharmaceutics. The Science of Dosage Form Design. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2000, 734 pp.; and, Ansel, H. C, Allen, L. V. and Popovich, N. G. Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Ed., Lippincott 1999, 676 pp.에서 발견할 수 있다. 약물 송달 시스템의 제조에 사용된 부형제는 당분야의 통상의 지식을 가진 사람에게 알려져 있는 다양한 공보에 기술되어 있으며, 예를 들면 Kibbe, E. H. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed., American Pharmaceutical Association, Washington, 2000, 665 pp.를 포함한다. USP는 변형-방출(modified-release) 경구 투여 형태의 예를 제공하며, 태블릿 또는 캡슐로 조제된 것을 포함한다. 예를 들면, The United States Pharmacopeia 23/National Formulary 18, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville MD, 1995 (이후에, "USP")를 참고하며, 연장된-방출 및 지연된-방출 태블릿 및 캡슐의 약물 방출 역량을 측정하기 위한 특정 시험을 또한 기술하였다. 연장된-방출 및 지연된-방출 논문에 대한 약물 방출에 대한 USP 시험은 경과된 시험 시간에 대한 투여 유닛으로부터 약물 용해도에 기초한다. 다양한 시험 장치 및 절차에 대한 상세를 USP에서 찾을 수 있다. 연장된 방출 투여 형태의 분석에 관련된 부가의 안내가 F.D.A.에 의해서 제공된다(참고 Guidance for Industry. Extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations. Rockville, MD: Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration, 1997).

[0874] 본 발명의 투여 형태의 추가의 예로는 이에 한정되는 것은 아니지만, 지연된-방출(DR) 형태; 연장된-작용(PA) 형태; 조절된-방출(CR) 형태; 연장된-방출(ER) 형태; 정기적-방출(TR) 형태; 및 장기-작용(LA) 형태를 포함하는 변형된 방출(MR) 투여 형태를 포함한다. 대부분에서, 상기 용어는 경구 투여되는 투여 형태를 기술하기 위해서 사용되지만, 그러나 상기 용어는 본 명세서에 기술된 투여 형태, 조제, 조성물 및/또는 장치에 적용가능할 수 있다. 상기 조제는 약물 투여 이후에 어떤 시간 동안 지연된 전체 약물 방출, 및/또는 투여후 일시적으로 소량의 분취량(aliquot)으로 약물 방출, 및/또는 송달 시스템에 의해 좌우되는 조절율에 느린 약물 방출, 및/또는 가변되지 않는 일정 속도로 약물 방출, 및/또는 통상의 조제보다 상당히 긴 시간 동안 약물 방출을 달성한다.

[0875] 특정 실시양태에서, 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자 또는 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자를 포함하는 1 이상의 항원의 치료적 유효량은 약 1 ug/kg 내지 약 1 g/kg이다. 실례의 치료적 유효량 범위는 예를 들면 약 1 μg/kg 내지 약 500 mg/kg, 약 1 μg/kg 내지 약 400 mg/kg, 약 1 μg/kg 내지 약 300 mg/kg, 약 1 μg/kg 내지 약 200 mg/kg, 약 1 μg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 1 μg/kg 내지 약 90 mg/kg, 약 1 μg/kg 내지 약 80

mg/kg, 약 1 μ g/kg 내지 약 70 mg/kg, 약 1 μ g/kg 내지 약 60 mg/kg, 약 1 μ g/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 5 μ g/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 10 μ g/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 50 μ g/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 100 μ g/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 200 μ g/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 300 μ g/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 400 μ g/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 500 μ g/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 600 μ g/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 700 μ g/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 800 μ g/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 900 μ g/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 5 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 10 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 15 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 20 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 25 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 30 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 35 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 40 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 또는 약 45 mg/kg 내지 약 50 mg/kg을 포함한다.

[0876] 다른 치료적 유효량은 예를 들면 약 1 mg/kg 내지 약 1 g/kg, 약 1.5 mg/kg 내지 약 950 mg/kg, 약 2 mg/kg 내지 약 900 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 850 mg/kg, 약 4 mg/kg 내지 약 800 mg/kg, 약 5 mg/kg 내지 약 750 mg/kg, 약 5 mg/kg 내지 약 700 mg/kg, 5 mg/kg 내지 약 600 mg/kg, 약 5 mg/kg 내지 약 500 mg/kg, 약 10 mg/kg 내지 약 400 mg/kg, 약 10 mg/kg 내지 약 300 mg/kg, 약 10 mg/kg 내지 약 200 mg/kg, 약 10 mg/kg 내지 약 250 mg/kg, 약 10 mg/kg 내지 약 200 mg/kg, 약 10 mg/kg 내지 약 200 mg/kg, 약 10 mg/kg 내지 약 150 mg/kg, 약 10 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 10 mg/kg 내지 약 75 mg/kg, 약 10 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 또는 약 15 mg/kg 내지 약 35 mg/kg을 포함한다.

[0877] 사람 피험체를 표적으로 하는 본 발명의 몇가지 실시양태에서, 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자의 치료적 유효량 또는 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자를 포함하는 1 이상의 항원의 치료적 유효량은 예를 들면 도스(dose)당 약 10 mg 내지 약 10 g이다. 다른 치료적 유효량 범위는 예를 들면 도스당 약 20 mg 내지 약 9 g, 약 30 mg 내지 약 8 g, 약 40 mg 내지 약 7 g, 약 50 mg 내지 약 6 g, 약 60 mg 내지 약 5 g, 약 70 mg 내지 약 4 g, 약 80 mg 내지 약 3 g, 약 100 mg 내지 약 2 g, 약 100 mg 내지 약 1.5 g, 약 200 mg 내지 약 1400 mg, 약 200 mg 내지 약 1300 mg, 약 200 mg 내지 약 1200 mg, 약 200 mg 내지 약 1100 mg, 약 200 mg 내지 약 1000 mg, 약 300 mg 내지 약 900 mg, 약 300 mg 내지 약 800, 약 300 mg 내지 약 700 mg 또는 약 300 mg 내지 약 600 mg을 포함한다.

[0878] 본 발명은 또한 파트로서 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자를 포함하는 저투여량의 조성물, 조제 및 장치를 제공한다. 예를 들면, 저투여량의 조성물, 조제 등은 예를 들면 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자 또는 본 발명의 1 이상의 폴리머 입자를 포함하는 1 이상의 항원의 약 0.001 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 4.5 mg/kg, 약 0.02 mg/kg 내지 약 4 mg/kg, 약 0.02 내지 약 3.5 mg/kg, 약 0.02 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.05 mg/kg 내지 약 2.5 mg/kg, 약 0.05 mg/kg 내지 약 2 mg/kg, 약 0.05-0.1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.05-0.1 mg/kg 내지 약 4 mg/kg, 약 0.05-0.1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.05-0.1 mg/kg 내지 약 2 mg/kg, 약 0.05-0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 및/또는 본 명세서에 제시된 범위내의 다른 투여량 또는 투여 범위를 제공하기에 충분한 양으로 투여된다.

[0879] 본 명세서에 기술된 투여량은 일회 투여 또는 수회 투여 또는 분할 투여로 투여될 수 있다. 예를 들면, 투여량은 면역학 분야에 잘 알려져 있는 바와 같이 치료 기간에 대해서 1회, 2회, 3회, 4회 이상 투여될 수 있다.

[0880] 본 발명에 따른 유용한 조성물의 유효성(efficacy)은 시험관내 및 생체내 양쪽에서 평가될 수 있다. 예를 들면 하기 실시예를 참조한다. 간단하게, 상기 조성물은 세포-매개 면역 반응을 유도하기 위한 이의 역량을 시험관내 또는 생체내에서 시험될 수 있다. 생체내 연구에 있어서, 상기 조성물이 동물(예컨대, 마우스)로 먹이거나 또는 주사될 수 있고, 그후 면역 반응을 유도할 수 있는 이의 효과가 평가된다. 결과에 기초하여, 적당한 투여 범위 및 투여 경로가 결정될 수 있다.

[0881] 본 발명의 몇가지 실시양태에서, 치료적 유효량은 면역 반응을 유도하는데 유효한 양이며, 예를 들면 약 0.5 ng/mL 내지 약 20 ng/mL, 약 0.5 ng/mL 내지 약 15 ng/mL, 약 0.5 ng/mL 내지 약 10 ng/mL, 약 0.5 ng/mL 내지 약 9 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 약 8 ng/mL, 약 2 ng/mL 내지 약 7 ng/mL 또는 약 3 ng/mL 내지 약 6 ng/mL의 혈중 IFN-감마의 농도이다.

[0882] 감염 후 또는 연장된 감염 동안을 포함하는 몇가지 상황에서, 향상된 IFN-감마 혈중 농도가 관찰되며, 상기 높은 농도는 본 발명의 폴리머 입자에 의한 효과적인 면역 반응의 유도가 평가될 수 있는 기준선을 평가에서 설명되어야 한다.

[0883] 8. 폴리머 입자에 의한 치료

[0884] 폴리머 입자, 예컨대 폴리히드록시알킬 폴리머 입자는 이를 제조하는 숙주 세포 밖에서 입자로서 안정하게 유지

되며, 상기 입자는 다양한 적용에 적합하게 디자인될 수 있다는 것이 발견되었다.

- [0885] 관능성 폴리머 입자는 세포-매개 또는 다른 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 표면-결합 항원, 세포-매개 또는 다른 면역 반응을 유도할 수 있는 항원의 결합 영역에 결합된 1 이상의 물질, 또는 이의 결합체를 포함할 수 있다.
- [0886] 하나의 실시양태에서, 예를 들면 물질은 입자 형성 중에 입자 표면에 고정되거나, 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역에 결합되거나, 또는 부하(load), 확산(diffusion) 또는 혼입(incorporation)에 의해서 입자로 통합된다.
- [0887] 결핵 치료에 사용과 관련하여, 예를 들면 폴리머 입자는 1 이상의 표면-결합된 *마이코박테리움 투버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 항원, *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원 결합 영역에 결합된 1 이상의 물질, 또는 이의 결합체를 포함할 수 있다.
- [0888] 하나의 실시양태에서, 물질은 입자 형성 중에 입자 표면에 고정되거나, 예를 들면 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원 결합 영역에 결합되거나, 또는 부하, 확산 또는 혼입에 의해서 입자로 통합될 수 있다. 예를 들면 가교에 의한 폴리머 입자의 표면으로의 공유 결합이 또한 특별하게 의도된다.
- [0889] 하나의 실시양태에서, 상기 물질은 예를 들면 단백질 또는 단백질 절편, 펩티드, 폴리펩티드, 항체 또는 항체 절편, 항체 결합 영역, 항원, 항원 결정기(antigenic determinant), 에피토프(epitope), 면역원 또는 이의 절편, 또는 이의 2 이상의 결합체를 포함하는 목록으로부터 선택된다.
- [0890] 하나의 실시양태에서, 세포내 병원체로부터의 DNA는 절편화되어 폴리머 신타제를 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 발현 구조물로 삽입된다. 상기 방법에서, 세포내 병원체 항원 결정기를 나타내는 폴리머 입자가 제조되고 감염된 질환자로부터의 혈청을 사용하여 스크리닝하여, 항원을 나타내는 입자를 확인하고, 분리하여, 잘 알려진 스케일가능한 박테리아 제조 시스템을 사용하여 재현된다.
- [0891] 하나의 실시양태에서, 세포-매개(또는 다른) 면역 반응을 유도할 수 있는 다수의 항원이 폴리머 입자의 표면에 고정된다.
- [0892] 하나의 실시양태에서, *마이코박테리움 투버쿨로시스* 박테리아로부터의 DNA가 예를 들면 절편화되고, 폴리머 신타제를 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 발현 구조물로 삽입된다. 상기 방법으로, *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원 결정기를 나타내는 폴리머 입자가 제조되고, 감염된 질환자로부터의 혈청을 사용하여 스크리닝하여 항원을 나타내는 입자가 확인되고, 분리되어 잘 알려진 스케일가능한 박테리아 제조 시스템을 사용하여 재현된다.
- [0893] 하나의 실시양태에서, 예를 들면 다수의 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 또는 다른 항원이 폴리머 입자의 표면에 고정된다.
- [0894] 유사하게, 다양한 실시양태에서, 간염 바이러스 또는 인플루엔자 바이러스로부터의 DNA가 예를 들면 절편화되고, 폴리머 신타제를 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 발현 구조물로 삽입된다. 상기 방법으로, 간염 항원 결정기 또는 인플루엔자 항원 결정기를 나타내는 폴리머 입자가 제조되고, 감염된 질환자로부터의 혈청을 사용하여 스크리닝하여 항원을 나타내는 입자가 확인되고, 분리되어, 잘 알려진 스케일가능한 박테리아 제조 시스템을 사용하여 재현된다.
- [0895] 하나의 실시양태에서, 다수의 간염 또는 인플루엔자 항원이 예를 들면 폴리머 입자의 표면에서 고정된다.
- [0896] 본 발명의 하나의 측면은 면역 반응을 유도하기 위한 1 이상의 항원을 운반하는 폴리머 입자의 역량에 관한 것이다. 하나의 실시양태에서, 상기 폴리머 입자는 폴리머 비드에 융합된 세포-매개 또는 다른 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함한다. 상기 폴리머 입자는 항원성 성분에 최적의 면역 반응을 자극하기 위해 이의 표면에서 세포-매개 또는 다른 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 나타낸다.
- [0897] 하나의 실시양태에서, 1 이상의 항원을 운반하는 폴리머 입자는 면역 반응을 유도한다. 하나의 실시양태에서, 폴리머 입자는 예를 들면 상기 폴리머 비드에 융합된 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원을 포함한다. 상기 폴리머 입자는 예를 들면 항원성 성분에 최적의 면역 반응을 자극하기 위해 이들 표면에서 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원을 나타낸다.
- [0898] 하나의 실시양태에서, 1 이상의 항원을 운반하는 폴리머 입자는 간염에 대한 면역 반응을 유도한다. 하나의 실시양태에서, 폴리머 입자는 예를 들면 상기 폴리머 비드에 융합된 1 이상의 간염 항원을 포함한다. 상기 폴리

머 입자는 예를 들면 항원성 성분에 최적의 면역 반응을 자극하기 위해 이들 표면에서 1 이상의 간염 항원을 나타낸다. 하나의 실시양태에서, 폴리머 입자는 예를 들면 상기 폴리머 비드에 융합된 1 이상의 인플루엔자 항원을 포함한다. 상기 폴리머 입자는 예를 들면 항원성 성분에 최적의 면역 반응을 자극하기 위해 이들 표면에서 1 이상의 인플루엔자 항원을 나타낸다. 다른 항원이 본 명세서에서 기술된 바와 같이 의도된다.

[0899] 하나의 실시양태에서, 예를 들면 1 이상의 항원 또는 항원 및 보조제 또는 다른 면역조절제 또는 분자, 예컨대 면역자극제 또는 분자의 조합체가 입자내에 또는 입자상에 존재하거나 또는 조성물내에 존재한다. 전형적으로, 항원, 보조제, 또는 다른 면역조절제 또는 분자의 결합체의 존재는 면역 반응을 추가로 향상시키기위해서 존재할 것이다.

[0900] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 예를 들면 다상(multiphase)의 백신 조성물을 제공한다. 상기 하이브리드(hybrid) 백신은 결핵 감염의 다양한 단계에 특이적인 상이한 항원을 나타낸다. 예를 들면, 초기 단계 항원은 잠재 단계 항원과 함께 발현된다. 세포내 항원을 포함하는 다양한 항원에 특이적인 항원은 당분야에 잘 알려져 있으며, 실례의 병원체에 대한 대표적인 항원이 본 명세서에 기술되었다.

[0901] 본 발명은 피험체에서 세포-매개(및/또는 다른) 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 이를 필요로 하는 피험체에게 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 폴리머 입자, 바람직하게는 폴리머 신타제를 투여하는 단계를 포함한다.

[0902] 본 실시양태에서, 상기 피험체에 투여시에 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역은 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 내인성 항원에 결합될 수 있다. 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 내인성 항원에 대해 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 폴리머 입자의 결합은 피험체의 면역 반응을 유도하거나 또는 향상시킬 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0903] 예를 들면, 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 포함하는 입자의 투여 전에 피험체에서 존재하는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 항원은 예를 들면 피험체에서 효과적인 면역 반응을 유도할 수 없고, 효과적인 면역 반응을 유도할 수 있는 입자에 결합할 수 있거나, 또는 피험체의 면역 반응을 향상시키는 데 효과적이다.

[0904] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 결핵에 감염되거나, 또는 결핵에 대해서 면역화된 피험체에서 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 이를 필요로 하는 피험체에서 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 폴리머 입자를 투여하는 단계를 포함한다.

[0905] 본 실시양태에서, 예를 들면 피험체에 투여시에 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원 결합 영역이 내인성 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원에 결합될 수 있다. 예를 들면 내인성 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원에 대한 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 포함하는 폴리머 입자의 결합은 피험체의 면역 반응을 유도하거나 또는 향상시킬 수 있는 것을 이해할 것이다.

[0906] 예를 들면, 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원 결합 영역을 포함하는 입자의 투여 전에 피험체에 존재하는 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원은 피험체에서 효과적인 면역 반응을 유도할 수 없고, 입자에 결합시에 효과적인 면역 반응을 유도할 수 있거나 또는 피험체의 면역 반응을 향상시키는데 효과적이다.

[0907] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 간염에 감염되거나 또는 간염에 대해 이미 면역화된 피험체에서 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 이를 필요로 하는 피험체에 간염 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 폴리머 입자를 투여하는 단계를 포함한다.

[0908] 본 실시양태에서, 피험체에 투여시에, 간염 항원 결합 영역은 예를 들면 내인성 간염 항원에 결합할 수 있다. 내인성 간염 항원으로서의 간염 항원 결합 영역을 포함하는 폴리머 입자의 결합은 피험체의 면역 반응을 유도하거나 또는 향상시킬 수 있는 것을 이해할 것이다.

[0909] 예를 들면, 적어도 하나의 간염 항원 결합 영역을 포함하는 입자의 투여 전에 피험체에 존재하는 간염 항원은 피험체에서 효과적인 면역 반응을 유도할 수 없거나, 입자에 결합시에 효과적인 면역 반응을 유도할 수 있거나, 또는 피험체의 면역 반응을 향상시키는데 효과적이다.

[0910] 하나의 실시양태에서, 예를 들면 본 발명은 인플루엔자에 감염되거나 또는 인플루엔자에 이미 면역화된 피험체에서 면역 반응을 유도할 수 있는 방법을 제공하며, 상기 방법은 이를 필요로 하는 피험체에 인플루엔자 항원 결합 영역에 융합된 입자-형성 단백질을 포함하는 폴리머 입자를 투여하는 방법을 제공한다.

- [0911] 본 실시양태에서, 예를 들면 피험체에 투여시에 인플루엔자 항원 결합 영역은 내인성 인플루엔자 항원에 결합될 수 있다. 내인성 인플루엔자 항원으로서의 인플루엔자 항원 결합 영역을 포함하는 폴리머 입자의 결합은 피험체의 면역 반응을 유도하거나 또는 향상시키는 것을 이해할 것이다.
- [0912] 예를 들면, 적어도 하나의 간염 항원 결합 영역을 포함하는 입자의 투여 전에 피험체에 존재하는 인플루엔자 항원은 피험체에서 효과적인 면역 반응을 유도할 수 없거나, 입자에 결합시에 효과적인 면역 반응을 유도할 수 있거나, 또는 피험체의 면역 반응을 향상시키는데 효과적이다.
- [0913] 본 발명은 피험체에 투여되어 피험체에서 면역 반응을 유도하는 입자, 조성물 및 방법을 제공하는 것을 이해할 것이다. 바람직하게, 본 발명의 입자, 조성물 및 방법을 사용하여 피험체에 존재하는 1 이상의 항원에 대한 반응으로 유도되는 면역 반응의 크기는 항원 단독에 대한 반응에서 유도되는 것보다 크다(즉, 본 발명의 입자 또는 조성물의 부재시에, 또는 본 명세서에 제공된 것 이외의 방법에 의해서 제공됨), 면역 반응, 특히 세포-매개 면역 반응의 크기를 정량화하는 방법이 당분야에 잘 알려져 있다.
- [0914] **9. 면역 반응의 조절제**
- [0915] 특정 상황에서, 세포-매개 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 포함하는 융합 단백질을 나타내는 폴리머 입자를 제공하는 것이 유익할 것이다. 선택적으로, 면역 반응의 보조제 또는 다른 조절제와 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 융합 단백질은 면역 반응을 유도하는데 유익하다.
- [0916] 특정 상황에서, 체액성 면역 반응을 유도할 수 있는 적어도 하나의 항원을 포함하는 융합 단백질을 나타내는 폴리머 입자를 제조하는 것이 유익할 것이다. 선택적으로, 면역 반응의 보조제 또는 다른 조절제와 체액성 면역 반응을 유도할 수 있는 1 이상의 항원을 포함하는 융합 단백질은 면역 반응을 유도하는데 유익하다.
- [0917] 예를 들면, 결합 치료시에 적어도 하나의 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원을 포함하는 융합 단백질을 나타내는 폴리머 입자를 제조하는 것이 유익하며, 상기 폴리머 입자가 면역 시스템의 1 이상의 보조제 또는 다른 조절제와 함께 투여된다. 선택적으로, 예를 들면 1 이상의 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원 및 면역 반응의 보조제 또는 다른 조절제를 포함하는 융합 단백질을 포함하는 폴리머 입자는 면역 반응을 유도하는데 유익할 수 있다. 간염의 치료시에, 적어도 하나의 간염 항원을 포함하는 융합 단백질을 나타내는 폴리머 입자를 제조하는데 유익하며, 상기 폴리머 입자는 면역 시스템의 1 이상의 보조제 또는 다른 조절제와 함께 투여된다. 선택적으로 1 이상의 간염 항원 및 면역 반응의 보조제 또는 다른 조절제를 포함하는 융합 단백질을 포함하는 폴리머 입자는 면역 반응을 유도하는데 유익할 것이다. 인플루엔자 치료시에, 적어도 하나의 인플루엔자 항원을 포함하는 융합 단백질을 나타내는 폴리머 입자를 제조하는데 유익하며, 상기 폴리머 입자가 상기 면역 시스템의 1 이상의 보조제 또는 다른 조절제와 함께 투여된다. 선택적으로, 1 이상의 인플루엔자 항원 및 면역 반응의 보조제 또는 다른 조절제를 포함하는 융합 단백질을 포함하는 폴리머 입자는 면역 반응을 유도하는데 유익할 수 있다.
- [0918] 하나의 실시예에서, 본 발명의 폴리머 입자는 1 이상의 톨(toll)형 수용체와 함께 1 이상의 항원을 포함할 수 있으며, LPS, 리포프로테인, 리포펩티드, 플라겔린(flagellin), 이중가닥 RNA, 비(非)메틸화 CpG 아일랜드, 또는 박테리아 또는 바이러스 DNA 또는 RNA를 포함하는 리간드 그룹의 1 이상을 결합할 수 있는 1 이상의 톨형 수용체를 포함한다. 유사하게, 본 발명의 조성물은 1 이상의 Tb 항원을 포함하는 폴리머 입자의 개체, 및 1 이상의 면역조절 분자를 포함하는 폴리머 입자의 개체, 예컨대 1 이상의 톨형 수용체를 포함할 수 있다.
- [0919] 1 이상의 면역조절 분자의 존재는 체액-특이적 면역 반응, 또는 세포-매개-특이적 면역 반응을 유도하거나, 또는 체액과 세포-매개 반응 모두의 결합체를 포함하는 면역 반응을 유도하는데 유용할 수 있다.
- [0920] 특정 항원은 상기에 기술된 것과 본 명세서에 언급된 문헌에 기술된 것을 포함하는 공지된 *마이코박테리움 투버쿨로시스* 항원으로부터 선택될 수 있다. 항원은 초기 단계 감염을 치료하거나 또는 면역화하기에 적당한 백신을 제조하기 위해서 선택될 수 있다. 선택적으로, 감염 초기 및 잠재 단계로부터의 항원을 포함하는 다단계 백신이 제공된다. 예를 들면, Ag85A-ESAT-6 융합 단백질을 나타내는 폴리머 입자를 포함하는 백신 송달 시스템이 제공된다. 두번째 실시예는 결핵에 대한 면역 반응을 자극하는데 적당한 공지된 보조제와 Ag85A 항원을 나타내는 폴리머 입자를 포함할 수 있다.
- [0921] 특정 항원은 상기에 기술된 것 및 본 명세서에 언급된 문헌에 기술된 것을 포함하는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 공지된 항원으로부터 선택될 수 있다. 항원은 초기 단계 감염을 치료하거나 또는 면역화하기에 적당한 백신을 제조하기 위해서 선택될 수 있다. 선택적으로, 감염의 초기 및 잠재 단계로부터의 항원을 포함하는 다단계 백신이 제공된다.

[0922] 본 발명은 상기와 이후에 실시예를 제공하는 고찰된 구성에 있다.

[0923] 실시예

[0924] 실시예 1 - *이. 콜리*에서 PHA 폴리머 입자의 제조 및 플라스미드의 구조

[0925] 본 실시예는 폴리머 입자의 면역원성의 분석과 함께, 결핵 항원 Ag-85A 및 ESAT-6, C형 간염 코어 항원 및 인플루엔자 헤마글루티닌(HA) 항원의 H1 서브타입을 나타내는 폴리머 입자의 *이. 콜리*에서 제조를 위한 플라스미드의 구조를 기술하였다.

[0926] 물질 및 방법

[0927] 1. *에스케리치아 콜리* 균주의 성장

[0928] *에스케리치아 콜리* DH5 α (Invitrogen)가 1%(w/w) 글루코스 및 75 μ g/mL의 암피실린이 보충된 Difco™ 루리아 배양액(Luria Broth)(표 1 참조)에서 배양한다. *에스케리치아 콜리* BL21(Invitrogen)은 1%(w/w) 글루코스, 75 μ g/mL의 암피실린 및 30 μ g/mL의 클로람페니콜이 보충된 Difco™ 루리아 배양액에서 배양한다.

표 1

Difco™ 루리아 배양액

카제인의 체장 소화물	10g
효모 추출물	5g
염화 나트륨	0.5g
1000mL 물에 용해됨	

[0929]

[0930] 2. 플라스미드의 구조

[0931] 본 실시예에서 사용된 모든 플라스미드 및 올리고뉴클레오티드가 하기 표 2에 기술되었다.

[0932] PhaA 및 PhaB 효소가 플라스미드 pMCS69에 의해서 코딩된다. 결핵 항원 폴리머 입자에 있어서, 플라스미드 DK1.2-Ag85A-ESAT-6은 Ag85A의 코딩 영역(분비 시그널 서열은 없음)(N-말단 성분) 및 ESAT-6의 코딩 영역(C-말단 성분)을 포함하는 하이브리드 유전자를 포함한다. Ag85A-ESAT-6 융합 단백질을 코딩하고 해독 개시 부위 및 개시 코돈을 포함하는 DNA 절편이 상기 플라스미드로부터 PCR에 의해서 프라이머 Ag85A-SpeI[서열 번호 3] 및 ESAT-6-SpeI[서열 번호 4]를 사용하여 분리되고, XbaI, ClaI-엔도뉴클레이즈된 pHAS 벡터로 결합되어 플라스미드 pHAS-Ag85A-ESAT-6을 생성한다.

[0933] Ag85A-ESAT6 융합의 3'OH 말단 절편으로부터의 코딩 서열이 서열 번호 1에 개시되었으며, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 2에 개시하였다.

[0934] C형 간염 항원 폴리머 입자에 있어서, SpeI/NotI 절편으로서 DNA 2.0에 의해서 합성된 Hep C DNA가 pET-14b-scFv-PhaC 벡터로 서브클로닝되어 pET-14b Hep-PhaC를 형성한다.

[0935] HepC-PhaC 융합의 3'OH 말단 절편으로부터의 코딩 서열은 서열 번호 7에 개시되었으며, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 8에 개시되었다.

[0936] HA 항원 폴리머 입자에 있어서, 전체 length 헤마글루티닌 서열은 SpeI/NotI 절편으로서 GenScript에 의해서 합성된다. 상기 절편은 pET-14b-scFv-PhaC 벡터로 서브클로닝되어 pET-14b 헤마글루티닌-PhaC를 형성한다. 헤마글루티닌 항원의 더 짧은 H1 부분을 생성하기 위해서, H1 서열은 주형으로서 pET-14b 헤마글루티닌-PhaC를 사용하여 하기 표 2에 기술된 프라이머에 의해서 증폭된다. SpeI/SunI 절편이 pET-14b 헤마글루티닌-PhaC로 서브클로닝되어 H3-PhaC의 pET-14b HA1을 형성한다. XhoI/BamHI 절편이 pET-14b PhaC-링커-Ma1E로 서브클로닝되어 H3의 pET-14b PhaC-링커-HA1을 형성한다.

[0937] H3-PhaC 융합의 HA1의 3'OH 말단 절편으로부터의 코딩 서열은 서열 번호 11에 개시되었으며, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 12에 개시되었다.

표 2

플라스미드 및 올리고뉴클레오티드

플라스미드	상세
pET-14b	Ap ^r , T7 프로모터
pHAS	시.네카타로부터 유래된 <i>phaC</i> 유전자로 삽입된 <i>NdeI/BamHI</i> 를 포함하는 pET14b 유도체
pMCS69	시.네카타로부터 유래된 유전자 <i>phaA</i> 및 <i>phaB</i> 를 포함하는 pBBR1MCS 유도체
pCWE <i>SpeI</i>	시.네카타로부터 유래된 PHA 신타제 유전자를 포함하는 유도된 pBluescript SK(-)
DK1.2-Ag85A-ESAT-6	Ag85A 와 ESAT-6 사이에 pBluescript II SK (+) 를 포함하는 융합
pCWE <i>SpeI</i> -Ag85AESAT-6	<i>SpeI</i> 부위로 삽입된 Ag85A-ESAT-6 하이브리드 유전자를 포함하는 pCWE 유도체
pHAS-Ag85A-ESAT-6	<i>phaC</i> 의 Ag85A-ESAT-6 하이브리드 유전자 업스트림을 포함하는 pHAS
올리고뉴클레오티드	
Ag85A- <i>SpeI</i>	5'-gctactagtaataaggagatatacatatgtttcccgccgggcttgc-3' [서열번호 5]
ESAT-6- <i>SpeI</i>	5'-tgcactagtgtgcgaacatccagtgacgtt-3' [서열번호 6]
HA1 of H3- <i>SpeI</i>	5'-agatactagtagtcagaaactgccgggtaacgataatagtacc-3' [서열번호 13]
HA1 of H3- <i>SunI</i>	5'-gatgcgtacgggtctgttttccggcacattgcgcatgcc-3' [서열번호 14]
HA1 of H3- <i>XhoI</i>	5'- agatctcgagcagaaactgccgggtaacgataatagtacc-3' [서열번호 15]
HA1 of H3- <i>BamHI</i>	5'-gatgggatcctcaggtctgttttccggcacattgcgcatgcc-3' [서열번호 16]

[0938]

[0939]

3. 폴리머 입자를 나타내는 Ag85A-ESAT-6의 제조

[0940]

플라스미드 pHAS-Ag85 A-ESAT-6 및 pHAS가 플라스미드 pMCS69을 갖는 *이. 콜리* BL21(DE3) 세포로 도입된다. 상기 형질전환체는 상기에 기술된 바와 같은 바이오폴리에스테르 폴리머 입자의 제조에 적당한 조건에서 배양된다. 그 후, Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자 또는 야생형 폴리머 입자를 제조하는 역량은 각각 하기에 기술된 바와 같이 평가된다.

[0941]

4. 기체 크로마토그래피 질량 분석(GC-MS)

[0942]

다양한 플라스미드를 갖는 박테리아 세포의 폴리에스테르 함유량은 생체내 PhaC 신타제의 활성화에 상응한다. 축적된 폴리에스테르의 양이 기체 크로마토그래피-질량 분석기(GC-MS) 분석에 의해서 평가하여 PhaC 신타제 활성을 측정하고, 특히 PhaC-Tb 항원 융합이 폴리에스테르 합성을 촉매화하고 세포내 과립 형성을 매개하는지를 평가한다. 폴리에스테르 함유량은 산-촉매화 메타노라이시스(methanolysis)에 의해서 폴리에스테르가 3-히드록시 메틸 에스테르로의 전환 이후에 GC-MS에 의해서 정량적으로 측정된다.

[0943]

결과

[0944]

pHAS-Ag85A-ESAT-6 및 pMCS69, 또는 pHAS 및 pMCS69를 운반하는 세포의 GC-MS 분석은 폴리에스테르 폴리히드록시부티레이트의 존재를 확인한다. 세포내 폴리에스테르 함유의 존재가 나일 레드 염색(Nile Red staining)을 사용하여 형광 현미경에 의해서 추가로 확인한다.

- [0945] 토의
- [0946] pHAS-Ag85A-ESAT-6 및 pMCS69를 운반하는 세포내 폴리히드록시부티레이트의 존재는 PhaC 폴리에스테르 신타제 영역이 3중(tripartite) 융합 단백질로 존재할 때 폴리머 신타제 활성을 보유하는 것을 나타낸다.
- [0947] 실시예 2 - 엘. 락티스에서 PHA 폴리머 입자의 제조 및 플라스미드의 구조
- [0948] 본 실시예는 엘. 락티스에서 결핵 항원 Ag-85A 및 ESAT-6을 나타내는 폴리머 입자의 제조를 위한 플라스미드의 구조를 나타낸다.
- [0949] 물질 및 방법
- [0950] 1. 플라스미드의 구조
- [0951] 본 실시예에서 사용된 엘. 락티스의 모든 플라스미드 및 균주가 표 3에 기술되었다. 항원(들) Ag85A/ESAT6을 코딩하는 유전자가 GeneScript Corporation (Piscataway, NJ)에 의해서 합성된다. 코돈 사용은 엘. 락티스의 코돈 사용 바이어스(codon usage bias)에 적합하게 한다.
- [0952] *nisA* 프로모터(P_{nisA})의 일부를 포함하는 pUC57-ZZ의 절편이 pUC57-ZZ의 NdeI 분해물(digest)에 의해서 수득되어 NdeI-분해된 pUC57-ESAT6으로 결합되어 pUC57-nisESAT6을 수득한다. 그 후, Ag85A/ESAT6 유전자 및 P_{nisA} 의 일부를 포함하는 pUC57-nisESAT6의 BstBI-BamHI 절편이 pNZ-AB의 해당하는 부위에서 *phaB*의 업스트림으로 삽입되어 pNZ-ESAT6-B를 수득한다. pNZ-ESAT6-B로 pNZ-CAB의 절편을 포함하는 *phaC* 및 *phaA*를 도입하기 위해서, 두 개의 플라스미드가 NheI 및 BamHI으로 가수분해하고 pNZ-CAB의 *phaCA* 절편과 pNZ-ESAT6-B로 삽입되어 pNZ-ESAT6-CAB를 수득한다.
- [0953] *nisA* 프로모터(P_{nisA})dnk 3'OH 말단 절편으로부터의 코딩 서열이 서열 번호 3에 개시되어 있고, 유래된 아미노산 서열이 서열 번호 4에 개시되었다.
- [0954] C형 간염 항원 폴리머 입자에 있어서, Hep C DNA 서열은 엘. 락티스에서 발현하기에 최적인 코돈이며, GenScript에 의해서 *NcoI/NheI* 절편으로서 합성된다. 상기 절편이 표 3에 기술된 바와 같이 pNZ-CAB 플라스미드로 서브클로닝되어 pNZ-HepC-PhaCAB를 형성한다.
- [0955] HepC-PhaC(pNZ) 융합의 3'OH 말단 절편으로부터의 코딩 서열은 서열 번호 9에 개시되어 있고, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 10에 개시되었다.

표 3

플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드

엘.락티스 균주	상세
MG1363	NCDO 712 유도체, 플라스미드 및 파아지 유리균주
NZ9000	MG1363 유도체, <i>pepN::nisRK</i>
플라스미드	상세
pUC57	클로닝 벡터, ColE1 기원, Amp ^r
pUC57-ESAT6	pUC57의 EcoRV 부위에서 Ag85A/ESAT6를 위한 코돈-최적화 유전자
pUC57-ZZ	pUC57의 EcoRV 부위에서 ZZ 영역을 위한 코돈-최적화 유전자
pUC-nisESAT6	pUC57 유도체, P _{nisa} -Ag85A/ESAT6
pNZ8148	Cm ^r , pSH71 기원, P _{nisa}
pNZ-AB	pUC8148 유도체, P _{nisa} - <i>phaAB</i>
pNZ-CAB	pUC8148 유도체, P _{nisa} - <i>phaCAB</i>
pNZ-ESAT6-B	pUC8148 유도체, P _{nisa} -Ag85A/ESAT6- <i>phaB</i>
pNZ-ESAT6-CAB	pUC8148 유도체, P _{nisa} -Ag85A/ESAT6- <i>phaC-phaAB</i>
pNZ-HepC-PhaCAB	pUC8148 유도체, P _{nisa} -HepC- <i>phaC-phaAB</i>

[0956]

[0957] 실시예 3 - 폴리에스테르 폴리머 입자의 분리 및 융합 단백질의 특성

[0958] 본 실시예는 이들 표면에서 Ag85A-ESAT-6을 나타내는 바이오폴리에스테르 폴리머 입자의 특성을 기술하였다.

[0959] 물질 및 방법

[0960] 1. 폴리에스테르 폴리머 입자의 분리

[0961] 폴리에스테르 과립이 박테리아를 파괴함으로써 분리하고 전체 세포 용해물(lysates)이 4000 g에서 15분 동안 4 °C에서 원리분리되어 폴리에스테르 폴리머 입자를 침전시킨다. 상기 폴리머 입자가 글리세롤 그라디언트 초원심분리(gradient ultracentrifugation)에 의해서 정제된다.

[0962] 2. 단백질 농도 측정

[0963] 폴리머 입자에 부착된 단백질의 농도가 제조자의 지시에 따라 Bio-Rad 단백질 분석을 사용하여 측정된다(Bio-Rad). 농도 측정 이후에, 단백질이 SDS-PAGE에 의해서 분리되어 SimplyBlue Safe Stain(Invitrogen)으로 염색된다.

[0964] 폴리머 입자에 부착된 전체 단백질의 양에 대한 Ag85A-ESAT-6 PhaC 융합 단백질의 양은 Gel Doc™ XR을 사용하여 검출되며, Quantity One 소프트웨어(버전 4.6.2, Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 분석된다. 목적하는 단백질이 겔로부터 잘라내어 MALDI-TOF-MS(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight spectrometry)를 사용하여 트립틱 펩타이드(tryptic peptide) 핑거프린팅(fingerprinting)한다.

[0965] 3. ELISA

[0966] Maxisorb 플레이트(Nunc)가 카보네이트-비카보네이트 코팅 완충액(pH 9.6)(Sigma-Aldrich)에서 희석된 정제된 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자 또는 야생형 폴리머 입자로 4 °C에서 한밤동안 코팅된다. 상기 완충액의 일련의 희석이 1 mg/ml에서 0.015 mg/ml 단백질 농도의 범위로 사용된다. 플레이트가 세척되고 25 °C에서 2시간동안 차단된다(표 4 참조).

[0967] 그 후, 플레이트가 PBS-트윈 20으로 세척되고, ESAT-6(Abcam)에 대한 마우스 항체로 배양되며, 세척되고, PBS에서 1%(w/v) BSA에서 희석된 항-마우스 IgG:서양고추냉이(horse radish) 퍼옥시다제(peroxidase

conjugate)(Sigma-Aldrich)와 실온에서 1시간동안 추가로 배양된다. 추가로 세척한 후에, o-페닐렌디아민(OPD) 기제(Sigma-Aldrich)가 첨가되고 플레이트가 실온에서 30분동안 배양된다.

반응은 0.5 M H₂SO₄로 정지시키고, 흡광도(absorbance)가 495 nm에서 기록된다.

4. 유세포 분석

정제된 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자 또는 야생형 폴리머 입자의 25 μ g이 빙냉(ice-cold)한 유세포 분석 완충액(표 4 참조)으로 2번 세척하고, 마우스 항-ESAT-6 항체(Abcam)와 배양한다. 세척한 후에, 폴리머 입자가 래트(rat) 항-마우스 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)-레이블된 항체(BD Pharmingen, CA, USA)로 염색하고, 어두운 빙냉한 상태에서 30분동안 배양하고, 다시 세척한다. A BD FACScalibur(BD Biosciences, CA, USA)가 사용되어 각 시료에 대해서 적어도 10,000 경우를 수집하고, CellQuest 소프트웨어를 사용하여 분석한다.

표 4

완충액

ELISA 세척 완충액	ELISA 차단 완충액	유세포 분석기 완충액
PBS 트윈 20 0.05%	PBS 소의 혈청 알부민 3%	PBS 소태아 혈청 아지드화나트륨 1% 0.1%

결과

상기 폴리머 입자는 주요 단백질 밴드에 의해서 측정되는 바와 같이 Ag85A-ESAT-6-PhaC 및 PhaC 각각에 있어서 102 kDa 및 63 kDa의 겔보기 분자량을 갖는 높은 단백질 수준을 나타낸다. 상기 단백질의 확인은 MALDI-TOF-MS를 사용하여 트립틱 펩티드 핑거프린팅에 의해서 확인된다. ELISA는 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자가 투여량-의존성 방식(dose-dependent manner)에서 항-ESAT-6 항체에 결합되고, 야생형 폴리머 입자는 항체에 결합되지 않은 것을 나타낸다. 유세포 분석은 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자의 >98%가 항-ESAT-6 항체와 결합하는 것을 보여준다.

토의

본 실시예의 결과는 삼중 융합 단백질 Ag85A-ESAT-6-PhaC를 코딩하는 하이브리드 유전자의 재조합 이. 콜리에서 발현이 성공적이므로 이들 표면에서 융합 단백질을 나타내는 폴리에스테르 폴리머 입자의 과잉생성이 수득되는 것을 나타낸다.

실시예 4 - 인플루엔자 폴리머 입자 백신의 면역원성

본 실시예는 폴리머 입자의 면역원성(immunogenicity)의 분석과 함께, 인플루엔자 항원 뉴라미니다제(neuraminidase), M1 인플루엔자 코트 단백질 및 헤마글루티닌을 동시에 나타내는 폴리머 입자의 형질전환된 숙주, 본 경우에는 이. 콜리에서 제조를 위한 플라스미드의 구조를 기술하였다.

물질 및 방법

모든 동물 실험이 AgResearch Grasslands 동물 윤리 위원회(Animal Ethics Committee)(Palmerston North, New Zealand)에 의해서 승인되었다.

1. 에스케리치아 콜리 균주의 성장

에스케리치아 콜리 DH5 α (Invitrogen)가 실시예 1의 표 1에 기술된 바와 같이 1%(w/w) 글루코스 및 75 μ g/mL의 암피실린이 보충된 Difco™ 루리아 배양액에서 배양된다. 에스케리치아 콜리 BL21(Invitrogen)가 1%(w/w) 글루코스, 75 μ g/mL의 암피실린 및 30 μ g/mL의 클로람페니콜이 보충된 Difco™ 루리아 배양액 또는 정의된 배지에서 배양한다.

2. 플라스미드의 구조

본 실시예에서 모든 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드가 표 5에 기술되었다. PhaA 및 PhaB 효소가 플라스미드 pMCS69에 의해서 코딩된다.

뉴라미니다제 항원을 나타내는 폴리머 입자를 제조하기 위해서, 뉴라미니다제를 코딩하는 유전자는 최적화된 코

돈이며, GenScript Inc에 의해서 *SpeI/SunI* 및 *XhoI/BamHI* 절편으로서 합성된다. *SpeI/SunI* 절편이 H3-PhaC 플라스미드의 pET-14b HA1으로 삽입되어 플라스미드 pET-14b-NA-PhaC를 나타낸다. *XhoI/BamHI* 절편이 pET-14b-PhaC-링커-MalE로 서브클로닝되어 플라스미드 pET-14b-PhaC-링커-NA를 수득한다.

[0985] M1 인플루엔자 코트 단백질을 나타내는 폴리머 입자를 제조하기 위해서, M1 유전자 서열은 최적화된 코돈이며, GenScript에 의해 *SpeI/SunI* 및 *XhoI/BamHI* 절편으로 합성된다. *SpeI/SunI* 절편이 H3-PhaC 플라스미드의 pET-14b HA1로 삽입되어 플라스미드 pET-14b-M1-PhaC를 수득한다. *XhoI/BamHI* 절편이 pET-14b-PhaC-링커-MalE로 서브클로닝되어 플라스미드 pET-14b-PhaC-링커-M1을 수득한다.

[0986] 모두 3개의 인플루엔자 항원을 동시에 나타내는 폴리머 입자를 제조하기 위해서, 플라스미드 pET-14b-NA-PhaC에서 유래된 *XbaI/NotI* 절편이 플라스미드 pET-14b-PhaC-링커-M1으로 서브클로닝하여 pET-Hb-NA-PhaC-링커-M1을 수득한다. 헤마글루티닌-PhaC는 실시예 1의 표 2에서 기술된 바와 같이 BamHI H3 프라이머를 사용하여 PCR 증폭된다. 각각의 *BamHI/BspI* 절편이 플라스미드 pET-14b-NA-PhaC-링커-M1으로 서브클로닝되어 플라스미드 pET-14b-NA-PhaC-링커-M1/헤마글루티닌-PhaC를 수득한다.

[0987] NA-PhaC 융합 및 PhaC-링커-NA 융합에 대한 구조는 서열 번호 17 및 서열 번호 19에서 각각 개시되었으며, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 18 및 서열 번호 20에 각각 개시되었다. M1-PhaC 융합 및 PhaC-링커-M1 융합에 대한 구조는 서열 번호 21 및 서열 번호 23에 각각 개시되었으며, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 22 및 서열 번호 24에 각각 개시되었다. NA-PhaC-링커-M1 융합에 대한 구조는 서열 번호 25에 개시되었으며, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 26에 개시되었다. 헤마글루티닌-PhaC 융합에 대한 구조는 서열 번호 27에 개시되었으며, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 28에 개시되었다.

표 5

플라스미드 및 올리고뉴클레오티드

플라스미드	상세
pHAS	시.네카타로부터 유래된 <i>phaC</i> 유전자로 삽입된 <i>NdeI/BamHI</i> 를 포함하는 pET14b 유도체
pMCS69	시.네카타로부터 유래된 유전자 <i>phaA</i> 및 <i>phaB</i> 를 포함하는 pBBR1MCS 유도체
pET-14b M-PhaC- 링커 - MalE	<i>phaC</i> 의 5'말단에 융합된 <i>mpl</i> 서열을 포함하는 pET-14b PhaC- 링커 -MalE 유도체
pET-14b-PhaC- 링커 -NA	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 NA 서열을 포함하는 pET-14b PhaC- 링커 -MalE 유도체
pET-14b-PhaC- 링커 -M1	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 M1 서열을 포함하는 pET-14b PhaC- 링커 -MalE 유도체
pET-14b-NA-PhaC- 링커 -M1/ 헤마글루티닌 - PhaC	<i>phaC</i> 의 5'말단에 융합된 NA 서열 및 <i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 M1/ 헤마글루티닌 서열을 포함하는 pET-14b PhaC- 링커 -MalE

[0988]

[0989] 3. AcpA-IgIC를 나타내는 입자의 제조

[0990] 플라스미드 pET-14b-PhaC-링커-NA, pET-14b-PhaC-링커-M1, pET-14b-NA-PhaC-링커-M1/헤마글루티닌-PhaC 및 pHAS가 플라스미드 pMCS69를 갖는 *E. coli* BL21(DE3) 세포로 도입된다. 상기 형질전환체가 실시예 1에 기술된 바와 같이 바이오폴리에스테르 입자의 제조에 적당한 조건에서 배양된다. NA, M1 또는 NA-M1-헤마글루티닌 입

자 또는 야생형 입자를 제조하는 역량은 하기에 기술된 바와 같이 평가된다.

[0991] 4. 기체 크로마토그래피 질량 분석(GC-MS)

[0992] 다양한 플라스미드를 갖는 박테리아 세포의 폴리에스테르 함유량은 생체내 PhaC 신타제의 활성에 상응한다. 축적된 폴리에스테르의 양이 기체 크로마토그래피-질량 분석기(GC-MS) 분석에 의해서 평가하여 PhaC 신타제 활성을 측정하고, 특히 PhaC-NA, Pha-M1 및 PhaC-NA-M1-HA 융합이 폴리에스테르 합성을 촉매화하고 세포내 과립 형성을 매개하는 것을 확인한다. 폴리에스테르 함유량은 산-촉매화 메타노라이시스(methanolysis)에 의해서 폴리에스테르가 3-히드록시메틸 에스테르로의 전환 이후에 GC-MS에 의해서 정량적으로 측정된다.

[0993] 5. 폴리에스테르 입자의 분리

[0994] 폴리에스테르 과립이 박테리아를 파괴함으로써 분리되고, 전체 세포 용해물이 4000 g에서 15분동안 4 °C에서 원심분리하여 폴리에스테르 입자를 침전시킨다. 상기 입자가 글리세롤 그라디언트 초원심분리에 의해서 정제된다.

[0995] 6. 단백질 농도 측정

[0996] 입자에 부착된 단백질의 농도가 제조자의 지시에 따라 Bio-Rad 단백질 분석을 사용하여 측정된다(Bio-Rad). 농도 측정 이후에, 단백질이 SDS-PAGE에 의해서 분리되어 SimplyBlue Safe Stain(Invitrogen)으로 염색된다.

[0997] 입자에 부착된 전체 단백질의 양에 대한 PhaC-NA, PhaC-M1 및 PhaC-NA-M1-HA 융합 단백질의 양은 Gel Doc™ XR을 사용하여 검출되며, Quantity One 소프트웨어(버전 4.6.2, Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 분석된다. 목적하는 단백질을 겔로부터 잘라내어 MALDI-TOF-MS(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight spectrometry)를 사용하여 트립틱 펩타이드(tryptic peptide) 핑거프린팅(fingerprinting)하여, 융합 단백질 영역을 확인한다.

[0998] 7. ELISA

[0999] Maxisorb 플레이트(Nunc)가 카보네이트-비카보네이트 코팅 완충액(pH 9.6)(Sigma-Aldrich)에서 희석된 정제된 PorA-C-PorB 입자 또는 HA, M1, NA-M1-HA 입자 또는 야생형 입자로 4 °C에서 한밤동안 코팅된다. 상기 완충액의 일련의 희석이 1 mg/ml에서 0.015 mg/ml 단백질 농도의 범위로 사용된다. 플레이트가 세척되고 25 °C에서 2 시간동안 차단된다(표 4 참조).

[1000] 그 후, 플레이트가 PBS-트윈 20으로 세척되고, 다양한 항원에 대한 생성된 마우스 항체와 배양되며, 세척되고, PBS에서 1%(w/v) BSA에서 희석된 항-마우스 IgG:서양고추냉이(horse radish) 퍼옥시다제 콘쥬게이트(peroxidase conjugate)(Sigma-Aldrich)와 실온에서 1시간동안 추가로 배양된다. 추가로 세척한 후에, o-페닐렌디아민(OPD) 기체(Sigma-Aldrich)가 첨가되고 플레이트가 실온에서 30분동안 배양된다.

[1001] 반응은 0.5 M H2SO4로 정지시키고, 흡광도가 495 nm에서 기록된다.

[1002] 8. 유세포 분석

[1003] 다양한 정제된 항원-표지 입자 또는 야생형 입자의 25 μ g이 실시예 3의 표 4에 기술된 바와 같이 빙냉한 유세포 분석 완충액으로 2번 세척하고, 마우스 항-항원 항체와 배양한다. 세척한 후에, 입자가 래트(rat) 항-마우스 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)-레이블된 항체(BD Pharmingen, CA, USA)로 염색하고, 어두운 빙냉한 상태에서 30분동안 배양하고, 다시 세척한다. A BD FACScalibur(BD Biosciences, CA, USA)가 사용되어 각 시료에 대해서 적어도 10,000 경우를 수집하고, CellQuest 소프트웨어를 사용하여 분석한다.

[1004] 9. 마우스의 면역화

[1005] 6-8주령의 암컷 C57BL/6 마우스(Malaghan Institute, Wellington, NZ)가 2주 간격으로 3번 근육내로 면역화한다. 3개의 치료 그룹은 하기와 같다:

[1006] (a) 각자는 야생형 입자(예를 들면, pHAS 및 pMCS69를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)로 면역화;

[1007] (b) 각자는 항원 입자 단독(예를 들면, 다양한 항원-PhaC 융합 단백질 및 pMCS69를 코딩하는 플라스미드를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)으로 면역화;

[1008] (c) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 다양한 항원 입자로 면역화.

[1009] 백신화되지 않은 대조군 동물은 각 실험 세트에 대해서 포함된다.

[1010] **10. 면역학적 분석**

[1011] 마우스가 최종 면역화하고 3주 후에 마취하고, 혈액을 수집하고, 원심분리하여, 혈청을 수집하고, 분석할 때까지 -20°C 에서 동결시킨다.

[1012] 상기 마우스는 그후 안락사시키고, 이의 비장을 제거하고, 단일 세포 현탁액이 80 게이지 와이어 메시 체(gauge wire mesh sieve)를 통과시킴으로써 제조된다. 비장 적혈구 세포(RBCs)가 17 mM TRIS-HCl 및 140 mM NH₄Cl의 용액을 사용하여 용해시킨다. 세척한 후에, 상기 RBCs가 2 mM의 글루타민(Invitrogen), 100 U/mL의 페니실린(Invitrogen), 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 스트렙토마이신(Invitrogen), 5x 10⁻⁵ M 2-머캅토에탄올(Sigma) 및 5%(w/w) 소테아 혈청(Invitrogen)이 보충된 Dulbecco 변형된 이글 배지(Modified Eagle media, DMEM)에서 배양된다.

[1013] 상기 세포가 배지 단독, 또는 각각의 항원을 포함하는 배지에서 10% CO₂에서 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양된다.

[1014] **11. IFN- γ 의 정량화**

[1015] 배양 상청액이 배양 4일 후에 제거되고 분석할 때까지 -20°C 에서 동결된다. 상기 상청액에서 IFN- γ 의 수준이 상업적으로 입수가 가능한 항체 및 표준(BD Pharmingen)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 ELISA(BD Bioscience s)에 의해서 측정된다.

[1016] **12. 혈청 항체의 정량화**

[1017] 혈청 항체가 항체 캡처를 위한 고정된 항원 표시된 입자를 사용하여 ELISA에 의해서 측정된다.

[1018] **13. 통계 분석**

[1019] IFN- γ 및 항체 반응의 분석이 가변의 Kruskal-Wallis one-way 분석(ANOVA)에 의해서 실시된다.

[1020] **결과**

[1021] 다양한 항원-PhaC 융합 단백질을 코딩하는 개별의 하이브리드 유전자의 재조합 *이. 콜리*에서 발현으로 이의 표면에서 융합 단백질을 나타내는 폴리에스테르 입자를 제조한다.

[1022] pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET-14b-PhaC-링커-NA, pET-14b-PhaC-링커-M1, pET-14b-NA-PhaC-링커-M1/헤마글루티닌-PhaC 및 pHAS를 운반하는 세포의 GC-MS 분석으로 폴리에스테르 폴리히드록시부티레이트의 존재를 확인한 것이다. 세포내 폴리에스테르 함유물의 존재는 Nile Red 염색을 사용하여 형광 현미경에 의해서 추가로 확인될 수 있다.

[1023] pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET-14b-PhaC-링커-NA, pET-14b-PhaC-링커-M1, pET-14b-NA-PhaC-링커-M1/헤마글루티닌-PhaC 및 pHAS (야생형 대조군)를 운반하는 세포에서 폴리히드록시부티레이트의 존재는 phaC 폴리에스테르 신타제 영역이 단일 또는 3중 융합 단백질로서 존재할 때 폴리머 신타제 활성을 보유하는 것을 나타낸다.

[1024] 폴리머 입자에 의한 고수준의 단백질 표시는 융합 단백질 서열로부터 제외된 분자량과 직접 관련된 겔보기 분자량을 갖는 우세한 단백질 밴드에 의해서 측정된다. 상기 단백질의 확인은 MALDI-TOF-MS를 사용하는 트립틱 펩티드 핑거프린팅에 의해서 확인된다. ELISA 결과는 다양한 항원 표시 입자는 투여량-의존성 방식으로 각각의 항-항원 항체에 결합되고, 야생형 입자는 항체 결합이 상당히 떨어지는 것으로 보이는 것을 나타낸다. 유세포 분석 결과는 항원 입자의 >98%가 항-항원 항체와 결합하는 것을 보여준다.

[1025] 바람직하게, 면역화 이후에 동물에서 명백한 독성이 관찰되지 않았으며, 마우스 체중은 실험 기간 동안의 그룹들 사이에서 상당히 다르지 않으며, 모든 그룹에서 마우스가 체중이 증가되었다. 폴리에스테르 입자로 면역화된 마우스는 면역화 부위에서 작은 혹(직경 2.5 mm)이 발생되었지만, 일반적으로 농양이나 화농이 없으며, 전형적으로 실험을 통해서 정상의 거동 및 양호한 품질의 털 상태를 갖는 건강한 상태이다.

[1026] 항원 입자의 10-100 μg 의 투여량은 마우스에서 상당한 항체 반응을 발생하는데 최적이다. 상기 투여량은 야생형 입자 단독의 10-100 μg 투여량과 비교할 때 상당히 더 높은 항체 역가를 유도한다. 다른 투여량이 또한 시험되고 사용될 수 있다. 면역화되지 않은 대조군을 포함하는 2번째 시험에서, 마우스는 보조제를 갖는 비드 조제와 보조제를 갖지 않는 비드 조제를 비교하고, 백신화되지 않은 마이스와 비교하여 항원 입자가 주어진 백신 그룹에 대한 상당히 더 높은 항원-특이성 혈청 항체 반응에 대해서 평가하였다. 최대 항체 반응은 Emulsigen에서 항원 입자로 면역화된 마우스에서 관찰될 수 있다. IgG1 이소타입에 대한 항체 반응은 두 실험에서 IgG2에 대한 반응보다 전형적으로 더 강할 것이다.

- [1027] 10-100 μ g 항원 입자로 면역화된 마우스의 항원에 대한 세포-매개 반응이 야생형 입자 단독, 또는 PBS 단독으로 면역화된 마우스와 비교하여 상당히 향상되었으며, PBS-면역화된 대조군 마우스와 비교하여 야생형 입자 단독으로 면역화된 마우스의 세포-매개 반응에서 전형적으로 상당한 차이가 없어야 한다.
- [1028] 10-100 μ g의 야생형 입자(인플루엔자 항원이 없음)로 3번 면역화된 마우스에서 각 항원에 대한 IFN- γ 반응은 전형적으로 PBS-면역화된 대조군 마우스의 반응과 상당한 차이는 없을 것이다. 대조적으로, 각 항원에 대한 상당히 더 큰 IFN- γ 반응이 항원 입자로 3번 면역화된 마우스, 및 항원 입자와 Emulsigen으로 3번 면역화된 마우스에서 관찰될 수 있다. 모든 다른 백신군에서보다 항원 입자와 Emulsigen로 3번 면역화된 마우스에서 관찰된 각 항원에 대한 상당히 큰 IFN- γ 반응이 기대된다.
- [1029] 뉴로아미니다제, M1 코트 단백질 또는 헤마글루티닌 항원을 나타내는 설계된 폴리에스테르 입자는 IgG1 및 IgG2 항체의 제조를 상당히 증가시킬 뿐만 아니라 항원-특이성 세포-매개 반응을 제조할 수 있다.
- [1030] 체액 및 세포-매개 면역 반응의 생성 뿐만 아니라, 중량 손실과 같은 부작용이 없고 주사 부위에서 농양과 화농이 없다는 것은 폴리에스테르 입자는 내성이 있고, 안전하며, 독성이 없다는 것을 나타낸다.
- [1031] **실시예 5 - 프란시셀라 툴라렌시스 폴리머 입자 백신의 면역원성**
- [1032] 본 실시예는 폴리머 입자의 면역원성의 분석과 함께, *프란시셀라 툴라렌시스*(*Francisella tularensis*) 항원 AcpA 및 Ig1C를 동시에 나타내는 폴리머 입자의 형질전환된 숙주, 본 경우에는 *이. 콜리*에서 제조를 위한 플라스미드의 구조를 나타낸다. 상기 항원을 갖는 입자는 야토병(Tularemia)에 대한 예방 및 치료 백신으로서 유용하다.
- [1033] **물질 및 방법**
- [1034] 모든 동물 실험은 AgResearch Grasslands 동물 윤리 위원회(Palmerston North, New Zealand)에 의해 승인되었다.
- [1035] **1. *이. 콜리*에서 PHA 입자의 제조 및 플라스미드의 구조**
- [1036] 본 실시예에서 모든 플라스미드 및 올리고뉴클레오티드가 표 6에 기술되었다. PhaA 및 PhaB 효소가 플라스미드 pMCS69에 의해서 코딩된다.
- [1037] 2개의 *에프. 툴라렌시스* 항원을 동시에 나타내는 폴리머 입자를 제조하기 위해서, 항원 AcpA 및 Ig1C를 코딩하는 유전자는 최적화된 코돈이며, Genscript Inc.에 의해서 합성되어 PhaC 폴리머 비드 형성 효소에 대한 N-말단 융합에 대한 pET-14b M-PhaC-링커-MalE XbaI-SpeI 부위 및 C-말단 융합에 대한 *XhoI-BamHI* 부위로 서브클로닝된다. AcpA 코딩 유전자가 *XbaI-SpeI* 부위로 삽입되고, 동일한 플라스미드에서 Ig1C 코딩 유전자가 *XhoI-BamHI* 부위로 삽입된다. 두 유전자 삽입은 치환된 원래 플라스미드의 M 및 MalE 코딩 영역과 프레임에 있으며, 플라스미드 pET14B-AcpA-C-Ig1C를 수득한다.
- [1038] AcpA-C-Ig1C 융합에 대한 구조는 서열 번호 29에서 개시되었으며, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 30에 개시하였다.

표 6

플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드

플라스미드	상세
pHAS	시.네카타로부터 유래된 <i>phaC</i> 유전자로 삽입된 <i>NdeI/BamHI</i> 를 포함하는 pET14b 유도체
pMCS69	시.네카타로부터 유래된 유전자 <i>phaA</i> 및 <i>phaB</i> 를 포함하는 pBBR1MCS 유도체
pET-14b M-PhaC- 링커 - MalE	<i>phaC</i> 의 5'말단에 융합된 <i>mpl</i> 서열을 포함하는 pET-14b PhaC- 링커 -MalE 유도체
pET14B-AcpA-C-IglC	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 <i>iglC</i> 및 5'말단에 융합된 <i>acpA</i> 서열을 포함하는 pET-14b M-PhaC- 링커 -MalE 유도체

[1039]

[1040]

플라스미드 pET14B-AcpA-C-IglC 및 pHAS가 플라스미드 pMCS69를 가진 *이. 콜리* BL21 (DE3) 세포로 도입된다. 상기 형질전환체가 실시예 1에 기술된 바와 같이 바이오폴리에스테르 입자의 제조에 적당한 조건에서 배양된다. AcpA-IglC 입자 또는 야생형 입자 각각을 제조하기 위한 역량은 하기에 기술된 바와 같이 평가된다.

[1041]

2. 폴리에스테르 입자의 분리

[1042]

폴리에스테르 과립이 박테리아를 파괴함으로써 분리되고, 전체 세포 용해물이 4000 g에서 15분동안 4 °C에서 원심분리하여 폴리에스테르 입자를 침전시킨다. 상기 입자가 글리세롤 그라디언트 초원심분리에 의해서 정제된다.

[1043]

입자에 부착된 단백질의 농도가 실시예 3에서 기술된 바와 같이 Bio-Rad 단백질 분석을 사용하여 측정된다.

[1044]

입자에 부착된 전체 단백질의 양에 대한 AcpA-PhaC-IglC 융합 단백질의 양은 Gel Doc™ XR을 사용하여 검출되며, Quantity One 소프트웨어(버전 4.6.2, Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 분석되고, 목적하는 단백질이 실시예 3에 개시된 바와 같이 확인되었다.

[1045]

3. ELISA

[1046]

에프. 툴라렌시스 폴리머 입자의 면역-반응성이 실시예 3에 기술된 바와 같이 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)에 의해 측정된다. 간단하게, Maxisorb 플레이트(Nunc)가 카보네이트-비카보네이트 코팅 완충액(pH 9.6)(Sigma-Aldrich)에서 희석된 정제된 PorA-C-PorB 입자 또는 AcpA-IglC 입자 또는 야생형 입자로 4 °C에서 한밤동안 코팅된다. 상기 완충액의 일련의 희석이 1 mg/ml에서 0.015 mg/ml 단백질 농도의 범위로 사용된다. 플레이트가 세척되고 25 °C에서 2시간동안 차단된다.

[1047]

그 후, 플레이트가 PBS-트윈 20으로 세척되고, 다양한 항원에 대해 생성된 마우스 항체와 배양되며, 세척되고, PBS에서 1%(w/v) BSA에서 희석된 항-마우스 IgG:서양고추냉이(horse radish) 퍼옥시다제 콘쥬게이트(peroxidase conjugate)(Sigma-Aldrich)와 실온에서 1시간동안 추가로 배양된다. 추가로 세척한 후에, o-페닐렌디아민(OPD) 기체(Sigma-Aldrich)가 첨가되고 플레이트가 실온에서 30분동안 배양된다.

[1048]

반응은 0.5 M H₂SO₄로 정지시키고, 흡광도가 495 nm에서 기록된다.

[1049]

4. 마우스의 면역화

[1050]

6-8주령의 암컷 C57BL/6 마우스(Malaghan Institute, Wellington, NZ)가 2주 간격으로 3번 근육내로 면역화한다. 3개의 치료 그룹은 하기와 같다:

[1051]

(a) 각자는 야생형 입자(예를 들면, pHAS 및 pMCS69를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)로 면역화;

- [1052] (b) 각자는 항원 입자 단독(예를 들면, 다양한 항원-PhaC 융합 단백질 및 pMCS69를 코딩하는 플라스미드를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)으로 면역화;
- [1053] (c) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 다양한 항원 입자로 면역화.
- [1054] 백신화되지 않은 대조군 동물은 각 실험 세트에 대해서 포함된다.
- [1055] **5. 면역학적 분석**
- [1056] 마우스가 최종 면역화하고 3주 후에 마취하고, 혈액을 수집하고, 원심분리하여, 혈청을 수집하고, 분석할 때까지 -20 °C에서 동결시킨다.
- [1057] 상기 마우스는 그후 안락사시키고, 이의 비장을 제거하고, 단일 세포 현탁액이 80 게이지 와이어 메시 체를 통과시킴으로써 제조된다. 비장 적혈구 세포(RBCs)가 실시예 4에 기술된 바와 같이 처리된다.
- [1058] **6. IFN- γ 의 정량화**
- [1059] 배양 상청액이 배양 4일 후에 제거되고 분석할 때까지 -20 °C에서 동결된다. 상기 상청액에서 IFN- γ 의 수준이 상업적으로 입수가 가능한 항체 및 표준(BD Pharmingen)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 ELISA(BD Biosciences)에 의해서 측정된다.
- [1060] **7. 혈청 항체의 정량화**
- [1061] 혈청 항체가 항체 캡처를 위한 고정된 항원 표시된 입자를 사용하여 ELISA에 의해서 측정된다.
- [1062] **8. 통계 분석**
- [1063] IFN- γ 및 항체 반응의 분석이 가변의 Kruskal-Wallis one-way 분석(ANOVA)에 의해서 실시된다.
- [1064] **결과**
- [1065] pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET14B-AcpA-C-Ig1C 및 pHAS를 운반하는 세포의 GC-MS 분석으로 폴리에스테르 폴리히드록시부티레이트의 존재를 확인할 것이다. 세포내 폴리에스테르 함유물의 존재는 Nile Red 염색을 사용하여 형광 현미경에 의해서 추가로 확인될 수 있다.
- [1066] pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET14B-AcpA-C-Ig1C 및 pHAS(야생형 대조군)를 운반하는 세포에서 폴리히드록시부티레이트의 존재는 phaC 폴리에스테르 신타제 영역이 단일 또는 3중 융합 단백질로서 존재할 때 폴리머 신타제 활성을 보유하는 것을 나타낸다.
- [1067] 입자에 의한 고수준의 단백질 표시는 융합 단백질 서열로부터 제외된 분자량과 직접 관련된 겔보기 분자량을 갖는 우세한 단백질 밴드에 의해서 측정된다. 상기 단백질의 확인은 MALDI-TOF-MS를 사용하는 트립틱 펩티드 핑거프린팅에 의해서 확인된다. ELISA 결과는 다양한 항원 표시 입자는 투여량-의존성 방식으로 각각의 항-항원 항체에 결합되고, 야생형 입자는 항체 결합이 상당히 떨어지는 것으로 보이는 것을 나타낸다. 유세포 분석 결과는 항원 입자의 >98%가 항-항원 항체와 결합하는 것을 보여준다.
- [1068] 다양한 항원-PhaC 융합 단백질을 코딩하는 각각의 하이브리드 유전자의 제조합 *이/리*에서 발현은 이의 표면에서 융합 단백질을 나타내는 폴리에스테르 입자의 제조를 나타낸다.
- [1069] 바람직하게, 면역화 이후에 동물에서 명백한 독성이 관찰되지 않았으며, 마우스 체중은 실험 기간 동안의 그룹들 사이에서 상당히 다르지 않으며, 모든 그룹에서 마우스가 체중이 증가되었다. 폴리에스테르 입자로 면역화된 마우스는 면역화 부위에서 작은 혹(직경 2.5 mm)이 발생되었지만, 일반적으로 농양이나 화농이 없으며, 전형적으로 실험을 통해서 정상의 거동 및 양호한 품질의 털 상태를 갖는 건강한 상태이다.
- [1070] 항원 입자의 10-100 μ g의 투여량은 마우스에서 상당한 항체 반응을 발생하는데 최적이다. 상기 투여량은 야생형 입자 단독의 10-100 μ g 투여량과 비교할 때 상당히 높은 항체 역가를 유도한다. 다른 투여량이 또한 시험되고 사용될 수 있다. 면역화되지 않은 대조군을 포함하는 2번째 시험에서, 마우스는 보조제를 갖는 비드 조제와 보조제를 갖지 않는 비드 조제를 비교하고, 백신화되지 않은 마이스와 비교하여 항원 입자가 주어진 백신 그룹에 대한 상당히 높은 항원-특이성 혈청 항체 반응에 대해서 평가하였다. 최대 항체 반응은 Emulsigen에서 항원 입자로 면역화된 마우스에서 관찰될 수 있다. IgG1 이소타입에 대한 항체 반응은 두 실험에서 IgG2에 대한 반응보다 전형적으로 더 강할 것이다.
- [1071] 10-100 μ g 항원 입자로 면역화된 마우스의 항원에 대한 세포-매개 반응이 야생형 입자 단독, 또는 PBS 단독으

로 면역화된 마우스와 비교하여 상당히 향상되었으며, PBS-면역화된 대조군 마우스와 비교하여 야생형 입자 단독으로 면역화된 마우스의 세포-매개 반응에서 전형적으로 상당한 차이가 없어야 한다.

[1072] 10-100 μ g의 야생형 입자(예프. 툴라렌시스 항원이 없음)로 3번 면역화된 마우스에서 각 항원에 대한 IFN- γ 반응은 전형적으로 PBS-면역화된 대조군 마우스의 반응과 상당한 차이는 없을 것이다. 대조적으로, 각 항원에 대한 상당히 더 큰 IFN- γ 반응이 항원 입자로 3번 면역화된 마우스, 및 항원 입자와 Emulsigen으로 3번 면역화된 마우스에서 관찰될 수 있다. 모든 다른 백신군에서보다 항원 입자와 Emulsigen로 3번 면역화된 마우스에서 관찰된 각 항원에 대한 상당히 큰 IFN- γ 반응이 기대된다.

[1073] 항원 AcpA 및 IgIC를 동시에 나타내는 설계된 폴리에스테르 입자는 IgG1 및 IgG2 항체의 생성을 상당히 증가시킬 뿐만 아니라 항원-특이성 세포-매개 반응을 생성할 수 있다.

[1074] 체액 및 세포-매개 면역 반응의 생성 뿐만 아니라, 중량 손실과 같은 부작용이 없고 주사 부위에서 농양과 화농이 없다는 것은 폴리에스테르 입자는 내성이 있고, 안전하며, 독성이 없다는 것을 나타낸다.

[1075] 실시예 6 - 브루셀라 아보르투스 폴리머 입자 백신의 면역원성

[1076] 본 실시예는 폴리머 입자의 면역원성의 분석과 함께, 브루셀라 아보르투스(*Bruceella abortus*) 항원 Omp16, 면역성 외부막 단백질을 나타내는 폴리머 입자의 형질전환된 숙주, 본 경우에는 *이. 콜리*에서 제조를 위한 플라스미드의 구조를 나타낸다. 본 실시예에서 제조되는 상기 항원을 나타내는 폴리머 입자는 브루셀라증(brucellosis)에 대한 예방 및 치료 백신으로서 유용하다.

[1077] 물질 및 방법

[1078] 모든 동물 실험은 AgResearch Grasslands 동물 윤리 위원회(Palmerston North, New Zealand)에 의해 승인되었다.

[1079] 1. 과잉발현 플라스미드 구조

[1080] 본 실시예에서 모든 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드가 표 7에 기술되었다. 베타-케토티올라제 및 아세토아세틸-코엔자임 A 환원효소가 플라스미드 pMCS69에 의해서 코딩되고, 아세틸 CoA를 3-히드록시부티릴-코엔자임 A로의 촉매적 전환에 의해서 기체에 폴리머 신타제를 제공한다.

[1081] *비. 아보르투스* Omp16을 나타내는 폴리머 입자를 제조하기 위해서, 항원 Omp16을 코딩하는 유전자는 최적화된 코돈이며, Genscript Inc.에 의해 합성되어 PhaC 폴리머 비드 형성 효소에 융합된 C-말단에 대한 pET-14b PhaC-링커-GFP XhoI-BamHI 부위로 서브클로닝된다. omp16을 코딩하는 유전자가 XhoI-BamHI 부위로 삽입된다. 상기 유전자 삽입은 치환된 원래 플라스미드의 GFP 코딩 영역과 프레임에 있고, 플라스미드 pET14B-C-omp16을 수득한다.

[1082] PhaC-omp16 융합에 대한 구조는 서열 번호 31에 개시되어 있으며, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 32에 개시되어 있다.

표 7

플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드

플라스미드	상세
pHAS	시.네카타로부터 유래된 <i>phaC</i> 유전자로 삽입된 <i>NdeI/BamHI</i> 를 포함하는 pET14b 유도체
pMCS69	시.네카타로부터 유래된 유전자 <i>phaA</i> 및 <i>phaB</i> 를 포함하는 pBBR1MCS 유도체
pET-14b PhaC- 링커 - GFP	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 GFP 코딩 DNA 서열을 포함하는 pET-14b 유도체
pET14B-C-omp16	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 Omp16 코딩 DNA 서열을 포함하는 pET-14b PhaC- 링커 -GFP 유도체

[1083]

[1084]

2. Omp16을 나타내는 입자의 제조

[1085]

플라스미드 pET14B-C-omp16 및 pHAS가 플라스미드 pMCS69를 갖는 *이. 콜리* KRX 세포로 도입된다. 형질전환체가 실시예 1에 기술된 바와 같이 바이오폴리에스테르 입자의 생성에 적당한 조건에서 배양된다.

[1086]

3. 폴리에스테르 입자의 분리

[1087]

폴리에스테르 과립이 실시예 3에 기재된 바와 같이 분리된다. 입자에 부착된 단백질의 농도가 실시예 3에서 기술된 바와 같이 Bio-Rad 단백질 분석을 사용하여 측정되고, 목적하는 단백질이 실시예 3에 기술된 바와 같이 MALDI-TOF-MS를 사용하여 확인된다.

[1088]

4. ELISA

[1089]

비. 아보르투스 폴리머 입자의 면역-반응성이 다양한 항원에 대해서 생성된 마우스 항체를 사용하여 실시예 3에 기술된 바와 같이 ELISA에 의해 측정된다.

[1090]

5. 마우스의 면역화

[1091]

6-8주령의 암컷 C57BL/6 마우스(Malaghan Institute, Wellington, NZ)가 2주 간격으로 2번 복강내(i.p.)로 면역화한다. 3개의 치료 그룹은 하기와 같다:

[1092]

(a) 각자는 야생형 입자(예를 들면, pHAS 및 pMCS69를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)로 면역화;

[1093]

(b) 각자는 항원 입자 단독(예를 들면, 다양한 항원-PhaC 융합 단백질 및 pMCS69를 코딩하는 플라스미드를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)으로 면역화;

[1094]

(c) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 다양한 항원 입자로 면역화.

[1095]

백신화되지 않은 대조군 동물은 각 실험 세트에 대해서 포함된다.

[1096]

6. 면역학적 분석

[1097]

마우스가 최종 면역화하고 3주 후에 마취하고, 혈액을 수집하고, 원심분리하여, 혈청을 수집하고, 분석할 때까지 -20 °C에서 동결시킨다. 상기 마우스는 그후 안락사시키고, 이의 비장을 제거하고, 단일 세포 현탁액이 80 게이지 와이어 메시 체를 통과시킴으로써 제조된다. 비장 적혈구 세포(RBCs)가 17 mM TRIS-HCl 및 140 mM NH₄Cl의 용액을 사용하여 용해된다. 세척 후에, 상기 RBCs가 2 mM의 글루타민(Invitrogen), 100 U/mL의 페니실린(Invitrogen), 100 µg/mL의 스트렙토마이신(Invitrogen), 5x 10⁻⁵ M 2-머캅토에탄올(Sigma) 및 5%(w/w) 소태아 혈청(Invitrogen)이 보충된 Dulbecco 변형된 이글 배지(Modified Eagle media, DMEM)에서 배양된다.

상기 세포가 배지 단독, 또는 각각의 항원을 포함하는 배지에서 10% CO₂에서 37 °C에서 배양된다.

7. IFN- γ 의 정량화

배양 상청액이 배양 4일 후에 제거되고 분석할 때까지 -20 °C에서 동결된다. 상기 상청액에서 IFN- γ 의 수준이 상업적으로 입수가 가능한 항체 및 표준(BD Pharmingen)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 ELISA(BD Bioscience s)에 의해서 측정된다.

8. 혈청 항체의 정량화

혈청 항체가 항체 캡처를 위한 고정된 항원 표시된 입자를 사용하여 ELISA에 의해서 측정된다.

9. 통계 분석

IFN- γ 및 항체 반응의 분석이 가변의 Kruskal-Wallis one-way 분석(ANOVA)에 의해서 실시된다.

결과

pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET14B-C-omp16 및 pHAS를 운반하는 세포의 GC-MS 분석으로 폴리에스테르 폴리히드록시부티레이트의 존재를 확인할 것이다. 세포내 폴리에스테르 함유물의 존재는 Nile Red 염색을 사용하여 형광 현미경에 의해서 추가로 확인될 수 있다.

pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET14B-C-omp16 및 pHAS(야생형 대조군)를 운반하는 세포에서 폴리히드록시부티레이트의 존재는 PhaC 폴리에스테르 신타제 영역이 단일 또는 3중 융합 단백질로서 존재할 때 폴리머 신타제 활성을 보유하는 것을 나타낸다.

입자에 의한 고수준의 단백질 표시는 융합 단백질 서열로부터 제외된 분자량과 직접 관련된 겔보기 분자량을 갖는 우세한 단백질 밴드에 의해서 측정된다. 상기 단백질의 확인은 MALDI-TOF-MS를 사용하는 트립틱 펩티드 핑거프린팅에 의해서 확인된다. ELISA 결과는 다양한 항원 표시 입자는 투여량-의존성 방식으로 각각의 항-항원 항체에 결합되고, 야생형 입자는 항체 결합이 상당히 떨어지는 것으로 보이는 것을 나타낸다. 유세포 분석 결과는 항원 입자의 >95%가 항-항원 항체와 결합하는 것을 보여준다. PhaC-항원 융합 단백질을 코딩하는 각각의 하이브리드 유전자의 재조합 *in vitro* 콜리에서 발현은 이의 표면에서 융합 단백질을 나타내는 폴리에스테르 입자의 생성을 나타낸다.

바람직하게, 면역화 이후에 동물에서 명백한 독성이 관찰되지 않았으며, 마우스 체중은 실험 기간 동안의 그룹들 사이에서 상당히 다르지 않으며, 모든 그룹에서 마우스가 체중이 증가되었다(데이터가 개시되지 않음). 폴리에스테르 입자로 면역화된 마우스는 전형적으로 실험을 통해서 정상의 거동 및 양호한 품질의 털 상태를 갖는 건강한 상태이다.

항원 입자의 10-50 μ g의 투여량 범위는 마우스에서 상당한 항체 반응을 발생한다. 상기 투여량은 야생형 입자 단독의 10-50 μ g 투여량과 비교할 때 상당히 높은 항체 역가를 유도한다. 다른 투여량이 또한 시험되고 예를 들면 50-500 μ g이 사용될 수 있다. 면역화되지 않은 대조군을 포함하는 2번째 시험에서, 마우스는 보조제를 갖는 비드 조제와 보조제를 갖지 않는 비드 조제를 비교하고, 백신화되지 않은 마이스와 비교하여 항원 입자가 주어진 백신 그룹에 대한 상당히 높은 항원-특이성 혈청 항체 반응에 대해서 평가하였다. 최대 항체 반응은 Emulsigen에서 항원 입자로 면역화된 마우스에서 관찰될 수 있다. IgG1 이소타입에 대한 항체 반응은 두 실험에서 IgG2에 대한 반응보다 전형적으로 더 강할 것이다.

10-50 μ g 항원 입자로 면역화된 마우스의 항원에 대한 세포-매개 반응이 야생형 입자 단독, 또는 PBS 단독으로 면역화된 마우스와 비교하여 상당히 향상되었으며, PBS-면역화된 대조군 마우스와 비교하여 야생형 입자 단독으로 면역화된 마우스의 세포-매개 반응에서 전형적으로 상당한 차이가 없어야 한다.

10-50 μ g의 야생형 입자(*H. 아보르투스* 항원이 없음)로 2번 면역화된 마우스에서 각 항원에 대한 IFN- γ 반응은 전형적으로 PBS-면역화된 대조군 마우스의 반응과 상당한 차이는 없을 것이다. 대조적으로, 각 항원에 대한 상당히 더 큰 IFN- γ 반응이 항원 입자로 2번 면역화된 마우스, 및 항원 입자와 Emulsigen으로 2번 면역화된 마우스에서 관찰될 수 있다. 모든 다른 백신군에서보다 항원 입자와 Emulsigen로 2번 면역화된 마우스에서 관찰된 각 항원에 대한 상당히 큰 IFN- γ 반응이 기대된다.

항원 Omp16을 나타내는 설계된 폴리에스테르 입자는 IgG1 및 IgG2 항체의 생성을 상당히 증가시킬 뿐만 아니라 항원-특이성 세포-매개 반응을 생성할 수 있다.

- [1113] 체액 및 세포-매개 면역 반응의 생성 뿐만 아니라, 중량 손실과 같은 부작용이 없고 주사 부위에서 농양과 화농이 없다는 것은 폴리에스테르 입자는 내성이 있고, 안전하며, 독성이 없다는 것을 나타낸다.
- [1114] **실시예 7 - *나이세리아 메닝기티디스* 폴리머 입자 백신의 면역원성**
- [1115] 본 실시예는 폴리머 입자의 면역원성의 분석과 함께, 화학적으로 가교 또는 비공유결합된 *나이세리아 메닝기티디스*(*Neisseria meningitidis*) B 캡슐리 폴리사카라이드(CPS) 뿐만 아니라 *나이세리아 메닝기티디스* 항원 PorA, PorB, FetA, ZnuD를 나타내는 폴리머 입자의 형질전환된 숙주, 본 경우에는 *E. coli*에서 제조를 위한 플라스미드의 구조를 나타낸다. 상기 항원을 갖는 입자는 뇌막염(meningitis)에 대한 예방 및 치료 백신으로서 유용하다.
- [1116] **물질 및 방법**
- [1117] 모든 동물 실험은 AgResearch Grasslands 동물 윤리 위원회(Palmerston North, New Zealand)에 의해 승인되었다.
- [1118] **1. 플라스미드의 구조**
- [1119] 본 실시예에 대한 모든 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드가 하기 표 8에 기술되었다.
- [1120] PhaA 및 PhaB 효소가 플라스미드 pMCS69에 의해서 코딩된다. 6개의 시스테인-PhaC 융합 단백질을 코딩하고 해독 개시 부위 및 개시 코돈을 포함하는 DNA 절편은 주형으로서 프라이머 Cys6-*XbaI*[서열 번호 55] 및 PhaC-C-*BamHI*[서열 번호 56]을 사용하여 PCR에 의해서 *랄스토니아 유티트로파*(*Ralstonia eutropha*) H16으로부터 분리된 게놈성 DNA로부터 취득된다. 상기 PCR 생성물이 *XbaI*, *BamHI*-엔도뉴클레이즈된 pET14B 벡터로 절찰되어 플라스미드 pET-14b-Cys6-PhaC를 생성한다.
- [1121] 2개의 *나이세리아 메닝기티디스* 항원들을 동시에 나타내는 폴리머 입자를 제조하기위해서, 항원들 PorA, PorB, FetA, ZnuD를 코딩하는 유전자는 최적화된 코돈이며, Genscript Inc.에 의해서 합성되어 PhaC 폴리머 비드 형성 효소에 융합된 C-말단에 대해 *XhoI*-*BamHI* 부위 및 N -말단에 대해 pET-14b M-PhaC-링커-MalE *XbaI*-*SpeI* 부위로 서브클로닝한다. PorA 코딩 유전자가 *XbaI*-*SpeI* 부위로 삽입되고, 동일한 플라스미드에서 PorB 코딩 유전자가 *XhoI*-*BamHI* 부위로 삽입된다. 두 유전자 삽입이 치환된 원래 플라스미드의 M 및 MalE 코딩 영역과 프레임에 있으며, 플라스미드 pET14B-PorA-C-PorB를 취득한다.
- [1122] FetA 코딩 유전자가 *XbaI*-*SpeI* 부위로 삽입되고, 동일한 플라스미드에서 ZnuD 코딩 유전자가 *XhoI*-*BamHI* 부위로 삽입된다. 두 유전자 삽입이 치환된 원래 플라스미드의 M 및 MalE 코딩 영역과 프레임에 있으며, 플라스미드 pET14B-FetA-C-ZnuD를 취득한다.
- [1123] Cys6-PhaC 융합에 대한 구조가 서열 번호 33에 개시되어 있으며, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 34에 개시되어 있다. PorA-C-PorB 융합에 대한 구조는 서열 번호 35에 개시되어 있고, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 36에 개시되어 있다. FetA-C-ZnuD 융합에 대한 구조는 서열 번호 37에 개시되어 있으며, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 38에 개시되어 있다.

표 8

플라스미드 및 올리고뉴클레오티드

플라스미드	상세
pET-14b	Ap ^r , T7 프로모터
pHAS	시. 네카타로부터 유래된 <i>phaC</i> 유전자로 삽입된 <i>NdeI/BamHI</i> 를 포함하는 pET14b 유도체
pET-14b-Cys6-PhaC	시스테인 잔기로 삽입된 5'연장 코딩 6개의 N-말단을 갖는 시. 네카타로부터 유래된 <i>phaC</i> 유전자로 삽입된 <i>NdeI/BamHI</i> 를 포함하는 pET14b 유도체
pMCS69	시. 네카타로부터 유래된 유전자 <i>phaA</i> 및 <i>phaB</i> 를 포함하는 pBBR1MCS 유도체
pET-14b M-PhaC-링커-MalE	<i>phaC</i> 의 5'말단에 융합된 <i>mpl</i> 서열을 포함하는 pET-14b PhaC-링커-MalE 유도체
pET14B-PorA-C-PorB	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 <i>porB</i> 및 5'말단에 융합된 <i>porA</i> 서열을 포함하는 pET-14b M-PhaC-링커-MalE 유도체
pET14B-FetA-C-ZnuD	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 <i>znuD</i> 및 5'말단에 융합된 <i>fetA</i> 서열을 포함하는 pET-14b M-PhaC-링커-MalE 유도체
Cys6-XbaI	5'-cgcccttggccggtgcacacaacaacaacaacacatactagtatctccttatttctagaggga-3' [서열번호 55]
PhaC-C-BamHI	5'-gatacgtcaaagccaaggcatgtagggatccggctgctaacaag-3' [서열번호 56]

[1124]

[1125]

2. Cys-6, PorA/B 및 FetA/ZnuD를 나타내는 입자의 제조

[1126]

플라스미드 pET-14b-Cys6-PhaC, pET14B-PorA-C-PorB, pET14B-FetA-C-ZnuD 및 pHAS가 플라스미드 pMCS69를 갖는 *E. coli* BL21(DE3) 세포로 도입된다. 형질전환체가 실시예 1에 기술된 바와 같이 바이오폴리에스테르 입자의 제조에 적당한 조건에서 배양된다.

[1127]

3. 폴리에스테르 입자의 분리

[1128]

폴리에스테르 과립이 박테리아를 파괴함으로써 분리되고, 전체 세포 용해물이 4000 g에서 15분동안 4 °C에서 원심분리하여 폴리에스테르 입자를 침전시킨다. 상기 입자가 글리세롤 그라디언트 초원심분리에 의해서 정제된다.

[1129]

입자에 부착된 단백질의 농도가 실시예 3에서 기술된 바와 같이 Bio-Rad 단백질 분석을 사용하여 측정된다. 농도 측정 이후에, 상기 단백질은 SDS-PAGE에 의해서 분리되고, SimplyBlue Safe Stain(Invitrogen)으로 염색된다.

[1130]

입자에 부착된 전체 단백질의 양에 대한 Cys6-C, PorA-C-PorB 또는 FetA-C-ZnuD 융합 단백질의 양은 각각 Gel Doc™ XR을 사용하여 검출되며, Quantity One 소프트웨어(버전 4.6.2, Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 분석되고, 목적하는 단백질은 MALDI-TOF-MS를 사용하여 확인한다. Cys6-C의 경우에 N-말단 서열화가 사용되어 PhaC의 N-말단에서 6개의 시스테인 잔기의 존재를 확인한다.

[1131] **4. Cys6 폴리에스테르 입자로 엔. 메닌기티디스 CPS의 화학적 가교**

[1132] Cys6 입자로의 캡슐러 폴리사카라이드(CPS)의 화학적 가교가 Annunziato 등에 의해서 이미 기술된 바와 같이 정제된 엔. 메닌기티디스 CPS 및 화학적 가교제 PMPI(N-[*p*-말레이미도페닐]이소시아네이트)를 사용하여 수득된다. PMPI는 *칼스토니아 유티로파(Ralstonia eutropha)*로부터의 폴리머 입자 형성 효소인 PHA 신타제의 N 말단으로 설계된 6개의 시스테인 잔기를 나타내는 폴리머 입자로 엔. 메닌기티디스 CPS의 공유 결합하는 티올 결합에 대한 히드록실에 대한 헤테로이관능성 링커이다.

[1133] **5. 특이성 항체를 나타내는 폴리에스테르 입자로 엔. 메닌기티디스 CPS의 비공유 결합**

[1134] CPS 특이성 항체가 토끼를 면역화함으로써 생성한다. 단일특이성 폴리클로날 세라(monospecific polyclonal sera)가 단백질 A 친화도 정제를 실시한다. 수득된 정제된 IgG가 폴리에스테르 입자를 나타내는 ZZ 영역으로 결합된다. 그 후, 상기 입자들은 건조 중량 기준으로 1:1의 비율을 사용하여 엔. 메닌기티디스 CPS와 30분동안 배양한다. 상기는 폴리에스테르 입자로의 CPS의 특이적이지만 비공유 결합을 나타낸다.

[1135] **6. ELISA**

[1136] 엔. 메닌기티디스 폴리머 입자의 면역-반응성이 다양한 항원에 대해서 생성된 마우스 항체를 사용하여 실시예 3에 기술된 바와 같이 ELISA에 의해 측정된다.

[1137] **7. 마우스의 면역화**

[1138] 6-8주령의 암컷 C57BL/6 마우스(Malaghan Institute, Wellington, NZ)가 2주 간격으로 3번 근육내로 면역화한다. 3개의 치료 그룹은 하기와 같다:

[1139] (a) 각자는 야생형 입자(예를 들면, pHAS 및 pMCS69를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)로 면역화;

[1140] (b) 각자는 항원 입자 단독(예를 들면, 다양한 항원-PhaC 융합 단백질 및 pMCS69를 코딩하는 플라스미드를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)으로 면역화;

[1141] (c) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 다양한 항원 입자로 면역화.

[1142] 백신화되지 않은 대조군 동물은 각 실험 세트에 대해서 포함된다.

[1143] **8. 면역학적 분석**

[1144] 마우스가 최종 면역화하고 3주 후에 마취하고, 혈액을 수집하고, 원심분리하여, 혈청을 수집하고, 분석할 때까지 -20 °C에서 동결시킨다.

[1145] 상기 마우스는 그후 안락사시키고, 이의 비장을 제거하고, 단일 세포 현탁액이 80 케이지 와이어 메시 체를 통과시킴으로써 제조된다. 비장 적혈구 세포(RBCs)가 실시예 4에 기술된 바와 같이 처리된다.

[1146] **9. IFN- γ 의 정량화**

[1147] 배양 상청액이 배양 4일 후에 제거되고 분석할 때까지 -20 °C에서 동결된다. 상기 상청액에서 IFN- γ 의 수준이 실시예 4에 기술된 바와 같이 ELISA(BD Biosciences)에 의해서 측정된다.

[1148] **10. 혈청 항체의 정량화**

[1149] 혈청 항체가 항체 캡처를 위한 고정된 항원 표시된 입자를 사용하여 ELISA에 의해서 측정된다.

[1150] **11. 통계 분석**

[1151] IFN- γ 및 항체 반응의 분석이 가변의 Kruskal-Wallis one-way 분석(ANOVA)에 의해서 실시된다.

[1152] **결과**

[1153] pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET-14b-Cys6-PhaC, pET14B-PorA-C-PorB, pET14B-FetA-C-ZnuD 및 pHAS를 운반하는 세포의 GC-MS 분석으로 폴리에스테르 폴리히드록시부티레이트의 존재를 확인할 것이다. 세포내 폴리에스테르 합입물의 존재는 Nile Red 염색을 사용하여 형광 현미경에 의해서 추가로 확인될 수 있다.

[1154] pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET-14b-Cys6-PhaC, pET14B-PorA-C-PorB, pET14B-FetA-C-ZnuD 및 pHAS(야생형 대조군)를 운반하는 세포에서 폴리히드록시부티레이트의 존재는 PhaC 폴리에스테르 신타제 영역이 단일 또는 3중 융합 단백질로서 존재할 때 폴리머 신타제 활성을 보유하는 것을 나타낸다.

- [1155] 입자에 의한 고수준의 단백질 표시는 융합 단백질 서열로부터 제외된 분자량과 직접 관련된 겔보기 분자량을 갖는 우세한 단백질 밴드에 의해서 측정된다. 상기 단백질의 확인은 MALDI-TOF-MS를 사용하는 트립틱 펩티드 핑거프린팅에 의해서 확인된다. ELISA 결과는 다양한 항원 표시 입자는 투여량-의존성 방식으로 각각의 항-항원 항체에 결합되고, 야생형 입자는 항체 결합이 상당히 떨어지는 것으로 보이는 것을 나타낸다. 유세포 분석 결과는 항원 입자의 >98%가 항-항원 항체와 결합하는 것을 보여준다.
- [1156] 다양한 항원-PhaC 융합 단백질을 코딩하는 각각의 하이브리드 유전자의 재조합 *이. 콜리*에서 발현은 *이*의 표면에서 융합 단백질을 나타내는 폴리에스테르 입자의 생성을 나타낸다.
- [1157] 바람직하게, 면역화 이후에 동물에서 명백한 독성이 관찰되지 않았으며, 마우스 체중은 실험 기간 동안의 그룹들 사이에서 상당히 다르지 않으며, 모든 그룹에서 마우스가 체중이 증가되었다. 폴리에스테르 입자로 면역화된 마우스는 면역화 부위에서 작은 혹(직경 2.5 mm)이 발생되었지만, 일반적으로 농양이나 화농이 없으며, 전형적으로 실험을 통해서 정상의 거동 및 양호한 품질의 털 상태를 갖는 건강한 상태이다.
- [1158] 항원 입자의 5-50 μ g의 투여량 범위는 마우스에서 상당한 항체 반응을 발생한다. 상기 투여량은 야생형 입자 단독의 5-50 μ g 투여량과 비교할 때 상당히 높은 항체 역가를 유도한다. 다른 투여량이 또한 시험되고 사용될 수 있다. 면역화되지 않은 대조군을 포함하는 2번째 시험에서, 마우스는 보조제를 갖는 비드 조제와 보조제를 갖지 않는 비드 조제를 비교하고, 백신화되지 않은 마우스와 비교하여 항원 입자가 주어진 백신 그룹에 대한 상당히 높은 항원-특이성 혈청 항체 반응에 대해서 평가하였다. 최대 항체 반응은 Emulsigen에서 항원 입자로 면역화된 마우스에서 관찰될 수 있다. IgG1 이소타입에 대한 항체 반응은 두 실험에서 IgG2에 대한 반응보다 전형적으로 더 강할 것이다.
- [1159] 5-50 μ g 항원 입자로 면역화된 마우스의 항원에 대한 세포-매개 반응이 야생형 입자 단독, 또는 PBS 단독으로 면역화된 마우스와 비교하여 상당히 향상되었으며, PBS-면역화된 대조군 마우스와 비교하여 야생형 입자 단독으로 면역화된 마우스의 세포-매개 반응에서 전형적으로 상당한 차이가 없어야 한다.
- [1160] 40 μ g의 야생형 입자(*엔. 메닌기티디스* 항원이 없음)로 3번 면역화된 마우스에서 각 항원에 대한 IFN- γ 반응은 PBS-면역화된 대조군 마우스의 반응과 상당한 차이는 없을 것이다. 대조적으로, 각 항원에 대한 상당히 더 큰 IFN- γ 반응이 항원 입자로 3번 면역화된 마우스, 및 항원 입자와 Emulsigen으로 3번 면역화된 마우스에서 관찰될 수 있다. 모든 다른 백신군에서보다 항원 입자와 Emulsigen로 3번 면역화된 마우스에서 관찰된 각 항원에 대한 상당히 큰 IFN- γ 반응이 기대된다.
- [1161] 항원들 PorA, PorB, FetA, ZnuD 및 CPS를 나타내는 설계된 폴리에스테르 입자는 IgG1 및 IgG2 항체의 생성을 상당히 증가시킬 뿐만 아니라 항원-특이성 세포-매개 반응을 생성할 수 있다.
- [1162] 체액 및 세포-매개 면역 반응의 생성 뿐만 아니라, 중량 손실과 같은 부작용이 없고 주사 부위에서 농양과 화농이 없다는 것은 폴리에스테르 입자는 내성이 있고, 안전하며, 독성이 없다는 것을 나타낸다.
- [1163] **실시예 8 - 바실러스 안트라시스 폴리머 입자 백신의 면역원성**
- [1164] 본 실시예는 폴리머 입자의 면역원성의 분석과 함께, *바실러스 안트라시스(Bacillus anthracis)* 항원 PA83, 탄저병(anthrax) 독소의 비독성 서브유닛을 나타내는 폴리머 입자의 형질전환된 숙주, 본 경우에는 *이. 콜리*에서 제조를 위한 플라스미드의 구조를 나타낸다. 본 실시예에서 제조된 바와 같이 상기 항원을 나타내는 폴리머 입자는 탄저병에 대한 예방 및 치료 백신으로서 유용하다.
- [1165] **물질 및 방법**
- [1166] 모든 동물 실험은 AgResearch Grasslands 동물 윤리 위원회(Palmerston North, New Zealand)에 의해 승인되었다.
- [1167] **1. 플라스미드의 구조**
- [1168] 본 실시예에 대한 모든 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드가 하기 표 9에 기술되었다. PhaA 및 PhaB 효소가 플라스미드 pMCS69에 의해서 코딩된다.
- [1169] *비. 안트라시스* PA83 항원, 탄저병 독소의 비독성 서브유닛 PA의 절단형 변이체(truncated variant)를 나타내는 폴리머 입자를 제조하기 위해서, 항원 PA83을 코딩하는 유전자는 최적화된 코돈이며, Genscript Inc.에 의해서 합성되어 PhaC 폴리머 비드 형성 효소에 융합된 C-말단에 대해 pET-14b PhaC-링커-GFP XhoI-BamHI 부위로 서브클로닝한다. PA83을 코딩하는 유전자가 XhoI-BamHI 부위로 삽입된다. 상기 유전자 삽입이 치환된 원래 플라스

미드의 GFP 코딩 영역과 프레임에 있으며, 플라스미드 pET14B-PhaC-PA83을 수득한다.

[1170] PhaC-PA83 융합에 대한 구조가 서열 번호 39에 개시되어 있으며, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 40에 개시되어 있다.

표 9

플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드

플라스미드	상세
pHAS	시.네키타로부터 유래된 <i>phaC</i> 유전자로 삽입된 <i>NdeI/BamHI</i> 를 포함하는 pET14b 유도체
pMCS69	시.네키타로부터 유래된 유전자 <i>phaA</i> 및 <i>phaB</i> 를 포함하는 pBBR1MCS 유도체
pET-14b GFP	PhaC- 링커 - <i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 GFP 코딩 DNA 서열을 포함하는 pET-14b 유도체
pET14B-C-PA83	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 PA83 코딩 DNA 서열을 포함하는 pET-14b PhaC- 링커 -GFP 유도체

[1171]

[1172] 2. PA83을 나타내는 입자의 제조

[1173] 플라스미드 pET14B-C-PA83 및 pHAS가 플라스미드 pMCS69를 갖는 *E. coli* BL21(DE3) 세포로 도입된다. 형질전환체가 실시예 1에 기술된 바와 같이 바이오폴리에스테르 입자의 생성에 적당한 조건에서 배양된다.

[1174] 3. 기체 크로마토그래피 질량 분석(GC-MS)

[1175] 다양한 플라스미드를 갖는 박테리아 세포의 폴리에스테르 함유량은 생체내 PhaC 신타제의 활성에 상응한다. 측정된 폴리에스테르의 양이 기체 크로마토그래피-질량 분석기(GC-MS) 분석에 의해서 평가하여 PhaC 신타제 활성을 측정하고 특히 폴리에스테르 합성의 PhaC-*비*. 안트라시스 항원 융합에 의해서 촉매화하고 세포내 과립 형성을 매개하는지를 측정한다. 폴리에스테르 함유량은 산-촉매화 메타노라이시스(methanolysis)에 의해서 폴리에스테르가 3-히드록시메틸 에스테르로의 전환 이후에 GC-MS에 의해서 정량적으로 측정된다.

[1176] 4. 폴리에스테르 입자의 분리

[1177] 폴리에스테르 과립이 실시예 3에 기재된 바와 같이 분리되고 입자에 부착된 단백질의 농도가 실시예 3에서 기술된 바와 같이 Bio-Rad 단백질 분석을 사용하여 측정된다.

[1178] 5. ELISA

[1179] *비*. 안트라시스 폴리머 입자의 면역-반응성이 다양한 항원에 대해서 생성된 마우스 항체를 사용하여 실시예 3에 기술된 바와 같이 ELISA에 의해 측정된다.

[1180] 6. 유세포 분석

[1181] 다양한 정제된 항원-표지 입자 또는 야생형 폴리머 입자의 25 μ g이 실시예 3의 표 4에 기술된 바와 같이 빙냉(ice-cold)한 유세포 분석 완충액으로 2번 세척하고, 마우스 항-항원 항체와 배양한다. 세척한 후에, 입자가 래트(rat) 항-마우스 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)-레이블된 항체(BD Pharmingen, CA, USA)로 염색하고, 어두운 빙냉한 상태에서 30분동안 배양하고, 다시 세척한다. A BD FACScalibur(BD Biosciences, CA, USA)가 사용되어 각 시료에 대해서 적어도 10,000 경우를 수집하고, CellQuest 소프트웨어를 사용하여 분석한다.

[1182] 7. 마우스의 면역화

- [1183] 6-8주령의 암컷 C57BL/6 마우스(Malaghan Institute, Wellington, NZ)가 2주 간격으로 3번 근육내로 면역화한다. 3개의 치료 그룹은 하기와 같다:
- [1184] (a) 각자는 야생형 입자(예를 들면, pHAS 및 pMCS69를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)로 면역화;
- [1185] (b) 각자는 항원 입자 단독(예를 들면, 다양한 항원-PhaC 융합 단백질 및 pMCS69를 코딩하는 플라스미드를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)으로 면역화;
- [1186] (c) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 다양한 항원 입자로 면역화.
- [1187] 백신화되지 않은 대조군 동물은 각 실험 세트에 대해서 포함된다.
- [1188] **8. 면역학적 분석**
- [1189] 마우스가 최종 면역화하고 3주 후에 마취하고, 혈액을 수집하고, 원심분리하여, 혈청을 수집하고, 분석할 때까지 -20 °C에서 동결시킨다.
- [1190] 상기 마우스는 그후 안락사시키고, 이의 비장을 제거하고, 단일 세포 현탁액이 80 게이지 와이어 메시 체를 통과시킴으로써 제조된다. 비장 적혈구 세포(RBCs)가 17 mM TRIS-HCl 및 140 mM NH₄Cl의 용액을 사용하여 용해시킨다. 세척한 후에, 상기 RBCs가 2 mM의 글루타민(Invitrogen), 100 U/mL의 페니실린(Invitrogen), 100 µg/mL의 스트렙토마이신(Invitrogen), 5x 10⁻⁵ M 2-머캅토에탄올(Sigma) 및 5%(w/w) 소태아 혈청(Invitrogen)이 보충된 Dulbecco 변형된 이글 배지(Modified Eagle media, DMEM)에서 배양된다.
- [1191] **9. IFN- γ 의 정량화**
- [1192] 배양 상청액이 배양 4일 후에 제거되고 분석할 때까지 -20 °C에서 동결된다. 상기 상청액에서 IFN- γ 의 수준이 상업적으로 입수가 가능한 항체 및 표준(BD Pharmingen)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 ELISA(BD Bioscience)에 의해서 측정된다.
- [1193] **10. 혈청 항체의 정량화**
- [1194] 혈청 항체가 항체 캡처를 위한 고정된 항원 표시된 입자를 사용하여 ELISA에 의해서 측정된다.
- [1195] **11. 통계 분석**
- [1196] IFN- γ 및 항체 반응의 분석이 가변의 Kruskal-Wallis one-way 분석(ANOVA)에 의해서 실시된다.
- [1197] **결과**
- [1198] pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET14B-C-PA83 및 pHAS를 운반하는 세포의 GC-MS 분석으로 폴리에스테르 폴리히드록시부티레이트의 존재를 확인할 것이다. 세포내 폴리에스테르 함유물의 존재는 Nile Red 염색을 사용하여 형광 현미경에 의해서 추가로 확인될 수 있다.
- [1199] pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET14B-C-PA83 및 pHAS(야생형 대조군)를 운반하는 세포에서 폴리히드록시부티레이트의 존재는 PhaC 폴리에스테르 신타제 영역이 단일 또는 3중 융합 단백질로서 존재할 때 폴리머 신타제 활성을 보유하는 것을 나타낸다.
- [1200] 입자에 의한 고수준의 단백질 표시는 융합 단백질 서열로부터 제외된 분자량과 직접 관련된 겔보기 분자량을 갖는 우세한 단백질 밴드에 의해서 측정된다. 상기 단백질의 확인은 MALDI-TOF-MS를 사용하는 트립틱 펩티드 핑거프린팅에 의해서 확인된다. ELISA 결과는 다양한 항원 표시 입자는 투여량-의존성 방식으로 각각의 항-항원 항체에 결합되고, 야생형 입자는 항체 결합이 상당히 떨어지는 것으로 보이는 것을 나타낸다. 유세포 분석 결과는 항원 입자의 >96%가 항-항원 항체와 결합하는 것을 보여준다.
- [1201] PhaC-항원 융합 단백질을 코딩하는 각각의 하이브리드 유전자의 재조합 *in vitro* 콜리에서 발현은 이의 표면에서 융합 단백질을 나타내는 폴리에스테르 입자의 생성을 나타낸다.
- [1202] 바람직하게, 면역화 이후에 동물에서 명백한 독성이 관찰되지 않았으며, 마우스 체중은 실험 기간 동안의 그룹들 사이에서 상당히 다르지 않으며, 모든 그룹에서 마우스가 체중이 증가되었다(데이터는 개시되지 않음). 폴리에스테르 입자로 면역화된 마우스는 면역화 부위에서 작은 혹(직경 2.5 mm)이 발생되었지만, 일반적으로 농양이나 화농이 없으며, 전형적으로 실험을 통해서 정상적의 거동 및 양호한 품질의 털 상태를 갖는 건강한 상태이다.

- [1203] 항원 입자의 40 μg 의 투여량은 마우스에서 상당한 항체 반응을 발생하는데 충분하다. 상기 투여량은 야생형 입자 단독의 40 μg 투여량과 비교할 때 상당히 높은 항체 역가를 유도한다. 다른 투여량이 또한 시험되고 사용될 수 있다. 면역화되지 않은 대조군을 포함하는 2번째 시험에서, 마우스는 보조제를 갖는 비드 조제와 보조제를 갖지 않는 비드 조제를 비교하고, 백신화되지 않은 마이스와 비교하여 항원 입자가 주어진 백신 그룹에 대한 상당히 높은 항원-특이성 혈청 항체 반응에 대해서 평가하였다. 최대 항체 반응은 Emulsigen에서 항원 입자로 면역화된 마우스에서 관찰될 수 있다. IgG1 이소타입에 대한 항체 반응은 두 실험에서 IgG2에 대한 반응보다 전형적으로 더 강할 것이다.
- [1204] 10 μg 또는 40 μg 의 항원 입자로 면역화된 마우스의 항원에 대한 세포-매개 반응이 야생형 입자 단독, 또는 PBS 단독으로 면역화된 마우스와 비교하여 상당히 향상되었으며, PBS-면역화된 대조군 마우스와 비교하여 야생형 입자 단독으로 면역화된 마우스의 세포-매개 반응에서 전형적으로 상당한 차이가 없어야 한다.
- [1205] 40 μg 의 야생형 입자(*B. 안트라시스* 항원이 없음)로 3번 면역화된 마우스에서 각 항원에 대한 IFN- γ 반응은 PBS-면역화된 대조군 마우스의 반응과 상당한 차이는 없을 것이다. 대조적으로, 각 항원에 대한 상당히 더 큰 IFN- γ 반응이 항원 입자로 3번 면역화된 마우스, 및 항원 입자와 Emulsigen으로 3번 면역화된 마우스에서 관찰될 수 있다. 모든 다른 백신군에서보다 항원 입자와 Emulsigen로 3번 면역화된 마우스에서 관찰된 각 항원에 대한 상당히 큰 IFN- γ 반응이 기대된다.
- [1206] 항원 PA83을 나타내는 설계된 폴리에스테르 입자는 IgG1 및 IgG2 항체의 생성을 상당히 증가시킬 뿐만 아니라 항원-특이성 세포-매개 반응을 생성할 수 있다.
- [1207] 체액 및 세포-매개 면역 반응의 생성 뿐만 아니라, 중량 손실과 같은 부작용이 없고 주사 부위에서 농양과 화농이 없다는 것은 폴리에스테르 입자는 내성이 있고, 안전하며, 독성이 없다는 것을 나타낸다.
- [1208] **실시예 9 - 마우스에서 생체내 C형 간염 폴리머 입자의 면역원성**
- [1209] 본 실시예는 Hep-C 항원을 포함하는 폴리머 입자에 의해서 포유류 모델의 면역화를 기술하였다.
- [1210] **물질 및 방법**
- [1211] 모든 동물 실험은 AgResearch Grasslands 동물 윤리 위원회(Palmerston North, New Zealand)에 의해 승인되었다.
- [1212] **1. 폴리에스테르 폴리머 입자의 분리 및 플라스미드의 구조**
- [1213] 플라스미드가 실시예 1에 기술된 바와 같이 숙주로서 *E. 콜리*를 사용하여 C형 간염 코어 항원을 나타내는 폴리머 입자의 제조를 위해서 제조된다.
- [1214] 폴리에스테르 과립이 박테리아를 파괴함으로써 분리되고, 전체 세포 용해물이 6000 g에서 15분동안 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 원심분리하여 폴리에스테르 입자를 침전시킨다. 상기 입자가 글리세롤 그라디언트 초원심분리에 의해서 정제된다. 단백질의 농도가 제조자의 지시에 따라 Bio-Rad 단백질 분석을 사용하여 측정된다. 폴리머 입자에 부착된 전체 단백질의 양에 대한 Hep C:PhaC 융합 단백질의 양은 Gel DocTM XR을 사용하여 검출되며, Quantity One 소프트웨어(버전 4.6.2, Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 분석된다. 상기 Hep C 항원은 *E. 콜리*에서 폴리머 입자의 전체 단백질의 약 6.7% 및 *엘. 락티스*에서 폴리머 입자의 전체 단백질의 25%를 설명한다. 목적하는 단백질의 확인은 MALDI-TOF-MS를 사용하여 확인된다.
- [1215] **2. ELISA**
- [1216] Hep C 폴리머 입자의 면역-반응성이 실시예 3에 기술된 바와 같이 ELISA에 의해 측정된다. 세척 후에, 플레이트가 Hep C(Devatal, USA)에 대한 마우스 항체와 배양되고, PBST로 세척되고, PBS에서 1% (w/v) BSA에 희석된 바이오틴화(biotinylated) 항-마우스 IgG(Sigma-Aldrich)와 실온에서 1시간동안 배양된다. 실온에서 1시간동안 추가로 배양된 후에, 플레이트가 PBST로 세척되고, 스트렙타비딘(streptavidin)-HRP 콘쥬게이트가 첨가되고, 추가로 1시간동안 배양된다. 추가로 세척된 후에, o-페닐렌디아민(OPD) 기체(Sigma-Aldrich)가 첨가되고 플레이트가 실온에서 30분동안 배양된다.
- [1217] 흡광도는 VERSAax 마이크로플레이트 리더(microplate reader)에서 490 nm에서 기록된다.
- [1218] **3. 마우스의 면역화**
- [1219] 6-8주령의 암컷 C57BL/6 마우스(Malaghan Institute, Wellington, NZ)가 시판의 제조업체 Hep C 항원 치료 그룹

을 제외하고, 매주 간격으로 3번 피하로 면역화한다. 시판의 재조합 Hep C 항원(유래된 *이. 콜리*)이 Devatal Inc.(USA)로부터 얻어지며, C형 간염 바이러스의 뉴클레오킵시드 면역우성 영역(nucleocapsid immunodominant regions)을 포함한다. 항원은 공급자가 나타내는 10% PAGE (Coomassie staining)에 의해서 측정되는 바와 같이 >95% 순도이다.

[1220] 6개의 치료 그룹(그룹당 n=6)은 하기와 같다:

[1221] (a) 각자는 CFA(Complete Freund's adjuvant)내 시판의 Hep C 항원(30 μ g)으로 면역화 - 한번만 백신화됨.

[1222] (b) 각자는 시판의 Hep C 항원(30 μ g) 및 Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)로 면역화 - 한번만 백신화됨.

[1223] (c) 각자는 PBS 및 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)로 면역화.

[1224] (d) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 Hep C 폴리머 입자(10 μ g)로 면역화.

[1225] (e) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 Hep C 폴리머 입자(30 μ g)로 면역화.

[1226] (f) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 야생형 폴리머 입자(*이. 콜리* 숙주)로 면역화.

[1227] 백신화되지 않은 대조군 동물은 각 실험 세트에 대해서 포함된다.

[1228] 4. 면역학적 분석

[1229] 마우스가 최종 면역화하고 3주 후에 체중 1g당 87 μ g 케타민(Parnell Laboratories, Australia) 및 2.6 μ g 크실라진 히드로클로라이드(Bayer, Germany)를 사용하여 복강으로 마취한다. 혈액을 수집하고, 원심분리하여, 혈청을 수집하고, 분석할 때까지 -20 °C에서 동결시킨다.

[1230] 상기 마우스는 그후 안락사시키고, 이의 비장을 제거하고, 단일 세포 현탁액이 80 게이지 와이어 메시 체(gauge wire mesh sieve)를 통과시킴으로써 제조된다. 비장 적혈구 세포가 실시예 4에 기술된 바와 같이 처리된다. 상기 세포가 배지 단독, 또는 5 μ g/mL 재조합 Hep C 항원을 포함하는 배지에서 10% CO₂에서 37 °C에서 배양된다.

[1231] 5. IFN- γ 의 정량화

[1232] 배양 상청액이 배양 4일 후에 제거되고 분석할 때까지 -20 °C에서 동결된다. 상기 상청액에서 IFN- γ 의 수준이 상업적으로 입수가 가능한 항체 및 표준(BD Pharmingen)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 ELISA(BD Biosciences)에 의해서 측정된다.

[1233] 6. 혈청 항체의 정량화

[1234] 혈청 항체가 모노클로날 항-Hep C 항체(Devatal)를 사용하여 제조자의 추천에 따라 ELISA에 의해서 측정된다. 간단하게, Maxisorb(Nunc) 플레이트가 3 μ g/mL의 재조합 Hep C로 한밤동안 코팅되고, 1% BSA로 차단하고, PBST에서 세척한다. 혈청의 희석물(1:50 내지 1:156250)이 첨가되고 배양된다. 세척한 후에, 항-마우스 IgG1:HRP 또는 IgG2c:HRP(ICL, USA)가 첨가되고, 플레이트가 배양된다. 플레이트가 세척되고 기체로서 TMB가 사용되고, VERSAmax 마이크로플레이트 리더에서 450 nm에서 판독한다.

[1235] 모노클로날 항-Hep C 항체가 적정되고, IgG1 플레이트에 대한 포지티브 대조군으로 포함된다. 결과는 1:50으로 희석된 혈청에 대해서 450 nm에서 광학 밀도로서 표시된다.

[1236] 7. 통계 분석

[1237] IFN- γ 및 항체 반응의 분석이 가변의 Fisher's one-way 분석(ANOVA)에 의해서 실시되며, 유의도(level of significance)는 $P < 0.05$ 이다.

[1238] 결과

[1239] Hep C 폴리머 입자의 반응성은 도 1에 도시된 바와 같이 Hep C 항체에 대한 투여량-의존성 반응을 나타낸다.

[1240] 10 μ g/mL Hep C 폴리머 입자의 투여량은 30 μ g/mL Hep C 폴리머 입자와 비교하여 큰 IgG1 항체 반응 및 큰 IgG2 항체 반응을 나타낸다(각각 도 2 및 도 3 참조). Hep C 폴리머 입자의 두 투여량은 재조합 Hep C 항원 단

독과 비교하여 IgG1 및 IgG2 항체 반응이 상당히 감소된 것을 나타낸다(각각 도 2 및 도 3 참조).

[1241] 도 4에 개시된 바와 같이, 30 μ g Hep C 폴리머 입자로 면역화된 마우스의 Hep C 코어 항원에 대한 세포-매개 반응이 야생형 폴리머 입자($P<0.05$), 재조합 Hep C 항원 단독($P<0.05$), 또는 PBS 단독($p<0.05$)으로 면역화된 마우스와 비교하여 상당히 향상되었다. 실제로, PBS-면역화된 대조군 마우스와 비교하여 항원 단독으로 면역화된 마우스의 세포-매개 반응에서 상당한 차이는 없었다.

[1242] **토의**

[1243] *이. 콜리*에서 생성된 Hep C 코어 항원을 나타내는 설계된 폴리머 입자는 Hep C 항원 유발(antigen challenge)에 대한 표적된 세포-매개 반응을 생성할 수 있다. 특히, 항원 단독(예컨대, 본 발명의 폴리머 입자를 포함하지 않는 항원)에 의한 면역화는 강한 체액 반응을 유도할 수 있음에도 불구하고 세포-매개 반응을 유도하는데 비효율적이다.

[1244] 본 발명의 Hep C 폴리머 입자는 IgG1 반응과 비교하여 더 강한 IgG2 체액 반응을 유도할 수 있다. IgG2 항체는 항체-의존성, 세포-매개 세포독성(ADCC)의 자극에 관련되고, 상기 데이터는 Hep C 폴리머 입자가 세포-매개 반응의 보충적 측면에서 직접 및 간접적으로 효과적으로 자극할 수 있다는 아이디어를 지지한다.

[1245] 상기 결과는 면역 반응의 상이한 측면을 유도하기 위해 상기 백신-송달 시스템의 다면성 및 가능성을 입증하였으며, 이로 인해 세포-매개 면역 반응은 효과적으로 유도되며, 비효과적인 체액 반응의 자극이 떨어진다.

[1246] 중량 손실과 같은 부작용 및 주사 부위에서 농양과 화농이 없다는 것은 폴리에스테르 폴리머 입자는 내성이 있고, 안전하며, 독성이 없다는 것을 나타낸다.

[1247] **실시예 10 - 뎅기 바이러스 폴리머 입자 백신의 면역원성**

[1248] 본 실시예는 폴리머 입자의 면역원성의 분석과 함께, 뎅기 바이러스 엔벨로프 단백질(E)과 멤브레인 단백질(M) 둘다, 비리온(virion)의 표면에서 발현된 두 면역성 단백질들을 나타내는 폴리머 입자의 형질전환된 숙주, 본 경우에는 *이. 콜리*에서 제조를 위한 플라스미드의 구조를 나타낸다. 본 실시예에서 제조된 바와 같이 상기 항원을 나타내는 폴리머 입자는 뎅기 바이러스에 대한 예방 및 치료 백신으로서 유용하다.

[1249] **물질 및 방법**

[1250] 모든 동물 실험은 AgResearch Grasslands 동물 윤리 위원회(Palmerston North, New Zealand)에 의해 승인되었다.

[1251] **1. 과잉발현 플라스미드 구조**

[1252] 본 실시예에서 모든 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드가 표 10에 기술되었다. 베타-케토티올라제 및 아세토아세틸-코엔자임 A 환원효소가 플라스미드 pMCS69에 의해서 코딩되고, 아세틸 CoA를 3-히드록시부티릴-코엔자임 A로의 전환을 촉매화함에 의해서 기체에 폴리머 신타제를 제공한다.

[1253] 뎅기 바이러스 혈청형 1-4 E 및 M을 나타내는 폴리머 입자를 제조하기 위해서, 항원 E 및 M을 코딩하는 유전자는 최적화된 코돈이며, Genscript Inc.에 의해 합성되어 PhaC 폴리머 비드 형성 효소에 융합된 C-말단에 대한 XhoI-BamHI 부위 및 N-말단에 대한 pET-14b M-PhaC-링커-MalE XbaI-SpeI 부위로 서브클로닝된다. omp16을 코딩하는 유전자가 XhoI-BamHI 부위로 삽입된다. 상기 유전자 삽입은 치환된 원래 플라스미드의 GFP 코딩 영역과 프레임에 있고, 플라스미드 pET14B-C-omp16을 수득한다.

[1254] E1-PhaC-M1 융합에 대한 구조는 서열 번호 41에 개시되었고, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 42에 개시되었다. E2-PhaC-M2 융합에 대한 구조는 서열 번호 43에 개시되었고, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 44에 개시되었다. E3-PhaC-M3 융합에 대한 구조는 서열 번호 45에 개시되었고, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 46에 개시되었다. E4-PhaC-M1 융합에 대한 구조는 서열 번호 47에 개시되었고, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 48에 개시되었다.

표 10

플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드

플라스미드	상세
pHAS	시.네카타로부터 유래된 <i>phaC</i> 유전자로 삽입된 <i>NdeI/BamHI</i> 를 포함하는 pET14b 유도체
pMCS69	시.네카타로부터 유래된 유전자 <i>phaA</i> 및 <i>phaB</i> 를 포함하는 pBBR1MCS 유도체
pET-14b M-PhaC- 링커 - MalE	<i>phaC</i> 의 5'말단에 융합된 <i>mpl</i> 서열을 포함하는 pET-14b PhaC- 링커 -MalE 유도체
pET14B-E1-C-M1	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 링기 혈청형 1 M 및 5'말단에 융합된 링기 혈청형 1 E 서열을 포함하는 pET-14b M-PhaC- 링커 -MalE 유도체
pET14B-E2-C-E2	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 링기 혈청형 2 M 및 5'말단에 융합된 링기 혈청형 2 E 서열을 포함하는 pET-14b M-PhaC- 링커 -MalE 유도체
pET14B-E3-C-M3	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 링기 혈청형 3 M 및 5'말단에 융합된 링기 혈청형 3 E 서열을 포함하는 pET-14b M-PhaC- 링커 -MalE 유도체
pET14B-E4-C-E4	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 링기 혈청형 4 M 및 5'말단에 융합된 링기 혈청형 4 E 서열을 포함하는 pET-14b M-PhaC- 링커 -MalE 유도체

[1255]

[1256] 2. 링기 바이러스 혈청형 1 - 4 E 및 M을 나타내는 입자의 제조

[1257] 플라스미드 pET14B-E1-C-M1, pET14B-E2-C-M2, pET14B-E3-C-M3 또는 pET14B-E4-C-M4 및 pHAS가 플라스미드 pMCS69를 갖는 *이. 콜리* BL21(DE3) 세포로 도입된다. 상기 형질전환체는 실시예 1에 기술된 바와 같이 바이오 폴리에스테르 폴리머 입자의 제조에 적당한 조건에서 배양된다. 링기 바이러스 E-PhaC-M 입자 또는 야생형 입자 각각의 제조는 하기에 기술된 바와 같이 평가된다.

[1258] 3. 기체 크로마토그래피 질량 분석(GC-MS)

[1259] 다양한 플라스미드를 갖는 박테리아 세포의 폴리에스테르 함유량은 생체내 PhaC 신타제의 활성화에 상응한다. 측정된 폴리에스테르의 양이 기체 크로마토그래피-질량 분석기(GC-MS) 분석에 의해서 평가하여 PhaC 신타제 활성을 측정하고, PhaC-링기 바이러스 혈청형 1 - 4 E 및 M 항원 융합이 폴리에스테르 합성을 촉매화하고 세포내 과립 형성을 매개하는 것을 확인했다. 폴리에스테르 함유량은 산-촉매화 메타노라이시스(methanolysis)에 의해서 폴리에스테르가 3-히드록시메틸 에스테르로의 전환 이후에 GC-MS에 의해서 정량적으로 측정된다.

[1260] 4. 폴리에스테르 입자의 분리

[1261] 폴리에스테르 과립이 박테리아를 파괴함으로써 분리되고, 전체 세포 용해물이 4000 g에서 15분동안 4 °C에서 원심분리하여 폴리에스테르 입자를 침전시킨다. 상기 입자가 글리세롤 그라디언트 초원심분리에 의해서 정제된다.

[1262] 입자에 부착된 단백질의 농도가 실시예 3에서 기술된 바와 같이 Bio-Rad 단백질 분석을 사용하여 측정된다. 농도 측정 이후에, 단백질이 SDS-PAGE에 의해서 분리되고, SimplyBlue Safe Stain(Invitrogen)에 의해서 염색된

다. 입자에 부착된 전체 단백질의 양에 대한 E-PhaC-M 융합 단백질의 양이 Gel Doc™ XR을 사용하여 검출되며, Quantity One 소프트웨어(버전 4.6.2, Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 분석된다. 목적하는 단백질이 겔로부터 잘라내어, MALDI-TOF-MS를 사용하여 트립틱 펩티드 핑거프린팅하여 융합 단백질 영역을 확인한다.

5. ELISA

뎡기 바이러스 폴리머 입자의 면역-반응성이 실시예 3에 기술된 바와 같이 ELISA에 의해 측정된다. 간단하게, Maxisorb 플레이트(Nunc)가 카보네이트-비카보네이트 코팅 완충액(pH 9.6)(Sigma-Aldrich)에서 희석된 정제된 E-PhaC-M 입자 또는 야생형 입자로 4 °C에서 한밤동안 코팅된다. 상기 완충액의 일련의 희석이 1 mg/ml에서 0.015 mg/ml 단백질 농도의 범위로 사용된다. 플레이트가 세척되고 25 °C에서 2시간동안 차단된다(표 4 참조). 그 후, 플레이트가 PBS-트윈 20으로 세척되고, 다양한 항원에 대해 생성된 마우스 항체와 배양되며, 세척되고, PBS에서 1%(w/v) BSA에서 희석된 항-마우스 IgG:서양고추냉이(horse radish) 퍼옥시다제 콘주게이트(peroxidase conjugate)(Sigma-Aldrich)와 실온에서 1시간동안 추가로 배양된다. 추가로 세척한 후에, o-페닐렌디아민(OPD) 기제(Sigma-Aldrich)가 첨가되고 플레이트가 실온에서 30분동안 배양된다. 상기 반응은 0.5 M H2SO4로 정지시키고, 흡광도가 495 nm에서 기록된다.

6. 유세포 분석

다양한 정제된 항원을 나타내는 입자 또는 야생형 입자의 30μg이 실시예 3의 표 4에 기술된 바와 같이 빙냉한 유세포 분석 완충액으로 2번 세척하고, 마우스 항-항원 항체와 배양한다. 세척한 후에, 입자가 래트(rat) 항-마우스 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)-레이블된 항체(BD Pharmingen, CA, USA)로 염색하고, 어두운 빙냉한 상태에서 30분동안 배양하고, 다시 세척한다. A BD FACScalibur(BD Biosciences, CA, USA)가 사용되어 각 시료에 대해서 적어도 15,000 경우를 수집하고, CellQuest 소프트웨어를 사용하여 분석한다.

7. 마우스의 면역화

6-8주령의 암컷 C57BL/6 마우스(Malaghan Institute, Wellington, NZ)가 2주 간격으로 2번 복강내(i.p.)으로 면역화한다. 3개의 치료 그룹은 하기와 같다:

(a) 각자는 야생형 입자(예를 들면, pHAS 및 pMCS69를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)로 면역화;

(b) 각자는 항원 입자 단독(예를 들면, 다양한 항원-PhaC 융합 단백질 및 pMCS69를 코딩하는 플라스미드를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)으로 면역화; 및

(c) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 다양한 항원 입자로 면역화. 백신화되지 않은 대조군 동물은 각 실험 세트에 대해서 포함된다.

8. 면역학적 분석

마우스가 최종 면역화하고 3주 후에 마취하고, 혈액을 수집하고, 원심분리하여, 혈청을 수집하고, 분석할 때까지 -20 °C에서 동결시킨다. 상기 마우스는 그후 안락사시키고, 이의 비장을 제거하고, 단일 세포 현탁액이 80 게이지 와이어 메시 체를 통과시킴으로써 제조된다. 비장 적혈구 세포(RBCs)가 실시예 4에 기술된 바와 같이 처리된다.

9. 플라크 감소 중화 분석(plaque reduction neutralization assay)

면역화된 마우스로부터 유래된 혈청이 플라크 감소 중화 분석에 의해서 항체를 중화하는 뎡기 바이러스의 존재에 대해서 조사되었다. 일련의 희석된 혈청이 가열로 불활성화되고, 동종 및 이종 혈청형 바이러스의 100 플라크 형성 유닛과 혼합되어 1시간동안 37 °C에서 배양된다. 상기 혈청 바이러스 혼합물이 베로(Vero) 세포 단일 층과 1시간동안 배양하고 아가로스 함유 배지로 덮는다. 바이러스 플라크가 분석 5일에 염색된다. 플라크 수가 80% 감소된 최고 희석물이 플라크 감소 중화 80(Plaque reduction neutralization 80, PRNT₈₀)이다.

10. 사이토킨 및 케모킨의 정량화

배양 상청액이 배양 4일 후에 제거되고, 분석될 때까지 -20 °C에서 동결된다. 상기 상청액에서 사이토킨 및 케모킨의 수준은 상업적으로 이용할 수 있는 항체 및 표준(EBioscience)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 ELISA 및/또는 FACS(EBioscience)에 의해서 측정된다.

11. 마우스 바이러스 방어 분석

- [1279] 마우스 면역성 모델(mouse challenge model)이 사용되어 보조제를 갖는 입자와 보조제를 갖지 않는 입자를 나타내는 땡기 바이러스 E 및 M 항원의 조제들의 유효성을 확인하였다. 13일된 젖을 갓 땡 마우스가 상기 물질 및 방법의 (1)섹션에서 기술된 바와 같이 1, 5 및 10 μg 투여량을 사용하여 면역화된다. 면역화 이후에, 땡기 바이러스 적응된 마우스의 100 LD₅₀으로 마우스가 두개내(intracranially, IC) 면역성 검사한다. 이환률(morbidity) 및 사망률(mortality)이 면역성 이후 21일동안 모니터된다.
- [1280] **12. 혈청 항체의 정량화**
- [1281] 혈청 항체가 항체 캡처에 대한 고정된 항원을 나타내는 입자를 사용하여 ELISA에 의해서 측정된다.
- [1282] **13. 통계학적 분석**
- [1283] 사이토킨, 케모킨 및 항체 반응의 분석이 가변의 Kruskal-Wallis one-way 분석(ANOVA)에 의해서 실시된다.
- [1284] **결과**
- [1285] pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET14B-E1-C-M1, pET14B-E2-C-M2, pET14B-E3-C-M3 또는 pET14B-E4-C-M4 및 pHAS를 운반하는 세포의 GC-MS 분석으로 폴리에스테르 폴리히드록시부티레이트의 존재를 확인할 것이다. 세포내 폴리에스테르 함유물의 존재는 Nile Red 염색을 사용하여 형광 현미경에 의해서 추가로 확인될 수 있다. pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET14B-E1-C-M1, pET14B-E2-C-M2, pET14B-E3-C-M3 또는 pET14B-E4-C-M4 및 pHAS(야생형 대조군)를 운반하는 세포에서 폴리히드록시부티레이트의 존재는 PhaC 폴리에스테르 신타제 영역이 단일 또는 3중 융합 단백질로서 존재할 때 폴리머 신타제 활성을 보유하는 것을 나타낸다.
- [1286] 입자에 의한 고수준의 단백질 표시는 융합 단백질 서열로부터 제외된 분자량과 직접 관련된 겔보기 분자량을 갖는 우세한 단백질 밴드에 의해서 측정된다. 상기 단백질의 확인은 MALDI-TOF-MS를 사용하는 트립틱 펩티드 핑거프린팅에 의해서 확인된다. ELISA 결과는 다양한 항원 표시 입자는 투여량-의존성 방식으로 각각의 항-항원 항체에 결합되고, 야생형 입자는 항체 결합이 상당히 떨어지는 것으로 보이는 것을 나타낸다. 유세포 분석 결과는 항원 입자의 >97%가 항-항원 항체와 결합하는 것을 보여준다. PhaC-항원 융합 단백질을 코딩하는 각각의 하이브리드 유전자의 재조합 *in vitro* 폴리에서 발현은 이의 표면에서 융합 단백질을 나타내는 폴리에스테르 입자의 생성을 나타낸다.
- [1287] 바람직하게, 면역화 이후에 동물에서 명백한 독성이 관찰되지 않았으며, 마우스 체중은 실험 기간 동안의 그룹들 사이에서 상당히 다르지 않으며, 모든 그룹에서 마우스가 체중이 증가되었다(데이터는 개시되지 않음). 폴리에스테르 입자로 면역화된 마우스는 전형적으로 실험을 통해서 정상의 거동 및 양호한 품질의 털 상태를 갖는 건강한 상태이다.
- [1288] 항원 입자의 약 10 내지 약 50 μg 의 투여량은 마우스에서 상당한 항체 반응을 발생하는데 충분하다. 상기 투여량은 야생형 입자 단독의 10-50 μg 투여량과 비교할 때 상당히 높은 항체 역가를 유도한다. 다른 투여량이 또한 시험되고, 예를 들면 각 항원을 표시하는 비드(E1-C-M1, E2-C-M2, E3-C-M3 및 E4-C-M4)의 50-100 μg 이 사용될 수 있다. 면역화되지 않은 대조군 마우스를 포함하고, 보조제를 갖는 비드 조제와 보조제를 갖지 않는 비드 조제를 비교하는 2번째 시험에서, 항원-특이성 혈청 항체 반응은 백신화되지 않은 마이스와 비교하여 항원 입자가 주어진 두 백신 그룹에 대해 상당히 높았다. 최대 항체 반응은 Emulsigen에서 항원 입자로 면역화된 마우스에서 관찰되었다. IgG1 이소타입에 대한 항체 반응은 두 실험에서 IgG2에 대한 반응보다 더 강하다.
- [1289] 10-50 μg 의 항원 입자로 면역화된 마우스의 항원에 대한 세포-매개 반응이 야생형 입자 단독, 또는 PBS 단독으로 면역화된 마우스와 비교하여 상당히 향상되었으며, PBS-면역화된 대조군 마우스와 비교하여 야생형 입자 단독으로 면역화된 마우스의 세포-매개 반응에서 전형적으로 상당한 차이가 없어야 한다.
- [1290] 야생형 입자로 면역화된 마우스에서 혈청은 플라크 감소 중화 분석에서 PBS-면역화 대조군 마우스와 상당한 차이는 없을 것이다. 플라크 감소 중화 분석에서 땡기 바이러스 혈청형 1 - 4 E - M 입자의 1:1:1:1 혼합물을 포함하는 조제로 면역화된 마우스로부터 혈청의 중화 역가는 야생형 입자 단독으로 면역화된 마우스의 혈청과 비교하여 상당히 더 높을 것이다. 플라크 감소 중화 분석에서 땡기 바이러스 혈청형 1 - 4 E - M 입자의 1:1:1:1 혼합물을 포함하는 조제로 면역화된 마우스로부터 혈청의 중화 역가는 오직 하나의 땡기 바이러스 혈청형 E 및 M을 나타내는 비드를 포함하는 조제보다 이중 땡기 바이러스 혈청형에 대해서 상당히 높을 것이다.
- [1291] 10-50 μg 의 야생형 입자로 2번 면역화된 마우스에서 항원에 대한 케모킨 및 사이토킨은 PBS-면역화된 대조군 마우스와 비교하여 전형적으로 상당한 차이는 없을 것이다. 대조적으로, 각 항원에 대한 상당히 더 큰 케모킨

및 사이토킨이 항원 입자로 2번 면역화된 마우스와 항원 입자 및 Emulsigen으로 2번 면역화된 마우스에서 관찰되었다. 모든 다른 백신군에서보다 항원 입자와 Emulsigen로 2번 면역화된 마우스에서 관찰된 각 항원에 대한 상당히 큰 사이토킨 및 케모킨 반응이 기대된다. 항원 덩기 바이러스 혈청형 1 - 4E 및 M 단백질을 나타내는 설계된 폴리에스테르 입자는 IgG1 및 IgG2 항체의 생성을 상당히 증가시킬 뿐만 아니라 항원-특이성 세포-매개 반응을 생성할 수 있다.

[1292] PBS 또는 야생형 입자로 면역화된 마우스는 2개 그룹들 사이에서 상당한 차이 없이 바이러스 면역시에 죽을 것으로 기대된다. 보조제를 갖는 덩기 바이러스 혈청형 1 - 4 E 및 M을 나타내는 입자와 보조제를 갖지 않는 덩기 바이러스 혈청형 1 - 4 E 및 M을 나타내는 입자로 면역화된 마우스는 방어될 것으로 기대되며, 보조제를 포함하는 조제로부터 유래된 것이 방어가 더 양호하다.

[1293] 체액 및 세포-매개 면역 반응의 생성 뿐만 아니라, 중량 손실과 같은 부작용이 없고 주사 부위에서 농양과 화농이 없다는 것은 폴리에스테르 입자가 내성이 있고, 안전하며, 독성이 없다는 것을 나타낸다.

[1294] 실시예 11 - 에볼라 바이러스 폴리머 입자 백신의 면역원성

[1295] 본 실시예는 폴리머 입자의 면역원성의 분석과 함께, 필로비리데 자이레 에볼라바이러스(*Filoviridae* Zaire ebolavirus) 및 수단 에볼라바이러스 비리온 스파이크 글리코프로테인 전구물질 항원(Sudan ebolavirus virion spike glycoprotein precursor antigens)(각각 ZEBOV-GP 및 SEBOV-GP)을 개별적으로 또는 동시에 나타내는 폴리머 입자의 이. 콜리에서 제조를 위한 플라스미드의 구조를 기술하였다. 두 항원은 백신 개발에 유용하다.

[1296] 물질 및 방법

[1297] 모든 동물 실험은 AgResearch Grasslands 동물 윤리 위원회(Palmerston North, New Zealand)에 의해 승인되었다.

[1298] 1. 융합 단백질 과잉생성 및 폴리머 비드 형성을 매개하는 플라스미드의 구조

[1299] 본 실시예에서 사용된 모든 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드가 표 11에 기술되었다.

[1300] 폴리히드록시부티레이트 생합성 효소, 베타-케토티올라제 및 R-특이성 아세토아세틸-코엔자임 환원효소가 플라스미드 pMCS69에 의해서 코딩된다. 2개의 에볼라 비리온 스파이크 글리코프로테인 전구물질 항원을 동시에 나타내는 폴리머 입자를 제조하기 위해서, 자이레 에볼라 바이러스 및 수단 에볼라 바이러스로부터 비리온 스파이크 글리코프로테인 전구물질 항원들을 코딩하는 유전자는 최적화된 코돈이며, Genscript Inc.에 의해서 합성되어 PhaC 폴리머 비드 형성 효소에 융합된 C-말단에 대해서 XhoI-BamHI 부위 및 N-말단에 대해서 pET-14b M-PhaC-링커-MaIE XbaI-SpeI 부위로 서브클로닝된다. ZEBOV-GP 코딩 유전자가 XbaI-SpeI 부위로 삽입되고, 동일 플라스미드에서 SEBOV-GP 코딩 유전자가 XhoI-BamHI 부위로 삽입된다. 두개의 유전자 삽입이 프레임에 있으며 원래 플라스미드의 M 및 MaIE 코딩 영역의 치환을 요구한다. 상기는 플라스미드 pET14B-ZEBOVGP-C-SEBOVGP를 수득한다. 선택적으로 동일한 플라스미드에서 ZEBOV-GP 코딩 유전자가 XhoI-BamHI 부위로 삽입되고 SEBOV-GP 코딩 유전자가 XbaI-SpeI 부위로 삽입되어, 플라스미드 pET14B-SEBOVGP-C-ZEBOVGP를 생성한다.

[1301] ZEBOVGP-C-SEBOVGP 융합에 대한 구조는 서열 번호 49에 개시되었고, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 50에 개시되었다. SEBOVGP-C-ZEBOVGP 융합에 대한 구조는 서열 번호 51에 개시되었고, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 52에 개시되었다.

표 11

플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드

플라스미드	상세
pHAS	시.네키타로부터 유래된 <i>phaC</i> 유전자로 삽입된 <i>NdeI/BamHI</i> 를 포함하는 pET14b 유도체
pMCS69	시.네키타로부터 유래된 유전자 <i>phaA</i> 및 <i>phaB</i> 를 포함하는 pBBR1MCS 유도체
pET-14b M-PhaC-링커 - MalE	<i>phaC</i> 의 5'말단에 융합된 <i>mpl</i> 서열을 포함하는 pET-14b PhaC-링커-MalE 유도체
pET14B-ZEBOVGP-C-SEBOVGP	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 SEBOV-GP 및 5'말단에 융합된 ZEBOV-GP 서열을 포함하는 pET-14b M-PhaC-링커-MalE 유도체
pET14B-SEBOVGP-C-ZEBOVGP	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 ZEBOV-GP 및 5'말단에 융합된 SEBOV-GP 서열을 포함하는 pET-14b M-PhaC-링커-MalE 유도체

[1302]

[1303]

2. ZEBOVGP - SEBOVGP를 나타내는 입자의 제조

[1304]

플라스미드 pET14B-ZEBOVGP-C-SEBOVGP 또는 pET14B-ZEBOVGP-C-SEBOVGP 및 pHAS가 플라스미드 pMCS69를 갖는 이. 콜리 KRX로 도입된다. 형질전환체가 실시예 1에 기술된 바와 같이 바이오폴리에스테르 입자의 제조에 적당한 조건에서 배양된다. ZEBOVGP-SEBOVGP 입자 또는 야생형 입자 각각을 제조하는 역량은 하기에 기술된 바와 같이 평가된다.

[1305]

3. 폴리에스테르 입자의 분리

[1306]

폴리에스테르 과립이 실시예 3에 기술된 바와 같이 분리된다. 입자에 부착된 단백질의 농도가 실시예 3에서 기술된 바와 같이 Bio-Rad 단백질 분석을 사용하여 측정된다. 농도 측정 이후에, 단백질이 SDS-PAGE에 의해서 분리되고, SimplyBlue Safe Stain(Invitrogen)에 의해서 염색된다. 입자에 부착된 전체 단백질의 양에 대한 ZEBOVGP-PhaC-SEBOVGP 또는 SEBOVGP-PhaC-ZEBOVGP 융합 단백질 각각의 양이 Gel Doc™ XR을 사용하여 검출되며, Quantity One 소프트웨어(버전 4.6.2, Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 분석된다.

[1307]

목적하는 단백질이 MALDI-TOF-MS를 사용하여 확인되고, 융합 단백질 영역을 확인한다.

[1308]

4. ELISA

[1309]

에볼라 바이러스 폴리머 입자의 면역-반응성이 실시예 3에 기술된 바와 같이 ELISA에 의해 측정된다. 간단하게, Maxisorb 플레이트(Nunc)가 카보네이트-비카보네이트 코팅 완충액(pH 9.6)(Sigma-Aldrich)에서 희석된 정제된 ZEBOVGP-PhaC-SEBOVGP 입자, SEBOVGP-PhaC-ZEBOVGP 입자 또는 야생형 입자와 4 °C에서 한밤동안 코팅된다. 상기 완충액의 일련의 희석이 1 mg/ml에서 0.015 mg/ml 단백질 농도의 범위로 사용된다. 플레이트가 세척되고 25 °C에서 2시간동안 차단된다(표 4 참조). 그 후, 플레이트가 PBS-트윈 20으로 세척되고, 다양한 항원에 대해 생성된 마우스 항체와 배양되며, 세척되고, PBS에서 1%(w/v) BSA에서 희석된 항-마우스 IgG:서양고추냉이(horse radish) 퍼옥시다제 콘주게이트(Sigma-Aldrich)와 실온에서 1시간동안 추가로 배양된다. 추가로 세척한 후에, o-페닐렌디아민(OPD) 기체(Sigma-Aldrich)가 첨가되고 플레이트가 실온에서 30분동안 배양된다. 상기 반응은 0.5 M H2SO4로 정지시키고, 흡광도가 495 nm에서 기록된다.

[1310]

5. 마우스의 면역화

[1311]

6-8주령의 암컷 C57BL/6 마우스(Malaghan Institute, Wellington, NZ)가 2주 간격으로 3번 근육내로 면역화한

다. 3개의 치료 그룹은 하기와 같다:

[1312] (a) 각자는 야생형 입자(예를 들면, pHAS 및 pMCS69를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)로 면역화;

[1313] (b) 각자는 항원 입자 단독(예를 들면, 다양한 항원-PhaC 융합 단백질 및 pMCS69를 코딩하는 플라스미드를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)으로 면역화; 및

[1314] (c) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 다양한 항원 입자로 면역화.

[1315] 백신화되지 않은 대조군 동물은 각 실험 세트에 대해서 포함된다.

[1316] 6. 면역학적 분석

[1317] 마우스가 최종 면역화하고 3주 후에 마취하고, 혈액을 수집하고, 원심분리하여, 혈청을 수집하고, 분석할 때까지 -20 °C에서 동결시킨다. 상기 마우스는 그후 안락사시키고, 이의 비장을 제거하고, 단일 세포 현탁액이 80 개이지 와이어 메시 체를 통과시킴으로써 제조된다. 비장 적혈구 세포(RBCs)가 17 mM TRIS-HCl 및 140 mM NH₄Cl의 용액을 사용하여 용해된다. 세척 후에, 상기 RBCs가 2 mM의 글루타민(Invitrogen), 100 U/mL의 페니실린(Invitrogen), 100 µg/mL의 스트렙토마이신(Invitrogen), 5x 10⁻⁵ M 2-머캅토에탄올(Sigma) 및 5%(w/w) 소태아 혈청(Invitrogen)이 보충된 Dulbecco 변형된 이글 배지(DMEM)에서 배양된다.

[1318] 7. 플라크 감소 중화 분석

[1319] 면역화된 마우스로부터 유래된 혈청이 플라크 감소 중화 시험에 의해 항체를 중화하는 에볼라 바이러스의 존재에 대해서 조사되었다. 일련의 희석된 혈청이 가열로 불활성화되고, 동종 및 이종 바이러스의 100 플라크 형성 유닛과 혼합되어 1시간동안 37 °C에서 배양된다. 상기 혈청 바이러스 혼합물이 베로(Vero) 세포 단일층과 1시간동안 배양하고 아가로스 함유 배지로 덮는다. 바이러스 플라크가 분석 10-12일에 염색된다. 플라크 수가 80% 감소된 최고 희석물이 플라크 감소 중화 80(PRNT₈₀)이다.

[1320] 8. 사이토킨 및 케모킨의 정량화

[1321] 배양 상청액이 배양 4일 후에 제거되고, 분석될 때까지 -20 °C에서 동결된다. 상기 상청액에서 사이토킨 및 케모킨의 수준은 상업적으로 이용할 수 있는 항체 및 표준(EBioscience)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 ELISA 및/또는 FACS(EBioscience)에 의해서 측정된다.

[1322] 9. 마우스 바이러스 방어 분석

[1323] 마우스 면역성 모델(mouse challenge model)이 사용되어 보조제를 갖는 입자와 보조제를 갖지 않는 입자를 나타내는 ZEBOVGP 및 SEBOVGP 항원의 조제들의 유효성을 확인하였다. B10.BR 마우스(MHE H-2^K), The Jackson Laboratory, ME)⁵가 상기 물질 및 방법의 (1)섹션에서 기술된 바와 같이 1, 5 및 10 µg 투여량을 사용하여 면역화된다. 면역화 이후에, ZEBOV 적응된 마우스의 1000xLD₅₀으로 복강내 주사(IP)에 의해 면역성 검사한다. 이 환률 및 사망률이 면역성 이후 12-16일동안 모니터링된다.

[1324] 보조제를 갖는 입자와 보조제를 갖지 않는 입자를 나타내는 ZEBOVGP 및 SEBOVGP 항원의 조제들의 유효성이 1000xLD₅₀의 30분후 IP 주사에 의해 백신 조제의 투여를 통해서 확인된다. 이환률 및 사망률이 면역성 이후 12-16일동안 모니터링된다.

[1325] 10. 혈청 항체의 정량화

[1326] 혈청 항체가 항체 캡처에 대한 고정된 항원을 나타내는 입자를 사용하여 ELISA에 의해서 측정된다.

[1327] 11. 통계학적 분석

[1328] 사이토킨, 케모킨 및 항체 반응의 분석이 가변의 Kruskal-Wallis one-way 분석(ANOVA)에 의해서 실시된다.

[1329] 결과

[1330] pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET14B-ZEBOVGP-C-SEBOVGP 또는 pET14B-SEBOVGP-C-ZEBOVGP 및 pHAS를 운반하는 세포의 GC-MS 분석으로 폴리에스테르 폴리히드록시부티레이트의 존재를 확인한다. 세포내 폴리에스테르 함유물의 존재는 Nile Red 염색을 사용하여 형광 현미경에 의해서 추가로 확인될 수 있다. pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET14B-ZEBOVGP-C-SEBOVGP 또는 pET14B-SEBOVGP-C-ZEBOVGP 및 pHAS(야생형 대조군)를 운반하는 세포에서

폴리히드록시부티레이트의 존재는 PhaC 폴리에스테르 신타제 영역이 단일 또는 3중 융합 단백질로서 존재할 때 폴리머 신타제 활성을 보유하는 것을 나타낸다.

[1331] 상기 입자는 융합 단백질 서열로부터 제외된 분자량과 직접 관련된 겔보기 분자량을 갖는 우세한 단백질 밴드에 의해서 개시된 바와 같이 고수준의 단백질을 나타낸다. 상기 단백질의 확인은 MALDI-TOF-MS를 사용하는 트립틱 펩티드 핑거프린팅에 의해서 확인된다. ELISA는 다양한 항원 표시 입자는 투여량-의존성 방식으로 각각의 항-항원 항체에 결합되고, 야생형 입자는 항체 결합이 상당히 떨어지는 것으로 보이는 것을 나타낸다. 유세포 분석 결과는 항원 입자의 >98%가 항-항원 항체와 결합하는 것을 보여준다. 결과는 다양한 항원-PhaC 융합 단백질을 코딩하는 각각의 하이브리드 유전자의 재조합 *이. 콜리*에서 발현은 이의 표면에서 융합 단백질을 나타내는 폴리에스테르 입자를 생성하는 것을 나타낸다.

[1332] 면역화 이후에 동물에서 명백한 독성이 관찰되지 않았다. 마우스 체중은 실험 기간 동안의 그룹들 사이에서 상당히 다르지 않으며, 모든 그룹에서 마우스가 체중이 증가되었다. 폴리에스테르 입자로 면역화된 마우스는 전형적으로 면역화 부위에서 작은 혹(직경 2.5 mm)이 발생되었지만, 농양이나 화농이 관찰되지 않았다. 모든 마우스는 전형적으로 실험을 통해서 정상의 거동 및 양호한 품질의 털 상태를 갖는 건강한 상태이다.

[1333] 항원 입자의 5-100 μ g의 투여량은 마우스에서 상당한 항체 반응을 발생하는데 최적이다. 상기 투여량은 야생형 입자 단독의 5-100 투여량과 비교할 때 상당히 높은 항체 역가를 포함한다. 면역화되지 않은 대조군 마우스를 포함하고 보조제를 갖는 비드 조제와 보조제를 갖지 않는 비드 조제를 비교하는 2번째 시험에서, 항원-특이성 혈청 항체 반응은 백신화되지 않은 마이스와 비교하여 항원 입자가 주어진 두 백신 그룹에 대해 상당히 높았다. 최대 항체 반응은 Emulsigen에서 항원 입자로 면역화된 마우스에서 관찰되었다. IgG1 이소타입에 대한 항체 반응은 IgG2에 대한 반응보다 더 강하다.

[1334] 5-100 μ g의 항원 입자로 면역화된 마우스의 항원에 대한 세포-매개 반응이 야생형 입자 단독, 또는 PBS 단독으로 면역화된 마우스와 비교하여 상당히 향상되었다. PBS-면역화된 대조군 마우스와 비교하여 야생형 입자 단독으로 면역화된 마우스의 세포-매개 반응에서 전형적으로 상당한 차이는 없다. 10-50 μ g의 야생형 입자로 2번 면역화된 마우스에서 항원에 대한 케모킨 및 사이토킨은 PBS-면역화된 대조군 마우스와 비교하여 전형적으로 상당한 차이는 없을 것이다. 대조적으로, 각 항원에 대한 상당히 더 큰 케모킨 및 사이토킨 반응이 항원 입자로 2번 면역화된 마우스와 항원 입자 및 Emulsigen으로 2번 면역화된 마우스에서 관찰되었다. 모든 다른 백신군에서보다 항원 입자와 Emulsigen으로 2번 면역화된 마우스에서 관찰된 각 항원에 대한 상당히 큰 사이토킨 및 케모킨 반응이 기대된다. 항원 ZEBOVGP 및 SEBOVGP 단백질을 나타내는 설계된 폴리에스테르 입자는 IgG1 및 IgG2 항체의 생성을 상당히 증가시킬 뿐만 아니라 항원-특이성 세포-매개 반응을 생성할 수 있다.

[1335] 야생형 입자로 면역화된 마우스에서 혈청은 플라크 감소 중화 분석에서 PBS-면역화 대조군 마우스와 상당한 차이는 없을 것이다. 플라크 감소 중화 분석에서 조제 ZEBOVGP 및 SEBOVGP로 면역화된 마우스로부터 혈청의 중화 역가는 야생형 입자 단독으로 면역화된 마우스의 혈청과 비교하여 상당히 더 높을 것이다. 플라크 감소 중화 분석에서 ZEBOVGP 및 SEBOVGP 입자를 포함하는 조제로 면역화된 마우스로부터 혈청의 중화 역가는 동종 및 이종 바이러스에서와 유사할 것이다.

[1336] PBS 또는 야생형 입자로 면역화된 마우스는 면역화 시간 및 순서와 상관없이 2개 그룹들 사이에서 상당한 차이 없이 바이러스 면역시에 죽을 것으로 기대된다. 바이러스 접종 전에 보조제를 갖는 입자와 보조제를 갖지 않는 입자를 나타내는 ZEBOVGP 및 SEBOVGP로 면역화된 마우스는 방어될 것으로 기대되며, 보조제를 포함하는 조제로부터 유래된 것이 방어가 더 양호하다. 또한, 보조제를 갖는 입자와 보조제를 갖지 않는 입자를 나타내는 ZEBOVGP 및 SEBOVGP로 면역화된 마우스는 방어될 것으로 기대된다.

[1337] ZEBOV-GP 및 SEBOV-GP 항원을 동시에 나타내는 설계된 폴리에스테르 입자는 IgG1 및 IgG2 항체의 생성을 상당히 증가시킬 뿐만 아니라 항원-특이성 세포-매개 반응을 생성할 수 있다. 중량 손실과 같은 부작용이 없고 주사 부위에서 농양과 화농이 없다는 것은 폴리에스테르 입자가 내성이 있고, 안전하며, 독성이 없다는 것을 나타낸다.

[1338] **실시예 12 - 웨스트 나일 바이러스 폴리머 입자 백신의 면역원성**

[1339] 본 실시예는 폴리머 입자의 면역원성의 분석과 함께, 웨스트 나일 바이러스(WNV)로부터 유래된 *플라비바이러스* 엔벨로프 항원(Flavivirus envelope antigen) (E), WNV 비리온의 표면에서 발현되는 비독성 단백질을 나타내는 폴리머 입자의 형질전환된 숙주, 본 경우에 *이. 콜리*에서 제조를 위한 플라스미드의 구조를 기술하였다. 상기 항원은 백신 개발에 대한 선도 후보물질로 고려된다. 몇가지 백신 조제가 현재 시험되고 있으며, 승인된 WNV

백신은 아니다. 본 실시예에서 제조되는 바와 같은 상기 항원을 나타내는 폴리머 입자는 WNVE에 대한 예방 및 치료 백신으로서 유용하다.

[1340] **물질 및 방법**

[1341] 모든 동물 실험은 AgResearch Grasslands 동물 윤리 위원회(Palmerston North, New Zealand)에 의해 승인되었다.

[1342] **1. 플라스미드의 구조**

[1343] 본 실시예에서 사용된 모든 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드가 하기 표 12에 기술되었다. 3-히드록시부티릴-코엔자임 A의 합성을 매개하는 효소가 플라스미드 pMCS69에 의해서 코딩된다.

[1344] WNVE 항원을 나타내는 폴리머 입자를 제조하기 위해서, 엔벨로프(E)를 코딩하는 유전자는 최적화된 코돈이며, 조화시키고, Genscript Inc.에 의해서 합성되어 PhaC 폴리머 비드 형성 효소에 융합된 C-말단에 대해 pET-14b PhaC-링커-GFP XhoI-BamHI 부위로 서브클로닝한다. 상기 E 코딩 유전자가 XhoI-BamHI 부위로 삽입된다. 상기 유전자 삽입이 치환된 원래 플라스미드의 GFP 코딩 영역과 프레임에 있으며, 플라스미드 pET14B-C-WNVE를 수득한다.

[1345] PhaC-WNVE 융합에 대한 구조가 서열 번호 53에 개시되어 있으며, 유래된 아미노산 서열은 서열 번호 54에 개시되어 있다.

표 12

플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드

플라스미드	상세
pHAS	시.네카타로부터 유래된 <i>phaC</i> 유전자로 삽입된 <i>NdeI/BamHI</i> 를 포함하는 pET14b 유도체
pMCS69	시.네카타로부터 유래된 유전자 <i>phaA</i> 및 <i>phaB</i> 를 포함하는 pBBR1MCS 유도체
pET-14b GFP	PhaC-링커 - <i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 GFP코딩 DNA 서열을 포함하는 pET-14b 유도체
pET14B-C-WNVE	<i>phaC</i> 의 3'말단에 융합된 WNVE 코딩 DNA 서열을 포함하는 pET-14b PhaC-링커 -GFP 유도체

[1346]

[1347] **2. WNVE를 나타내는 입자의 제조**

[1348] 플라스미드 pET14B-C-WNVE 및 pHAS가 플라스미드 pMCS69를 갖는 *E. coli* BL21 스타(DE3)로 도입된다. 형질전환체가 실시예 1에 기술된 바와 같이 바이오폴리에스테르 입자의 제조에 적당한 조건에서 배양된다.

[1349] **3. 기체 크로마토그래피 질량 분석(GC-MS)**

[1350] 다양한 플라스미드를 갖는 박테리아 세포의 폴리에스테르 함유량은 생체내 PhaC 신타제의 활성화에 상응한다. 측정된 폴리에스테르의 양이 기체 크로마토그래피-질량 분석기(GC-MS) 분석에 의해서 평가하여 PhaC 신타제 활성을 측정하고 특히 PhaC-WNVE 항원 융합이 폴리에스테르 합성을 촉매화하고 세포내 과립 형성을 매개하는지를 평가한다. 폴리에스테르 함유량은 산-촉매화 메타노라이시스(methanolysis)에 의해서 폴리에스테르가 3-히드록시메틸 에스테르로의 전환 이후에 GC-MS에 의해서 정량적으로 측정된다.

[1351] **4. 폴리에스테르 입자의 분리**

[1352] 폴리에스테르 과립이 실시예 3에 기술된 바와 같이 분리된다.

[1353] **5. 단백질 농도 측정**

[1354] 입자에 부착된 단백질의 농도는 실시예 3에 기술된 바와 같이 Bio-Rad 단백질 분석을 사용하여 측정된다.

[1355] **6. ELISA**

[1356] 웨스트 나일 바이러스 폴리머 입자의 면역-반응성이 실시예 3에 기술된 바와 같이 ELISA에 의해 측정된다. Maxisorb 플레이트(Nunc)가 카보네이트-비카보네이트 코팅 완충액(pH 9.6)(Sigma-Aldrich)에서 희석된 정제된 PhaC-WNVE 입자 또는 야생형 입자와 4 °C에서 한밤동안 코팅된다. 상기 완충액의 일련의 희석이 1 mg/ml에서 0.015 mg/ml 단백질 농도의 범위로 사용된다. 플레이트가 세척되고 25 °C에서 2시간동안 차단된다.

[1357] 그 후, 플레이트가 PBS-트윈 20으로 세척되고, 다양한 항원에 대해 생성된 마우스 항체와 배양되며, 세척되고, PBS에서 1%(w/v) BSA에서 희석된 항-마우스 IgG:서양고추냉이(horse radish) 퍼옥시다제 콘주게이트(Sigma-Aldrich)와 실온에서 1시간동안 추가로 배양된다. 추가로 세척한 후에, o-페닐렌디아민(OPD) 기체(Sigma-Aldrich)가 첨가되고 플레이트가 실온에서 30분동안 배양된다.

[1358] 상기 반응은 0.5 M H₂SO₄로 정지시키고, 흡광도가 495 nm에서 기록된다.

[1359] **7. 마우스의 면역화**

[1360] 6-8주령의 암컷 C57BL/6 마우스(Malaghan Institute, Wellington, NZ)가 2주 간격으로 3번 근육내로 면역화한다. 3개의 치료 그룹은 하기와 같다:

[1361] (a) 각자는 야생형 입자(예를 들면, pHAS 및 pMCS69를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)로 면역화;

[1362] (b) 각자는 항원 입자 단독(예를 들면, 다양한 항원-PhaC 융합 단백질 및 pMCS69를 코딩하는 플라스미드를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 입자)으로 면역화; 및

[1363] (c) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 다양한 항원 입자로 면역화.

[1364] 백신화되지 않은 대조군 동물은 각 실험 세트에 대해서 포함된다.

[1365] **8. 면역학적 분석**

[1366] 마우스가 최종 면역화하고 3주 후에 마취하고, 혈액을 수집하고, 원심분리하여, 혈청을 수집하고, 분석할 때까지 -20 °C에서 동결시킨다.

[1367] 상기 마우스는 그후 안락사시키고, 이의 비장을 제거하고, 단일 세포 현탁액이 80 게이지 와이어 메시 체를 통과시킴으로써 제조된다. 비장 적혈구 세포(RBCs)가 실시예 4에 기술된 바와 같이 처리된다.

[1368] **9. 플라크 감소 중화 분석**

[1369] 면역화된 마우스로부터 유래된 혈청이 플라크 감소 중화 시험에 의해 항체를 중화하는 웨스트 나일 바이러스의 존재에 대해서 조사되었다. 일련의 희석된 혈청이 가열로 불활성화되고, 동종 및 이종 혈청형 바이러스의 100 플라크 형성 유닛(PFU)과 혼합되어 1시간동안 37 °C에서 배양된다. 상기 혈청-바이러스 혼합물이 베로(Vero) 세포 단일층과 1시간동안 배양하고 아가로스 함유 배지로 덮는다. 바이러스 플라크가 분석 5일에 염색된다. 플라크 수가 80% 감소된 최고 희석물이 플라크 감소 중화 80(PRNT₈₀)이다.

[1370] **10. 사이토킨 및 케모킨의 정량화**

[1371] 배양 상청액이 배양 4일 후에 제거되고, 분석될 때까지 -20 °C에서 동결된다. 상기 상청액에서 사이토킨 및 케모킨의 수준은 상업적으로 이용할 수 있는 항체 및 표준(EBioscience)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 ELISA 및/또는 FACS(EBioscience)에 의해서 측정된다.

[1372] **11. 마우스 바이러스 방어 분석**

[1373] 마우스 면역성 모델(mouse challenge model)이 사용되어 보조제를 갖는 입자와 보조제를 갖지 않는 입자를 나타내는 웨스트 나일 E 항원의 조제들의 유효성을 확인하였다. 13일된 젖을 갓 떴 마우스가 상기 물질 및 방법의 (1)섹션에서 기술된 바와 같이 1, 5 및 10 µg 투여량을 사용하여 면역화된다. 면역화 이후에, 웨스트 나일 바이러스 적응된 마우스의 100 LD₅₀으로 두개내(IC)로 면역성 검사한다. 이환률 및 사망률이 면역성 이후 21일동안 모니터링된다.

[1374] **12. 혈청 항체의 정량화**

[1375] 혈청 항체기 항체 캡처에 대한 고정된 항원을 나타내는 입자를 사용하여 ELISA에 의해서 측정된다.

[1376] **13. 통계학적 분석**

[1377] 사이토킨, 케모킨 및 항체 반응의 분석이 가변의 Kruskal-Wallis one-way 분석(ANOVA)에 의해서 실시된다.

[1378] **결과**

[1379] pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET14B-C-WNVE 및 pHAS를 운반하는 세포의 GC-MS 분석으로 폴리에스테르 폴리히드록시부티레이트의 존재를 확인할 것이다. 세포내 폴리에스테르 함유물의 존재는 Nile Red 염색을 사용하여 형광 현미경에 의해서 추가로 확인될 수 있다.

[1380] pMCS69의 존재하에 플라스미드 pET14B-C-WNVE 및 pHAS(야생형 대조군)를 운반하는 세포에서 폴리히드록시부티레이트의 존재는 PhaC 폴리에스테르 신타제 영역이 단일 또는 3중 융합 단백질로서 존재할 때 폴리머 신타제 활성을 보유하는 것을 나타낸다.

[1381] 상기 입자에 의한 고수준의 단백질은 각각 융합 단백질 서열로부터 제외된 분자량과 직접 관련된 겔보기 분자량을 갖는 우세한 단백질 밴드에 의해서 측정된다. 상기 단백질의 확인은 MALDI-TOF-MS를 사용하는 트립틱 펩티드 핑거프린팅에 의해서 확인된다. ELISA 결과는 다양한 항원 표시 입자가 투여량-의존성 방식으로 각각의 항원 항체에 결합되고, 야생형 입자는 항체 결합이 상당히 떨어지는 것을 나타낸다. 유세포 분석 결과는 항원 입자의 >97%가 항-항원 항체와 결합하는 것을 보여준다.

[1382] PhaC-항원 융합 단백질을 코딩하는 각각의 하이브리드 유전자의 재조합 이. 콜리에서 발현은 이의 표면에서 융합 단백질을 나타내는 폴리에스테르 입자를 생성하는 것을 나타낸다.

[1383] 바람직하게, 면역화 이후에 동물에서 명백한 독성이 관찰되지 않았고, 마우스 체중은 실험 기간 동안의 그룹들 사이에서 상당히 다르지 않으며, 모든 그룹에서 마우스가 체중이 증가되었다(데이터가 개시되지 않음). 폴리에스테르 입자로 면역화된 마우스는 면역화 부위에서 작은 혹(직경 2.5 mm)이 발생되었지만, 농양이나 화농이 없고, 전형적으로 실험을 통해서 정상의 거동 및 양호한 품질의 털 상태를 갖는 건강한 상태이다. 항원 입자의 5-100 μ g의 투여량은 마우스에서 상당한 항체 반응을 발생한다. 상기 투여량은 야생형 입자 단독의 5-100 μ g 투여량과 비교할 때 상당히 높은 항체 역가를 포함한다. 다른 투여량이 또한 시험되고 사용될 수 있다. 면역화되지 않은 마우스(대조군)를 포함하는 2번째 실험에서, 마우스가 보조제를 갖거나 또는 갖지 않고 조제된 WNVE를 나타내는 입자(시험군)과 대조군 야생형 입자(비드 대조군)으로 면역화된다. 마우스는 백신화되지 않거나 또는 야생형 비드 면역화된 마우스와 비교하여 항원을 나타내는 입자가 주어진 두 마우스 그룹에 대해서 상당히 더 높은 항원-특이성 혈청 항체 반응에 대해서 평가되었다. 최대 항체 반응은 Emulsigen에서 제조된 항원 입자로 면역화된 마우스에서 관찰될 수 있다. IgG1 이소타입에 대한 항체 반응은 두 실험에서 IgG2에 대한 반응보다 더 강할 것이다.

[1384] 5-100 μ g의 항원 입자로 면역화된 마우스의 항원에 대한 세포-매개 반응이 야생형 입자 또는 PBS 단독으로 면역화된 마우스와 비교하여 또한 상당히 향상되었다. PBS-면역화된 대조군 마우스와 비교하여 야생형 입자 단독으로 면역화된 마우스의 세포-매개 반응에서 전형적으로 상당한 차이는 없다.

[1385] 야생형 입자로 면역화된 마우스에서 혈청은 플라크 감소 중화 분석에서 PBS-면역화 대조군 마우스와 상당한 차이는 없을 것이다. 플라크 감소 중화 분석에서 WNVE 입자를 포함하는 조제로 면역화된 마우스로부터 혈청의 중화 역가는 야생형 입자 단독으로 면역화된 마우스의 혈청과 비교하여 상당히 더 높을 것이다. 바람직하게, WNVE 입자를 포함하는 조제로 면역화된 마우스로부터 혈청의 중화 역가는 동종 및 이종 웨스트 나일 바이러스 사이에서 유사할 것이다.

[1386] 야생형 입자의 5-100 μ g으로 2회 면역화된 마우스에서 항원에 대한 케모킨 및 사이토킨 반응은 PBS-면역화된 대조군 마우스와 전형적으로 상당히 다르지 않을 것이다. 대조적으로, 상당히 큰 케모킨 및 사이토킨 반응이 항원 입자로 2번 면역화된 마우스 및 항원 입자와 Emulsigen으로 2번 면역화된 마우스에서 관찰되었다. 모든 다른 백신 그룹에서보다 항원 입자와 Emulsigen으로 2번 면역화된 마우스에서 관찰된 각 항원에 대해 상당히 큰 사이토킨 및 케모킨 반응이 기대된다. WNVE 항원을 나타내는 설계된 폴리에스테르 입자는 IgG1 및 IgG2 항체의 생성을 상당히 증가시킬 뿐만 아니라 항원-특이성 세포-매개 반응을 생성할 수 있다.

[1387] PBS 또는 야생형 입자로 면역화된 마우스는 2개 그룹들 사이의 상당한 차이 없이 바이러스 면역성 시에 죽을 것

으로 기대된다. 보조제를 갖는 것과 보조제를 갖지 않는 WNVE를 나타내는 입자로 면역화된 마우스는 방어될 것으로 기대되며, 보조제를 포함하는 조제로부터 유래된 것이 더 잘 방어한다.

[1388] WNVE를 나타내는 설계된 폴리에스테르 입자는 IgG1 및 IgG2 항체의 생성을 상당히 증가시킬 뿐만 아니라 항원-특이성 세포-매개 반응을 생성할 수 있다. 체액성 및 세포-매개 면역 반응의 생성 뿐만 아니라, 중량 손실과 같은 부작용이 없고 주사 부위에서 농양과 화농이 없다는 것은 폴리에스테르 입자가 내성이 있고, 안전하며, 독성이 없다는 것을 나타낸다.

[1389] 실시예 13 - 마우스에서 생체내 면역 연구

[1390] 본 실시예는 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자로 포유류 모델 생물체의 면역화를 기술하였다.

[1391] 물질 및 방법

[1392] 모든 동물 실험은 AgResearch Grasslands 동물 윤리 위원회(Palmerston North, New Zealand)에 의해 승인되었다.

[1393] 1. *이. 콜리* 및 *엘. 락티스*에서 폴리머 입자의 제조 및 플라스미드의 구조

[1394] 플라스미드가 실시예 1 및 실시예 2에 기술된 바와 같이 *엘. 락티스* 및 *이. 콜리*에서 결핵 항원 Ag-85A 및 ESAT-6을 나타내는 폴리머 입자의 생성을 위해 제조된다.

[1395] 폴리머 과립이 박테리아를 파괴함으로써 분리하고 전체 세포 용해물이 6000 g에서 15분 동안 4 °C에서 원리분리되어 폴리머 입자를 침전시킨다. 상기 입자가 글리세롤 그라디언트 초원심분리에 의해서 정제된다. 단백질의 농도가 제조자의 지시에 따라 Bio-Rad 단백질 분석을 사용하여 측정된다(Bio-Rad). 폴리머 입자에 부착된 전체 단백질의 양에 대한 Ag85A-ESAT-6:PhaC 융합 단백질의 양이 Gel Doc™ XR을 사용하여 검출되며, Quantity One 소프트웨어(버전 4.6.2, Bio-Rad)를 사용하여 분석된다. Tb 항원은 폴리머 입자의 전체 단백질의 약 20%를 설명한다. 목적하는 단백질의 확인은 MALDI-TOF-MS를 사용하여 확인된다.

[1396] 2. ELISA

[1397] 폴리머 입자의 활성이 실시예 3에 기술된 바와 같이 ELISA에 의해 측정된다. 흡광도가 VERSAax 마이크로플레이트 리더에서 490 nm에서 기록된다.

[1398] 3. 마우스의 면역화

[1399] 6-8주령의 암컷 C57BL/6 마우스(Malaghan Institute, Wellington, NZ)가 실시예 1, 2 및 3에 기술된 바와 같이 제조되고 분리된 결핵 폴리머 입자 백신으로 2주 간격으로 3번 피하로 면역화한다. 3개의 치료 그룹은 하기와 같다:

[1400] (a) 각자는 야생형 폴리머 입자(예를 들면, pHAS 및 pMCS69를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 폴리머 입자)로 면역화;

[1401] (b) 각자는 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자 단독(예를 들면, pHAS-Ag85A-ESAT-6 및 pMCS69를 운반하는 박테리아 세포로부터 제조된 폴리머 입자)으로 면역화; 및

[1402] (c) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제와 혼합된 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자(MVP Laboratories)로 면역화.

[1403] 백신화되지 않은 대조군 동물은 각 실험 세트에 대해서 포함된다.

[1404] 4. 면역학적 분석

[1405] 마우스가 최종 면역화하고 3주 후에 마취하고, 혈액을 수집하고, 원심분리하여, 혈청을 수집하고, 분석할 때까지 -20 °C에서 동결시킨다.

[1406] 상기 마우스는 그후 안락사시키고, 이의 비장을 제거하고, 단일 세포 현탁액이 80 게이지 와이어 메시 체를 통과시킴으로써 제조된다. 비장 적혈구 세포(RBCs)가 17 mM TRIS-HCl 및 140 mM NH₄Cl의 용액을 사용하여 용해된다. 세척 후에, 상기 RBCs가 2 mM의 글루타민(Invitrogen), 100 U/mL의 페니실린(Invitrogen), 100 µg/mL의 스트렙토마이신(Invitrogen), 5x 10⁻⁵ M 2-머캅토에탄올(Sigma) 및 5%(w/w) 소태아 혈청(Invitrogen)이 보충된 Dulbecco 변형된 이글 배지(DMEM)에서 배양된다.

[1407] 상기 세포가 배지 단독, 또는 Ag85A, ESAT-6, 또는 이들 항원의 조합을 포함하는 배지에서 10% CO₂에서 37 °C에

서 배양된다.

[1408] 5. IFN- γ 의 정량화

[1409] 배양 상청액이 배양 4일 후에 제거되고 분석할 때까지 -20°C 에서 동결된다. 상기 상청액에서 IFN- γ 의 수준이 상업적으로 입수가 가능한 항체 및 표준(BD Pharmingen)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 ELISA(BD Biosciences)에 의해서 측정된다.

[1410] 6. 혈청 항체의 정량화

[1411] 혈청 항체가 모노클로날 항-ESAT-6 또는 항-Ag85A 항체(Abcam)를 사용하여 제조자의 추천에 따라 ELISA에 의해서 측정된다.

[1412] 7. 통계 분석

[1413] IFN- γ 반응 및 항체 반응의 분석이 가변의 Kruskal-Wallis one-way 분석(ANOVA)에 의해서 실시된다.

[1414] 결과

[1415] 면역화 이후에 동물에서 명백한 독성이 관찰되지 않았다. 마우스 체중은 실험 기간 동안의 그룹들 사이에서 상당히 다르지 않으며, 모든 그룹에서 마우스가 체중이 증가되었다(데이터가 개시되지 않음). 폴리에스테르 폴리머 입자로 면역화된 마우스는 면역화 부위에서 작은 혹(직경 2.5 mm)이 발생되었지만, 농양이나 화농이 관찰되지 않았다. 모든 마우스는 실험을 통해서 정상의 거동 및 양호한 품질의 털 상태를 갖는 건강한 상태이다(데이터가 개시되지 않음).

[1416] Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자의 30 μg 의 투여량은 마우스에서 상당한 항체 반응을 발생하는데 최적인 것을 나타낸다(도 5 참조). 상기 투여량은 재조합 Ag85A-ESAT-6 단백질 단독의 30 μg 투여량과 비교할 때 상당히 높은 항체 역가를 유도한다($P<0.01$). 면역화되지 않은 대조군을 포함하고 보조제를 갖는 비드 조제와 보조제를 갖지 않는 비드 조제를 비교하는 2번째 시험에서, 항원-특이성 혈청 항체 반응은 백신화되지 않은 마이스와 비교하여 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자가 주어진 백신 그룹에 대해 상당히 높다($P<0.01$, 도 6 참조). 최대 항체 반응은 Emulsigen에서 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자로 면역화된 마우스에서 관찰된다. IgG1 이소타입에 대한 항체 반응은 두 실험에서 IgG2에 대한 반응보다 더 강할 것이다.

[1417] 도 7에 개시된 바와 같이, 10 μg 또는 30 μg 의 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자로 면역화된 마우스의 ESAT-6 및 Ag85A에 대한 세포-매개 반응은 재조합 ESAT-6-Ag85A 항원 단독($P<0.01$) 또는 PBS 단독($p<0.01$)으로 면역화된 마우스와 비교하여 상당히 향상되었다. PBS-면역화된 대조군 마우스와 비교하여 항원 단독으로 면역화된 마우스의 세포-매개 반응에서 상당한 차이는 없다.

[1418] 도 8에 개시된 바와 같이, 30 μg 의 야생형 폴리머 입자(Tb 항원은 없음)로 3번 면역화된 마우스에서 ESAT-6 또는 Ag85A 항원에 대한 IFN- γ 반응은 PBS-면역화된 대조군 마우스와 상당히 다르지 않다. 대조적으로 각 항원에 대한 상당히 큰 IFN- γ 반응은 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자($p<0.01$)로 3번 면역화된 마우스 및 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자 및 Emulsigen($p<0.01$)으로 3번 면역화된 마우스에서 관찰된다. 실제로, 각 항원에 대한 상당히 큰 IFN- γ 반응은 모든 다른 백신 그룹($p<0.01$, **)보다 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자 및 Emulsigen으로 3번 면역화된 마우스에서 관찰된다.

[1419] 토의

[1420] Ag85A-ESAT-6 항원 융합을 나타내는 설계된 폴리에스테르 폴리머 입자는 IgG1 및 IgG2 항체의 제조를 상당히 증가시킬 뿐만 아니라 항원-특이성 세포-매개 반응을 제조할 수 있다. 특히, 항원 단독(예컨대, 본 발명의 폴리머 입자를 포함하지 않는 항원)으로 면역화는 세포-매개 반응을 유도하는데 비효율적이다.

[1421] 상기 결과는 또한 면역 반응의 보충적 측면을 유도하는 백신-송달 시스템의 다면성 및 가능성을 입증하였으며, 이로 인해 체액성 및 세포-매개 면역 반응 모두가 유도되었다.

[1422] 중량 손실과 같은 부작용 및 주사 부위에서 농양과 화농이 없다는 것은 폴리에스테르 폴리머 입자는 내성이 있고, 안전하며, 독성이 없다는 것을 나타낸다.

[1423] 실시예 14 - 생체내 면역화된 마우스에서 병원성 유발

[1424] 본 실시예는 *옴. 보비*스로 병원성 유발(pathogenic challenge)에 노출된 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자에 의한 포

유류 모델의 면역화의 유효성을 기술하였다.

[1425] 물질 및 방법

[1426] 모든 동물 실험은 AgResearch Grasslands 동물 윤리 위원회(Palmerston North, New Zealand)에 의해 승인되었다.

[1427] 1. 폴리에스테르 폴리머 입자의 분리 및 플라스미드의 구조

[1428] 플라스미드가 실시예 1 및 실시예 2에 기술된 바와 같이 *엘. 락티스* 및 *이. 콜리*에서 결핵 항원 Ag-85A 및 ESAT-6을 나타내는 폴리머 입자의 생성을 위해 제조된다.

[1429] 폴리머 과립이 박테리아를 파괴함으로써 분리하고 전체 세포 용해물이 6000 g에서 15분 동안 4 °C에서 원리분리되어 폴리머 입자를 침전시킨다. 상기 입자가 글리세롤 그라디언트 초원심분리에 의해서 정제된다. 단백질의 농도가 제조자의 지시에 따라 Bio-Rad 단백질 분석을 사용하여 측정된다(Bio-Rad). 폴리머 입자에 부착된 전체 단백질의 양에 대한 Ag85A-ESAT-6:PhaC 융합 단백질의 양이 Gel Doc™ XR을 사용하여 검출되며, Quantity One 소프트웨어(버전 4.6.2, Bio-Rad)를 사용하여 분석된다. Tb 항원은 폴리머 입자의 전체 단백질의 약 20%를 설명한다. 목적하는 단백질의 확인은 MALDI-TOF-MS를 사용하여 확인된다.

[1430] 2. ELISA

[1431] 폴리머 입자의 활성이 실시예 3에 기술된 바와 같이 ELISA에 의해 측정된다. 흡광도가 VERSAax 마이크로플레이트 리더에서 490 nm에서 기록된다.

[1432] 3. 마우스의 면역화

[1433] 6-8주령의 암컷 C57BL/6 마우스(Malaghan Institute, Wellington, NZ)가 매주 간격으로 3번 피하로 면역화된다. 7개의 치료 그룹(그룹당 n=6)은 하기와 같다:

[1434] (a) 각자는 PBS 및 Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)로 면역화.

[1435] (b) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자(*이. 콜리* 속주)로 면역화.

[1436] (c) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 야생형 폴리머 입자(*이. 콜리* 속주)로 면역화.

[1437] (d) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자(*엘. 락티스* 속주)로 면역화.

[1438] (e) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 야생형 폴리머 입자(*엘. 락티스* 속주)로 면역화.

[1439] (f) 각자는 20% Emulsigen™ 보조제(MVP Laboratories)와 혼합된 제조합 Ag85A-ESAT-6 항원으로 면역화.

[1440] (g) 각자는 BCG 10⁶ CFU 투여량으로 면역화.

[1441] 백신화되지 않은 대조군 동물은 각 실험 세트에 대해서 포함된다.

[1442] 4. 병원성 면역검사(pathogenic challenge)

[1443] 첫번째 백신화하고 15주 후에, 모든 마우스가 *마이코박테리움 보비스*(*Mycobacterium bovis*)에 의해서 면역검사를 한다. *엘. 보비스*가 트윈 알부민 배양액(트윈 80, 두보스(Dubos) 배양액 베이스 및 올레산-알부민-텍스트로스, Difco)에서 로-패시지 시드 로트(low-passage seed lot)로부터 초기 미드-로그 페이스(early mid-log phase)까지 배양한다. 상기 배양의 분취량을 필요할 때까지 -70 °C에서 동결시킨다.

[1444] 저투여량의 에어로졸 노출에 의한 상기 마우스의 감염에 의해서, 희석된 *엘. 보비스* 원료가 약 50 박테리아를 각 마우스의 폐로 송달되도록 보정된 Madison 챔버 에어로졸 생성 장치를 사용하여 투여된다.

[1445] 5. 면역학적 분석

[1446] 마우스가 체중의 1g 당 87 µg 케타민(Parnell Laboratories, Australia) 및 2.6 µg 크실라진 히드로클로라이드를 사용하여 병원성 면역검사와 5주 후에 복강으로 마취한다. 혈액을 수집하고, 원심분리하여, 혈청을 수

집하고, 분석할 때까지 -20 °C에서 동결시킨다.

[1447] 상기 마우스는 그후 안락사시키고, 이의 비장 및 폐를 제거한다. 침단의 폐엽이 폐로부터 제거되고, 10% 완충된 포르말린에서 보존되고, 연이어 조직학적 처리한다. 섹션은 Ziehl-Neelson 및 해마톡실린 및 에로신 염색으로 염색된다.

[1448] 비장 및 남아있는 폐 시료가 Seward Stomacher® 80(Seward, UK)을 사용하여 0.5% 트윈 80을 갖는 3 mL의 PBS에서 기계적으로 균질화하고, 10% 올레산-알루민-텍스트로스-카탈라제 농축물(BD)이 보충된 선택적 Middlebrook 7H11 아가에서 10배 희석에서 플레이팅한다. 플레이트가 카운팅하기 전에 3주 동안 습윤된 공기에서 37 °C에서 배양된다.

[1449] 6. 혈청 항체의 정량화

[1450] 혈청 항체가 모노클로날 항-ESAT-6 항체(Abcam)를 사용하여 제조자의 추천에 따라 ELISA에 의해서 측정된다. 간단하게, 마이크로플레이트 고-결합 플레이트(Greiner)가 5 µg/mL의 recAg85A-ESAT-6으로 한밤동안 코팅되고, 1% BSA로 블로킹하며, PBST에서 세척된다. 혈청의 5배 희석물(1:50 내지 1:6250)이 첨가되고 배양된다. 세척한 후에, 항-마우스 IgG1:HRP 또는 IgG2c:HRP(ICL, USA)가 첨가되고, 플레이트가 배양된다. 플레이트가 세척되고, VERSAmax 마이크로플레이트 리더에서 450 nm에서 판독하기 전에 TMB가 기제로서 사용된다.

[1451] 모노클로날 항-ESAT6 항체가 적정되고, IgG1 플레이트에 대한 포지티브 대조군으로서 포함된다.

[1452] 7. 통계 분석

[1453] *엘. 보비스* 병원성 면역 검사 및 항체 반응으로부터 박테리아 카운트의 분석은 가변의 Fisher's one-way 분석(ANOVA)에 의해서 실시되며, 유의도 수준은 $P < 0.05$ 이다.

[1454] 결과

[1455] *엘. 락티스*에서 생성된 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자의 반응성은 ESAT-6 항체에 대한 투여량-의존성 반응을 나타내며, 항체 결합은 야생형 폴리머 입자에 대해서 관찰되지 않았다(도 9).

[1456] 폐 배양에서, Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자에 의한 백신화는 PBS-면역화 네가티브 대조군과 비교하여 감염에 대한 상당히 향상된 저항성을 제공한다(도 10, $*p < 0.05$). 상기 향상된 저항성은 *이. 콜리* 또는 *엘. 락티스* 숙주에서 합성된 입자에 의해서 제공된다. 또한, *이. 콜리* 숙주에서 합성된 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자에 의한 백신화는 항원 단독으로 제공된 것과 비교하여 상당히 좋은 방어를 제공한다. 실제로, Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자는 금 표준 BCG 백신에 대한 상당한 방어를 보여준다(도 10).

[1457] 중요하게, 재조합 Ag85A-ESAT-6 항원 단독(예컨대, 본 발명의 폴리머 입자를 포함하지 않는 항원)에 의한 백신화는 PBS-면역화 대조군과 비교하여 감염에 대한 향상된 저항성을 제공하지 않는다.

[1458] 비장 배양에서, Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자에 의한 백신화는 PBS-면역화 네가티브 대조군과 비교하여 감염에 대한 상당히 향상된 저항성을 제공한다(도 11, $*p < 0.05$). 또한, *이. 콜리* 숙주에서 합성된 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자에 의한 백신화는 항원 단독으로 제공된 것과 비교하여 상당히 좋은 방어를 제공한다. 야생형 폴리머 입자(예컨대, Tb 항원이 없는 폴리머 입자)에 의한 면역화도, 재조합 Ag85A-ESAT-6 항원 단독에 의한 면역화도 방어 반응을 제공하지 않는다.

[1459] 도 12 및 13은 특이적 세포-매개 반응 뿐만 아니라, 체액성 반응이 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자에 의한 백신화된 마우스에서 또한 유도된다. BCG 백신과 비교하여, IgG2c 항체 반응은 *이. 콜리*에서 생성된 Ag85A-ESAT-6 폴리머 입자가 더 크다.

[1460] 토의

[1461] *이. 콜리* 및 *엘. 락티스* 둘 다에서 생성된 Ag85A-ESAT-6 항원 융합을 나타내는 폴리머 입자에 의한 면역화는 *엘. 보비스*에 의한 면역화된 동물에 대해서 면역학적 방어를 제공할 수 있다.

[1462] 폐에서, Ag85A-ESAT-6 항원 융합을 나타내는 폴리머 입자로 면역화에 의해서 제공된 감염은 BCG 백신에 상응한다. 상기 본 발명의 폴리머 입자가 초기 감염 및 콜로니화(colonisation)를 포함하는 Tb 감염에 대한 방어 면역학적 반응을 유도할 수 있다.

[1463] 대조군 포유류와 비교하여 Ag85A-ESAT-6 항원 융합을 나타내는 폴리머 입자로 면역화된 포유류의 비장에서 관찰된 감염의 감소는 본 발명의 폴리머 입자에 의한 면역화가 Tb 침투(infiltration) 및 질병 진행에 대한 방어를

제공한다.

- [1464] 다시, 부작용의 결여는 본 발명의 폴리머 입자가 내성이 있고, 안전하며, 독성이 없다는 것을 나타낸다.

산업상 이용가능성

- [1465] 방법, 폴리머 입자 및 융합 단백질을 포함하는 본 명세서에 기술된 본 발명의 측면은 질병, 진단, 단백질 제조, 생촉매 부동화(biocatalyst immobilisation) 및 약물 송달의 치료 및 예방에 유용하다.

- [1466] 당분야의 통상의 지식을 가진 사람은 상기 명세서에 설명을 위해서만 제공되며 본 발명은 이에 제한되지 않는 것을 이해할 것이다.

[1467] 참고 문헌

- [1468] Anderson, P. "Tuberculosis vaccines - an update" *Nature* (2007) 5: 484-487
- [1469] Anthony, C. "*The Biochemistry of Methylophilic*" Academic Press, London, United Kingdom (1982)
- [1470] Ausubel, et al "*Current protocols in Molecular Biology*" Greene Publishing (1987)
- [1471] Backstrom, B.T. *et al.* "Recombinant *Escherichia coli* produces tailor made biopolyester granules for applications in fluorescence activated cell sorting: functional display of the mouse interleukin-2 and myelin oligodendrocyte glycoprotein" *BMC Biotechnology* (2007) 7: 3-14
- [1472] Balance, DJ. *et al.*, "Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*" *Biochem. Biophys. Res.-Commun.* (1983) **112**: 284-289
- [1473] Barnard et al. "High level recombinant protein expression in *Ralstonia eutropha* using T7 RNA polymerase based amplification" *Protein Expr Puri* (2004) **38**: 264-71
- [1474] Barnes and Cave "Current concepts:molecular epidemiology of tuberculosis" *New England Journal of Medicine* (2003) **349**: 1149-1156
- [1475] Beach, D. and Nurse. P. "High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*" *Nature* **290**: 140-1421981
- [1476] Belisle, J.T. *et al.* "*Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*" ASM Press, Washington D.C. (2005)
- [1477] Bowie, J.U. *et al* "Deciphering the message in protein sequences: tolerance to amino acid substitutions" *Science* (1990) 247: 1306-1310
- [1478] Brockelbank J. A., et al. "Recombinant *Escherichia coli* Strain Produces a ZZ Domain Displaying Biopolyester Granules Suitable for Immunoglobulin G Purification" *Applied and Environmental Microbiology* (2006) **72**: 7394-7397
- [1479] Brunschwig, E and Darzins, A. "A two-component T7 system for the overexpression of genes in *Pseudomonas aeruginosa*" *Gene* (1992) **111**: 35-41
- [1480] Case et al., *Proceedings of the National Academy of Science USA* (1979) **76**: 5259-5263
- [1481] Chang et al., *Nature*, 275: 615 (1978)
- [1482] DeBoer et al., "The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp lac promoters" *Proceedings of the National Academy of Science USA* (1983) **80**: 21-25
- [1483] Dietrich, J. *et al* "Prospects of a novel vaccine against tuberculosis" *Veterinary Microbiology* **112**: 163- 169
- [1484] Flee, R. *et al.*, "Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin in *Kluyveromyces yeasts*" *Bio/Technology* **9**: 968-975
- [1485] Friehs & Reardon "Parameters Influencing the Productivity of Recombinant *E. coli* Cultivations". *Advances in Biochemical Engineering Technology* Vol 48 Springer Verlag (1991)

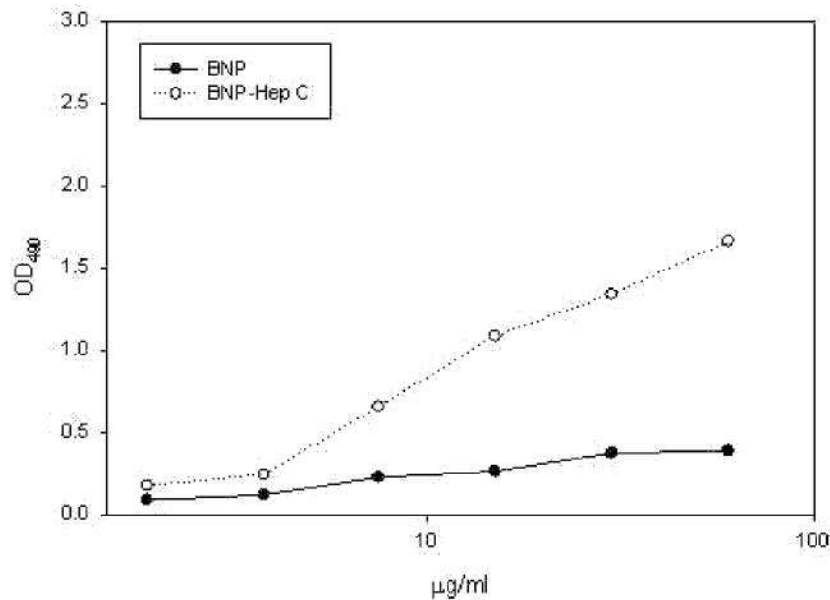
- [1486] Goeddel, D.V. *et al.* "Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone" (1979) *Nature* **281**: 544-548
- [1487] Goeddel, D.V. "Synthesis of human fibroblast interferon by *E. coli*" *Nucleic Acids Research* (1980) **8**: 4057-4074
- [1488] Hess, B. *et al.* "Cooperation of glycolytic enzymes" *Advances in Enzyme Regulation* (1968) **7**: 149-167.
- [1489] Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)]
- [1490] Holland, M.J. and Holland, J.P. "Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and phosphoglycerate kinase" *Biochemistry* (1978) **17**: 4900-4907
- [1491] Huang, X. "On global sequence alignment" *Computer Application in the Biosciences* (1994) **10**: 227-235
- [1492] Kelly, J.M. and Hynes, M.J. "Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* 22 gene of *Aspergillus nidulans*" *EMBO Journal* (1985) **4**:475-479
- [1493] Kingsman, A.J. *et al.*, "Replication in *Saccharomyces cerevisiae* of plasmid pBR313 carrying DNA from the yeast *trp1* region" *Gene* (1979) **7**:141-152
- [1494] Kirby, D.J. *et al* "PLGA microspheres for the delivery of a novel subunit TB vaccine" *Journal of Drug Targeting* (2009) **16**: 282-293
- [1495] Louvencourt *et al.* "Transformation of *Kluyveromyces lactis* by killer plasmid DNA" *Journal of Bacteriology* (1983) **154**: 737-742
- [1496] Madison, L. L. *et al*, "Metabolic Engineering of Poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic", *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (1999) **63**: 21-53
- [1497] Mather, J.P. "Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines" *Biology of Reproduction* (1980) **23**: 243-251
- [1498] Mather, J.P. *et al.* "Culture of Testicular Cells in Hormone-Supplemented Serum-Free Medium" *Annals of the NY Academy of Science* (1982) **383**:44-68
- [1499] Mitsopoulos G *et al.* "Tagged library approach to chemical genomics and proteomics" *Current Opinion in Chemical Biology* (2004) **8**:26-32
- [1500] Mustafa, A. S. "Biotechnology in the development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis" *Current Pharmaceutical Biotechnology* (2001) **2**: 157-173
- [1501] Peters, V. and Rehm, B. H. A. "In vivo enzyme immobilization by use of engineered polyhydroxyalkanoate synthase" *Applied and Environmental Microbiology* (2006) **72**: 1777-83
- [1502] Rehm, B.H.A. "Polyester synthesis; natural catalysts for plastics" *Biochemical Journal* (2003) **376**: 15-33
- [1503] Rehm, B.H.A. "Biopolyester particles produced by microbes or using polyester synthases: self assembly and potential applications" *Microbial Biotechnology: biological self-assembly systems and biopolymer-based nanostructures* Horizon Bioscience (2006)
- [1504] Sambrook, *et al* "*Molecular Cloning; a Laboratory Manual*" (2nd ed) Cold Spring Harbor Press (1987)
- [1505] Sreekrishna K *et al.* "High level expression of heterologous proteins in methylotropic yeast *Pichia pastoris*" *Journal of Basic Microbiology* (1988) **28**: 265-278
- [1506] Stinchcomb, D. T. *et al.* "Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator" *Nature* (1979) **282**: 39-43
- [1507] Tilburn, J. *et al.* "Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*" *Gene* (1983) **26**: 205-221

- [1508] Tschemper, G and Carbon, J. "Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene" *Gene* (1980) 10:157-166
- [1509] Urlaub, G. and Chasin, L.A. "Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydro folate reductase activity" *Proceedings of the National Academy of Science USA* (1980) **77**:4216-4220.
- [1510] Van den Berg, G. *et al.* "Kluyveromyces as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosm" *Bio/Technology* (1990) **8**: 135-139
- [1511] Yelton, M.M. *et al.* "Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid" *Proceedings of the National Academy of Science USA* (1984) **81**: 1470-1474
- [1512] ***
- [1513] 본 명세서에 참고되거나 또는 언급된 모든 특허, 공보, 과학 문헌, 웹 사이트 및 기타 문헌 및 물질은 본 발명이 관련된 당분야의 통상의 지식을 가진 사람의 수준의 지표이며, 상기 참고된 문헌 및 물질은 개별적으로 전문에 포함되거나 또는 본원에 전문이 개시될 수 있는 경우 동일한 정도로 포함된다. 출원인은 상기 특허, 공보, 과학 문헌, 웹 사이트, 전자적으로 이용가능한 정보, 및 다른 참고 물질 또는 문헌으로부터의 모든 물질 및 정보를 본 명세서에 물리적으로 포함할 수 있다.
- [1514] 본 특허의 명세서 부분은 모든 청구범위를 포함한다. 또한, 모든 우선권 서류에서의 청구범위 뿐만 아니라 모든 원 청구범위를 포함하는 모든 청구범위는 이의 전문이 명세서로 참고문으로 포함되며, 출원인은 명세서 또는 모든 청구범위로 물리적으로 포함된다. 그러므로, 예를 들면 어떤 환경하에서도 청구범위 중 정확한 단어는 특허의 명세서에서 이러한 말로서 나타나는 않는다는 주장에서 청구범위에 대한 서면을 제공하는 것은 아니라고 해석될 수 없다.
- [1515] 본 명세서에 기술된 모든 특징은 조합 형태로 조합될 수 있다. 그러므로, 달리 언급하지 않는다면, 기술된 각 특징은 일련의 균등하거나 또는 유사한 특징의 예에 불과하다.
- [1516] 본 발명은 이의 상세한 설명과 결합하여 기술되며, 상기 설명은 본원의 범위를 설명하기 위한 것으로 한정하는 것은 아니며, 첨부된 청구범위에 의해서만 한정되는 것으로 이해된다. 그러므로, 상기로부터 본 발명의 특정 비제한적인 실시양태가 설명을 목적으로 하는 본 명세서에 기술되었음에도 불구하고, 다양한 변형이 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 만들어질 수 있다는 것이 이해될 것이다. 다른 측면, 이점 및 변형이 하기 청구범위안에 있으며, 본 발명은 첨부된 청구범위를 제외하고는 제한되지 않는다.
- [1517] 본 명세서에 기술된 특정 방법 및 조성물은 바람직한 비제한적인 실시양태를 대표하며, 예시하는 것이며 본 발명의 범위를 제한하는 것을 의도하지 않는다. 기타 목적, 측면 및 실시양태가 본 명세서를 고려하여 당분야의 통상의 지식을 가진 사람에게 이해될 수 있으며, 청구의 범위에 의해서 정의된 바와 같이 본 발명의 사상안에 포함된다. 다양한 치환 및 변형은 본 발명의 범위 및 사상으로부터 벗어나지 않고 본 명세서에 기술된 방법으로 제조될 수 있다는 것은 당분야의 통상의 지식을 가진 사람에게 명백할 것이다. 본 명세서에 개시된 설명적 발명은 요소 또는 요소들, 또는 제한 또는 제한들의 부재하에 실시할 수 있으며, 본질적으로 본원에 명시적으로 개시하지 않았다. 그러므로, 예를 들면 본 명세서의 예에서, 본 발명의 비제한적인 실시양태 또는 실시예에서, 용어인 "포함하는(comprising)", "포함하는(including)" 및 "포함하는(containing)" 등은 제한되지 않고 광범위하게 해석된다. 본 명세서에 설명적으로 기술된 방법 및 과정은 단계의 다른 순서로 실시될 수 있으며, 본 명세서 또는 청구범위에 기술된 단계 순서에 반드시 한정되는 것은 아니다.
- [1518] 사용된 용어 및 표현은 설명을 위해 사용되며 한정하지 않으며, 개시되고 기술된 특징의 균등물 또는 이의 일부를 제외하는 상기 용어 및 표현의 사용에 의도하지 않지만, 다양한 변형이 청구된 바와 같은 본 발명의 범위안에서 가능한 것이 인정된다. 그러므로, 본 발명은 다양한 비제한적인 실시양태 및/또는 바람직한 비제한적인 실시양태 및 선택적 특징에 의해서 특별히 기술되지만 당분야의 통상의 지식을 가진 사람에게 의해서 이해될 수 있는 본 명세서에 기술된 개념의 변형 및 변화의 일부와 전부는 첨부된 청구범위에 의해서 한정된 본 발명의 범위안에 있는 것으로 고려된다.
- [1519] 본 발명은 명세서에서 넓고 포괄적으로 기술되었다. 일반적인 기술안에 포함된 더 좁은 중 및 아중 그룹은 본 발명의 일부를 또한 형성한다. 상기는 삭제된 물질이 명세서에 특별히 인용되었는지의 여부와 관계없이 종으로부터 유래된 물질을 네가티브 한정적으로 제외하는 본 발명의 일반적 기재를 포함한다.
- [1520] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 달리 명시하지 않는 한

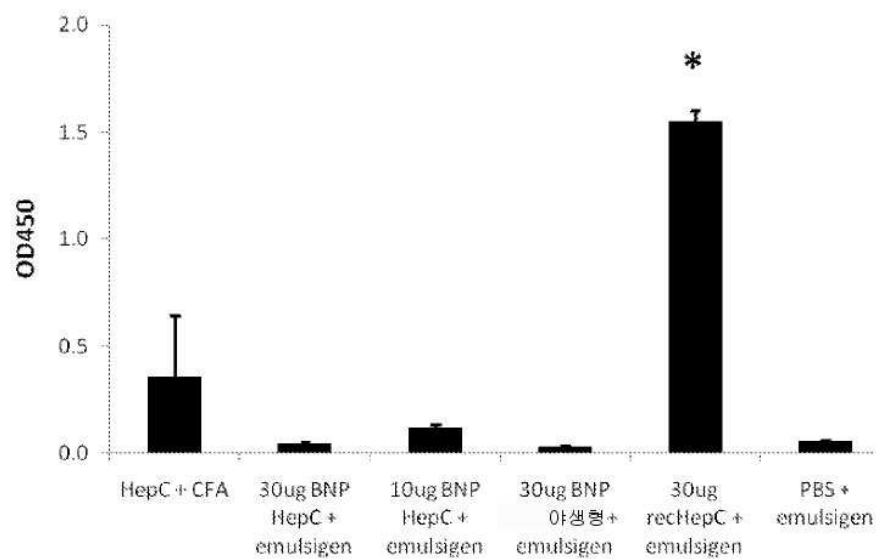
복수 형태를 포함하며, 용어 "X 및/또는 Y"는 "X" 또는 "Y" 또는 "X"와 "Y" 둘 다를 의미하며, 명사뒤에 붙은 "s"는 그 명사의 복수형과 단수형 모두를 나타낸다. 또한, 본 발명의 특징 또는 측면은 마쿠시(Markush) 그룹을 기초로 기술되었고, 당분야의 통상의 지식을 가진 사람은 본 발명은 마쿠시 그룹의 멤버의 서브그룹 및 개별 멤버에 기초하여 기술되고 포함되며 출원인은 마쿠시 그룹의 멤버의 서브그룹 또는 개별 멤버에 특별히 언급되는 출원 또는 청구범위를 포함하는 것을 인정할 것이다.

도면

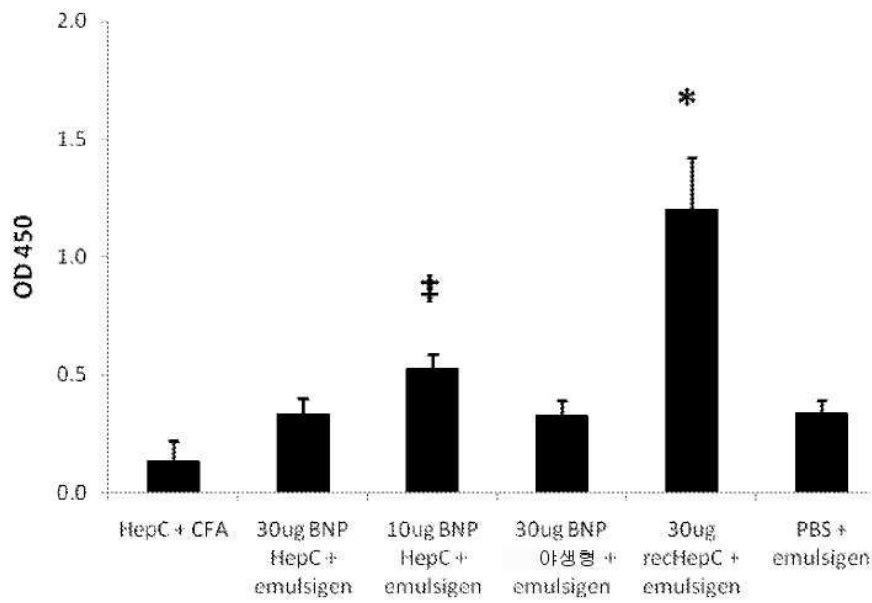
도면1



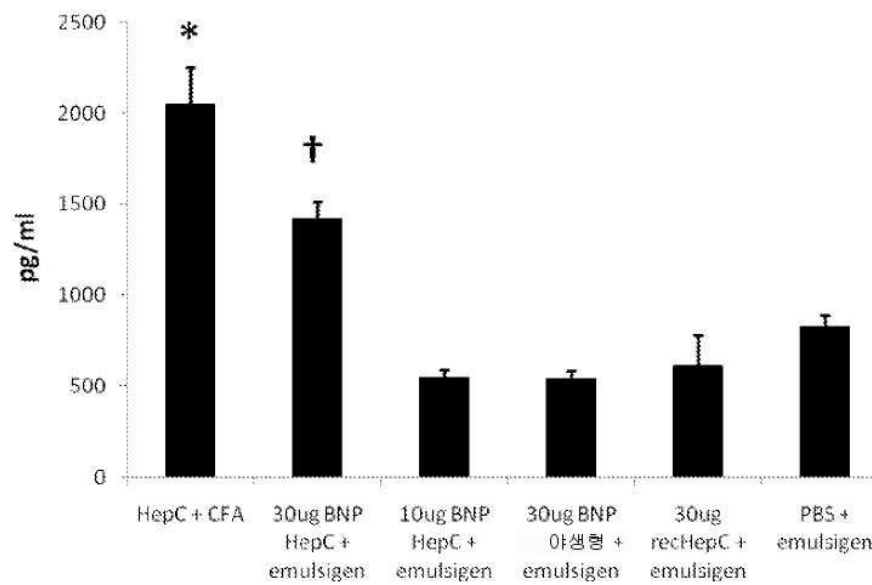
도면2



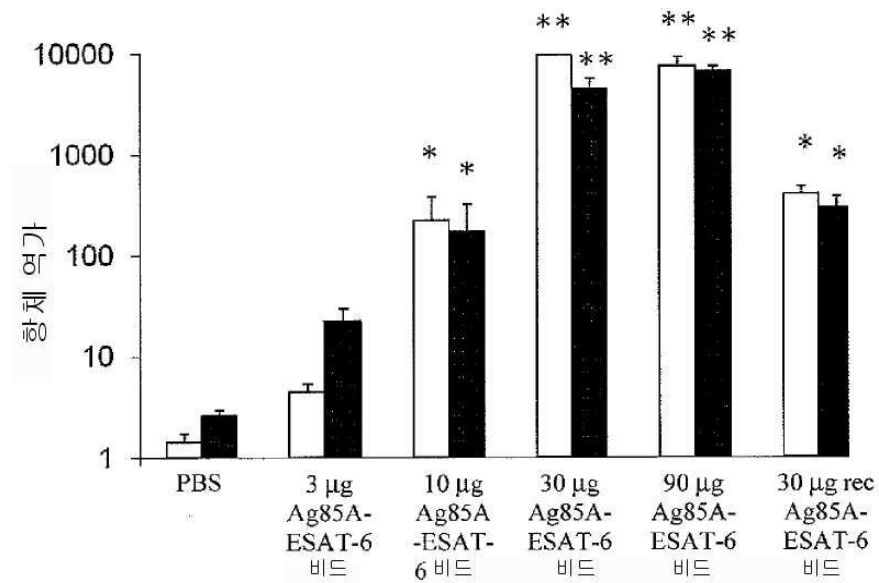
도면3



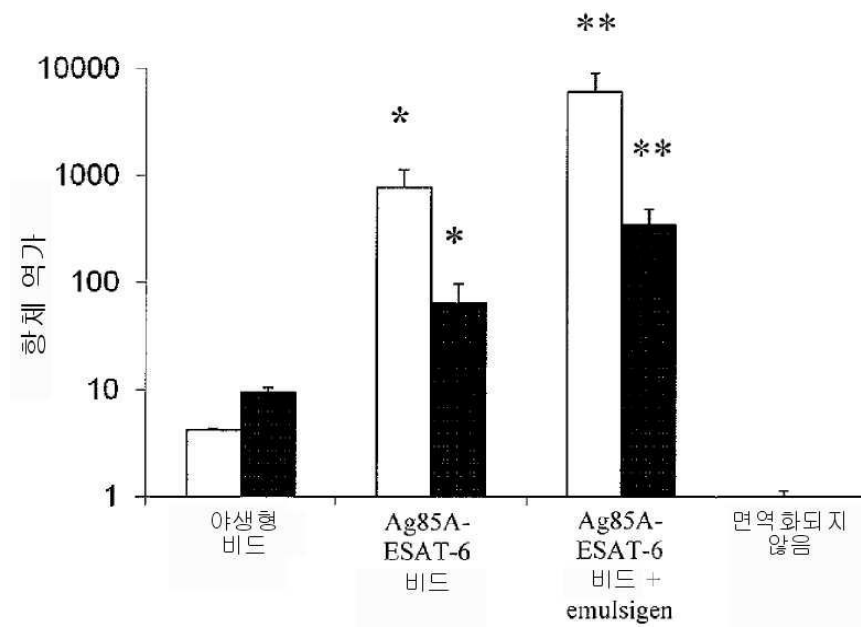
도면4



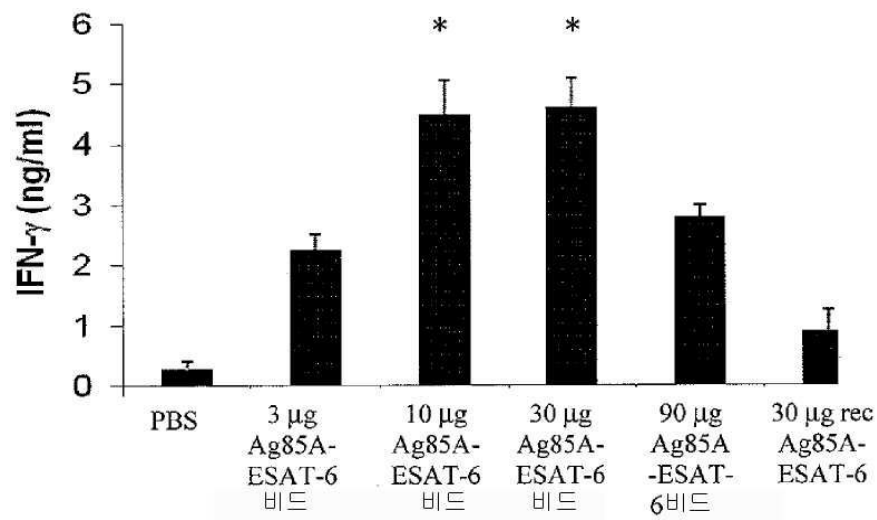
도면5



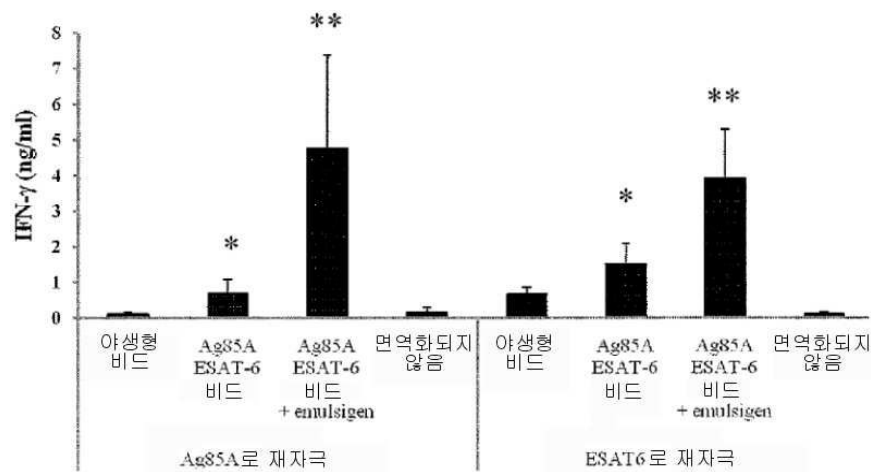
도면6



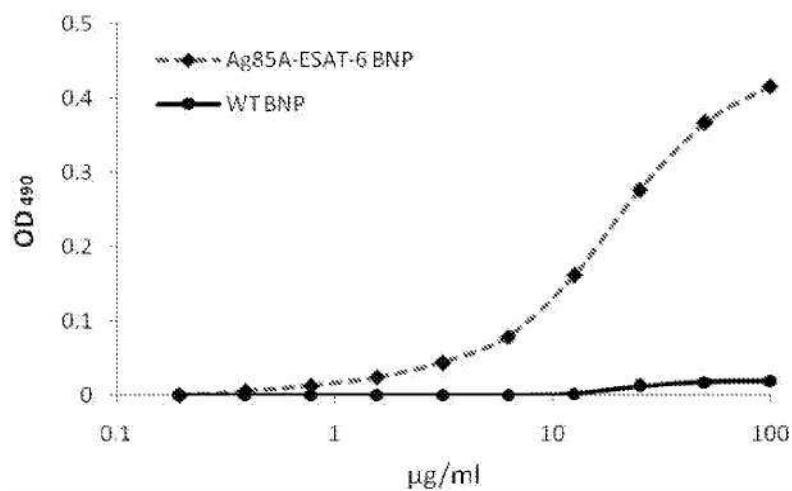
도면7



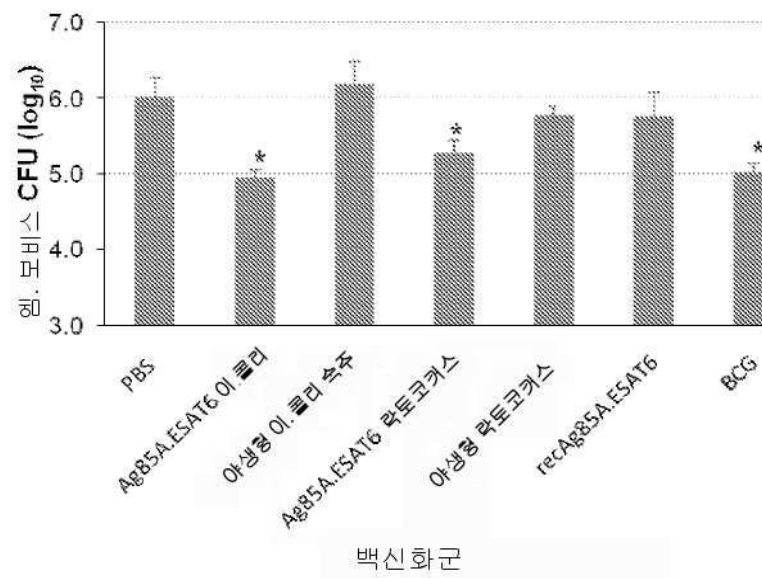
도면8



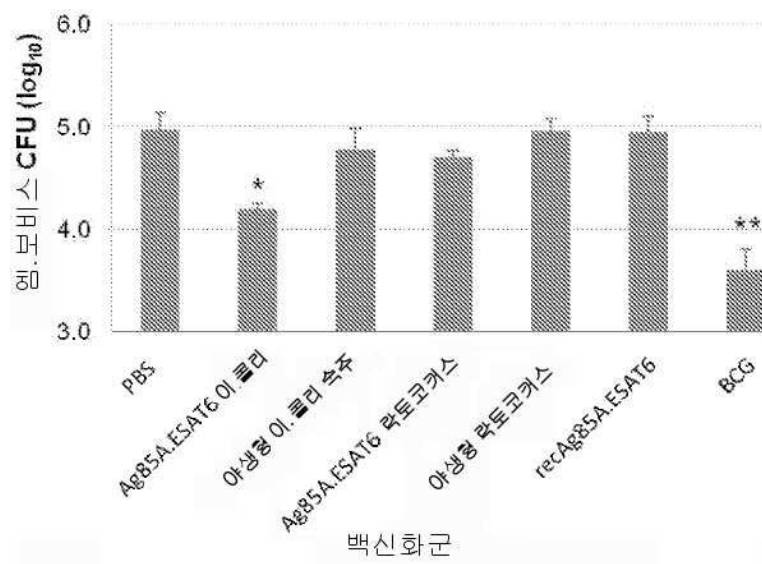
도면9



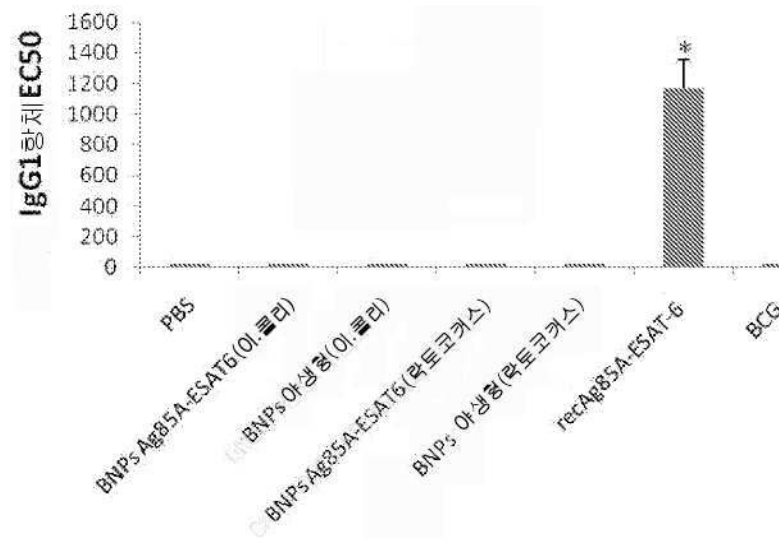
도면10



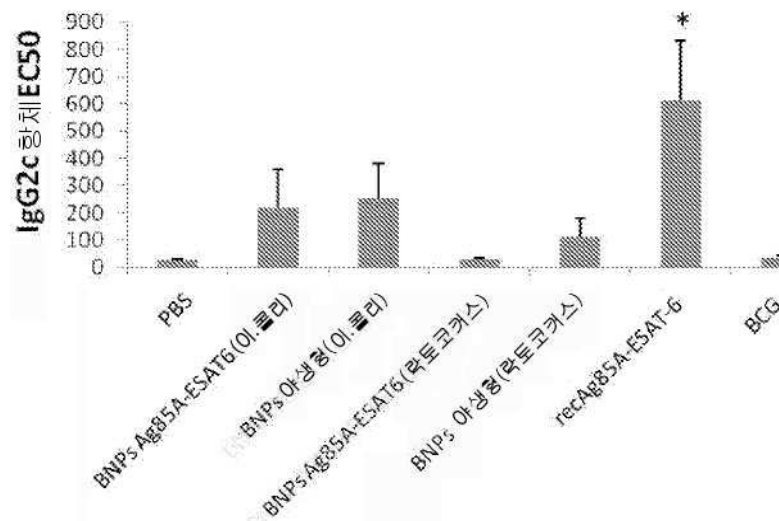
도면11



도면12



도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Rehm, Bernd H.A.

Parlane, Natalie A.

Wedlock, David N.

Buddle, Bryce M.

<120> POLYMER PARTICLES AND USES THEREOF

<130> 626249

<150> US 61/229,318

<151> 2009-07-29

<150> US 61/229,348

<151> 2009-07-29

<160> 56

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2949

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic - M.tb antigen-PhaC fusion

<220><221> CDS

<222> (1)..(870)

<223> Ag85A antigen

<220><221> CDS

<222> (871)..(1176)

<223> ESAT6 antigen

<220><221> CDS

<222> (1177)..(1182)

<223> Linker

<220><221> CDS

<222> (1183)..(2946)

<223> PhaC synthase

<400> 1

atg ttt tcc cgg ccg ggc ttg ccg gtg gag tac ctg cag gtg ccg tcg 48

Met Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser

1 5 10 15

ccg tcg atg ggc cgt gac atc aag gtc caa ttc caa agt ggt ggt gcc 96

Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Ala

20 25 30

aac tcg ccc gcc ctg tac ctg ctc gac ggc ctg cgc gcg cag gac gac 144

Asn Ser Pro Ala Leu Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp

35 40 45

ttc agc ggc tgg gac atc aac acc ccg gcg ttc gag tgg tac gac cag 192

Phe Ser Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Asp Gln

50	55	60	
tcg ggc ctg tcg gtg gtc atg ccg gtg ggt ggc cag tca agc ttc tac			240
Ser Gly Leu Ser Val Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr			
65	70	75	80
tcc gac tgg tac cag ccc gcc tgc ggc aag gcc ggt tgc cag act tac			288
Ser Asp Trp Tyr Gln Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr			
	85	90	95
aag tgg gag acc ttc ctg acc agc gag ctg ccg ggg tgg ctg cag gcc			336
Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu Gln Ala			
	100	105	110
aac agg cac gtc aag ccc acc gga agc gcc gtc gtc ggt ctt tcg atg			384
Asn Arg His Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Val Val Gly Leu Ser Met			
	115	120	125
gct gct tct tcg gcg ctg acg ctg gcg atc tat cac ccc cag cag ttc			432
Ala Ala Ser Ser Ala Leu Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe			
	130	135	140
gtc tac gcg gga gcg atg tcg ggc ctg ttg gac ccc tcc cag gcg atg			480
Val Tyr Ala Gly Ala Met Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met			
145	150	155	160
ggt ccc acc ctg atc ggc ctg gcg atg ggt gac gct ggc ggc tac aag			528
Gly Pro Thr Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys			
	165	170	175
gcc tcc gac atg tgg ggc ccg aag gag gac ccg gcg tgg cag cgc aac			576
Ala Ser Asp Met Trp Gly Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Arg Asn			
	180	185	190
gac ccg ctg ttg aac gtc ggg aag ctg atc gcc aac aac acc cgc gtc			624
Asp Pro Leu Leu Asn Val Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val			
	195	200	205
tgg gtg tac tgc ggc aac ggc aag ccg tcg gat ctg ggt ggc aac aac			672

Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn
210 215 220
ctg ccg gcc aag ttc ctc gag ggc ttc gtg cgg acc agc aac atc aag 720
Leu Pro Ala Lys Phe Leu Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys
225 230 235 240
ttc caa gac gcc tac aac gcc ggt ggc ggc cac aac ggc gtg ttc gac 768
Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp
245 250 255
ttc ccg gac agc ggt acg cac agc tgg gag tac tgg ggg gcg cag ctc 816
Phe Pro Asp Ser Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu
260 265 270
aac gct atg aag ccc gac ctg caa cgg gca ctg ggt gcc acg ccc aac 864
Asn Ala Met Lys Pro Asp Leu Gln Arg Ala Leu Gly Ala Thr Pro Asn
275 280 285
acc ggg ccc gcg ccc cag ggc gcc gga tcc aca gag cag cag tgg aat 912
Thr Gly Pro Ala Pro Gln Gly Ala Gly Ser Thr Glu Gln Gln Trp Asn
290 295 300
ttc gcg ggt atc gag gcc gcg gca agc gca atc cag ggt aat gtc acc 960
Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr
305 310 315 320
tcc att cat tcc ctc ctt gac gag ggg aag cag tcc ctg acc aag ctc 1008
Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu
325 330 335
gca gcg gcc tgg ggc ggt agc ggt tcg gag gcg tac cag ggt gtc cag 1056
Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln
340 345 350
caa aaa tgg gac gcc acg gct acc gag ctg aac aac gcg ctg cag aac 1104
Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn
355 360 365
ctg gcg cgg acg atc agc gaa gcc ggt cag gca atg gct tcg acc gaa 1152
Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu

370	375	380	
ggc aac gtc act ggg atg ttc gca act agt gcg acc ggc aaa ggc gcg			1200
Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala Thr Ser Ala Thr Gly Lys Gly Ala			
385	390	395	400
gca gct tcc acg cag gaa ggc aag tcc caa cca ttc aag gtc acg ccg			1248
Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro			
405	410	415	
ggg cca ttc gat cca gcc aca tgg ctg gaa tgg tcc cgc cag tgg cag			1296
Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln			
420	425	430	
ggc act gaa ggc aac ggc cac gcg gcc gcg tcc ggc att ccg ggc ctg			1344
Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu			
435	440	445	
gat gcg ctg gca ggc gtc aag atc gcg ccg gcg cag ctg ggt gat atc			1392
Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile			
450	455	460	
cag cag cgc tac atg aag gac ttc tca gcg ctg tgg cag gcc atg gcc			1440
Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala			
465	470	475	480
gag ggc aag gcc gag gcc acc ggt ccg ctg cac gac cgg cgc ttc gcc			1488
Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro Leu His Asp Arg Arg Phe Ala			
485	490	495	
ggc gac gca tgg cgc acc aac ctc cca tat cgc ttc gct gcc gcg ttc			1536
Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe			
500	505	510	
tac ctg ctc aat gcg cgc gcc ttg acc gag ctg gcc gat gcc gtc gag			1584
Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu			
515	520	525	
gcc gat gcc aag acc cgc cag cgc atc cgc ttc gcg atc tcg caa tgg			1632
Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp			
530	535	540	

gtc gat gcg atg tcg ccc gcc aac ttc ctt gcc acc aat ccc gag gcg	1680
Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala	
545 550 555 560	
cag cgc ctg ctg atc gag tcg ggc ggc gaa tcg ctg cgt gcc ggc gtg	1728
Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val	
565 570 575	
cgc aac atg atg gaa gac ctg aca cgc ggc aag atc tcg cag acc gac	1776
Arg Asn Met Met Glu Asp Leu Thr Arg Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp	
580 585 590	
gag agc gcg ttt gag gtc ggc cgc aat gtc gcg gtg acc gaa ggc gcc	1824
Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr Glu Gly Ala	
595 600 605	
gtg gtc ttc gag aac gag tac ttc cag ctg ttg cag tac aag ccg ctg	1872
Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu	
610 615 620	
acc gac aag gtg cac gcg cgc ccg ctg ctg atg gtg ccg ccg tgc atc	1920
Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro Cys Ile	
625 630 635 640	
aac aag tac tac atc ctg gac ctg cag ccg gag agc tcg ctg gtg cgc	1968
Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg	
645 650 655	
cat gtg gtg gag cag gga cat acg gtg ttt ctg gtg tcg tgg cgc aat	2016
His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn	
660 665 670	
ccg gac gcc agc atg gcc ggc agc acc tgg gac gac tac atc gag cac	2064
Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His	
675 680 685	
gcg gcc atc cgc gcc atc gaa gtc gcg cgc gac atc agc ggc cag gac	2112
Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp	

690	695	700	
aag atc aac gtg ctc ggc ttc tgc gtg ggc ggc acc att gtc tcg acc			2160
Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr			
705	710	715	720
gcg ctg gcg gtg ctg gcc gcg cgc ggc gag cac ccg gcc gcc agc gtc			2208
Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val			
725	730	735	
acg ctg ctg acc acg ctg ctg gac ttt gcc gac acg ggc atc ctc gac			2256
Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp			
740	745	750	
gtc ttt gtc gac gag ggc cat gtg cag ttg cgc gag gcc acg ctg ggc			2304
Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly			
755	760	765	
ggc ggc gcc ggc gcg ccg tgc gcg ctg ctg cgc ggc ctt gag ctg gcc			2352
Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala			
770	775	780	
aat acc ttc tcg ttc ttg cgc ccg aac gac ctg gtg tgg aac tac gtg			2400
Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val			
785	790	795	800
gtc gac aac tac ctg aag ggc aac acg ccg gtg ccg ttc gac ctg ctg			2448
Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu			
805	810	815	
ttc tgg aac ggc gac gcc acc aac ctg ccg ggg ccg tgg tac tgc tgg			2496
Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp			
820	825	830	
tac ctg cgc cac acc tac ctg cag aac gag ctc aag gta ccg ggc aag			2544
Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys			
835	840	845	
ctg acc gtg tgc ggc gtg ccg gtg gac ctg gcc agc atc gac gtg ccg			2592
Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro			
850	855	860	

acc tat atc tac ggc tcg cgc gaa gac cat atc gtg ccg tgg acc gcg 2640

Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His Ile Val Pro Trp Thr Ala

865 870 875 880

gcc tat gcc tcg acc gcg ctg ctg gcg aac aag ctg cgc ttc gtg ctg 2688

Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu

885 890 895

ggt gcg tcg ggc cat atc gcc ggt gtg atc aac ccg ccg gcc aag aac 2736

Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn

900 905 910

aag cgc agc cac tgg act aac gat gcg ctg ccg gag tcg ccg cag caa 2784

Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln

915 920 925

tgg ctg gcc ggc gcc atc gag cat cac ggc agc tgg tgg ccg gac tgg 2832

Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp

930 935 940

acc gca tgg ctg gcc ggg cag gcc ggc gcg aaa cgc gcc gcg ccc gcc 2880

Thr Ala Trp Leu Ala Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala

945 950 955 960

aac tat ggc aat gcg cgc tat cgc gca atc gaa ccc gcg cct ggg cga 2928

Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg

965 970 975

tac gtc aaa gcc aag gca tga 2949

Tyr Val Lys Ala Lys Ala

980

<210> 2

<211> 982

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Met Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser

1	5	10	15
Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Ala			
	20	25	30
Asn Ser Pro Ala Leu Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp			
	35	40	45
Phe Ser Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Asp Gln			
	50	55	60
Ser Gly Leu Ser Val Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr			
65	70	75	80
Ser Asp Trp Tyr Gln Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr			
	85	90	95
Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu Gln Ala			
	100	105	110
Asn Arg His Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Val Val Gly Leu Ser Met			
	115	120	125
Ala Ala Ser Ser Ala Leu Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe			
	130	135	140
Val Tyr Ala Gly Ala Met Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met			
145	150	155	160
Gly Pro Thr Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys			
	165	170	175
Ala Ser Asp Met Trp Gly Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Arg Asn			
	180	185	190
Asp Pro Leu Leu Asn Val Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val			
	195	200	205
Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn			
	210	215	220
Leu Pro Ala Lys Phe Leu Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys			
225	230	235	240
Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp			
	245	250	255

Phe Pro Asp Ser Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu
 260 265 270
 Asn Ala Met Lys Pro Asp Leu Gln Arg Ala Leu Gly Ala Thr Pro Asn
 275 280 285
 Thr Gly Pro Ala Pro Gln Gly Ala Gly Ser Thr Glu Gln Gln Trp Asn
 290 295 300
 Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr
 305 310 315 320

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

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

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

500 505 510
 Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu
 515 520 525
 Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp
 530 535 540
 Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala
 545 550 555 560
 Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val
 565 570 575

 Arg Asn Met Met Glu Asp Leu Thr Arg Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp
 580 585 590
 Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr Glu Gly Ala
 595 600 605
 Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu
 610 615 620
 Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro Cys Ile
 625 630 635 640

 Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg
 645 650 655
 His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn
 660 665 670
 Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His
 675 680 685
 Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp
 690 695 700

 Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr
 705 710 715 720
 Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val
 725 730 735
 Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp
 740 745 750

Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly
755 760 765

Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala
770 775 780

Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val
785 790 795 800

Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu
805 810 815

Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp
820 825 830

Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys
835 840 845

Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro
850 855 860

Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His Ile Val Pro Trp Thr Ala
865 870 875 880

Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu
885 890 895

Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn
900 905 910

Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln
915 920 925

Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp
930 935 940

Thr Ala Trp Leu Ala Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala
945 950 955 960

Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg
965 970 975

Tyr Val Lys Ala Lys Ala
980

<210> 3

<211> 2958
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic
 <220><221> promoter
 <222> (1)..(9)
 <223> 3'OH terminus of nisA promoter
 <220><221> CDS
 <222> (10)..(1185)
 <223> Ag85A-ESAT6 antigen fusion
 <220><221> CDS
 <222> (1186)..(2955)
 <223> PhaC synthase
 <400> 3

tgtacacat atg ttt agt aga cca ggt tta cct gtt gaa tat tta caa gtt 51

Met Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val	
1 5 10	
cct tct cca tct atg ggt aga gat att aaa gtt caa ttt caa tca gga	99
Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly	
15 20 25 30	
ggt gca aat tct cca gct tta tat tta tta gat ggt tta cgt gct caa	147
Gly Ala Asn Ser Pro Ala Leu Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln	
35 40 45	
gat gat ttt tct ggt tgg gat att aat act cca gca ttt gaa tgg tat	195
Asp Asp Phe Ser Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr	
50 55 60	
gat caa tca ggt tta tct gtt gtt atg cca gtt ggt gga caa tca tct	243
Asp Gln Ser Gly Leu Ser Val Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser	
65 70 75	
ttt tat tca gat tgg tat caa cct gct tgt gga aaa gca ggt tgt caa	291
Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Gln Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln	
80 85 90	

aca tat aaa tgg gaa aca ttt tta aca tca gaa tta cca gga tgg tta 339
Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu
95 100 105 110
caa gca aat cgt cat gtt aaa cca act ggt tca gct gtt gtt ggt tta 387
Gln Ala Asn Arg His Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Val Val Gly Leu
115 120 125
tct atg gct gct tca tca gct tta aca tta gct att tat cat cca caa 435
Ser Met Ala Ala Ser Ser Ala Leu Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln
130 135 140
caa ttt gtt tat gca ggt gct atg tca ggt tta tta gat cca tca caa 483
Gln Phe Val Tyr Ala Gly Ala Met Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln
145 150 155
gct atg gga cct act tta att ggt tta gca atg ggt gat gct gga gga 531
Ala Met Gly Pro Thr Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly
160 165 170
tat aaa gct agt gat atg tgg gga cca aaa gaa gat cca gca tgg caa 579
Tyr Lys Ala Ser Asp Met Trp Gly Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln
175 180 185 190
cgt aat gat cca tta tta aat gtt gga aaa tta att gca aat aat act 627
Arg Asn Asp Pro Leu Leu Asn Val Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr
195 200 205
cgt gtt tgg gtt tat tgt gga aat ggt aaa cca tct gat tta gga ggt 675
Arg Val Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly
210 215 220
aat aat tta cca gca aaa ttt tta gaa gga ttt gtt cgt aca tca aat 723
Asn Asn Leu Pro Ala Lys Phe Leu Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn
225 230 235
att aaa ttt caa gat gct tat aat gct ggt gga gga cat aat ggt gtt 771
Ile Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val
240 245 250
ttt gat ttt cca gat tct ggt aca cat tca tgg gaa tat tgg ggt gca 819

Phe Asp Phe Pro Asp Ser Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala

255 260 265 270

caa tta aat gct atg aaa cca gat tta caa cgt gct tta ggt gct act 867

Gln Leu Asn Ala Met Lys Pro Asp Leu Gln Arg Ala Leu Gly Ala Thr

275 280 285

cct aat aca ggt cca gct cct caa ggt gca gga tca aca gaa caa caa 915

Pro Asn Thr Gly Pro Ala Pro Gln Gly Ala Gly Ser Thr Glu Gln Gln

290 295 300

tgg aat ttt gct gga att gaa gct gca gct tct gct att caa ggt aat 963

Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn

305 310 315

gtt aca agt att cat tca tta tta gat gaa gga aaa caa tca tta aca 1011

Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr

320 325 330

aaa tta gct gca gct tgg ggt ggt agt ggt tca gaa gct tat caa ggt 1059

Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly

335 340 345 350

gtt caa caa aaa tgg gat gca act gct act gaa tta aat aat gct tta 1107

Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu

355 360 365

caa aat tta gct cgt act att tca gaa gct ggt caa gct atg gct tca 1155

Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser

370 375 380

act gaa ggt aat gtt aca ggt atg ttt gca act agt gca aca gga aaa 1203

Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala Thr Ser Ala Thr Gly Lys

385 390 395

ggt gcc gca gct tca acg caa gaa gga aaa tca caa cca ttt aaa gtt 1251

Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser Gln Pro Phe Lys Val

400 405 410

acc cca ggc cca ttt gat cca gca aca tgg ttg gaa tgg tca aga caa	1299
Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu Glu Trp Ser Arg Gln	
415 420 425 430	
tgg caa gga act gaa gga aat gga cat gct gct gct agc ggt att cct	1347
Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala Ala Ser Gly Ile Pro	
435 440 445	
ggt tta gat gca ctt gct gga gtc aaa att gct cca gct caa tta ggt	1395
Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala Pro Ala Gln Leu Gly	
450 455 460	
gat att caa caa cga tat atg aaa gat ttt tca gct ttg tgg caa gca	1443
Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser Ala Leu Trp Gln Ala	
465 470 475	
atg gcc gaa gga aaa gct gaa gct aca gga cca ctt cat gat cga cgt	1491
Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro Leu His Asp Arg Arg	
480 485 490	
ttt gca gga gat gcc tgg cgt aca aat ttg cct tac aga ttt gca gct	1539
Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro Tyr Arg Phe Ala Ala	
495 500 505 510	
gct ttt tat tta tta aat gct cgt gct tta aca gaa ttg gca gat gct	1587
Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala	
515 520 525	
gtg gaa gct gat gct aaa act cgt caa cgt att aga ttt gca att agt	1635
Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile Ser	
530 535 540	
caa tgg gtt gat gct atg agt cct gca aat ttc ttg gca acc aat cct	1683
Gln Trp Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro	
545 550 555	
gaa gca caa cga tta ctt atc gaa tca ggc ggt gaa tca ctt cgt gct	1731
Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Ala	
560 565 570	
ggt gtt aga aat atg atg gaa gat tta act cga ggt aaa att agt caa	1779

Gly Val Arg Asn Met Met Glu Asp Leu Thr Arg Gly Lys Ile Ser Gln
575 580 585 590
acc gat gaa tca gca ttt gaa gtg ggt cga aat gta gct gtt acg gaa 1827
Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr Glu
595 600 605
ggt gct gtt gtt ttc gaa aat gaa tat ttt caa ttg tta caa tat aaa 1875
Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr Lys
610 615 620
cct tta aca gat aaa gtt cat gcc cgt cct ttg ctt atg gtt cct cct 1923
Pro Leu Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro
625 630 635
tgt att aat aaa tat tac att ttg gat ctt caa cca gaa agc tca ctt 1971
Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser Leu
640 645 650
gtt cga cat gtt gtc gaa caa ggt cat acc gtc ttt ttg gtt agt tgg 2019
Val Arg His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser Trp
655 660 665 670
cga aat cct gac gct agt atg gca ggt agt acg tgg gat gat tat att 2067
Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile
675 680 685
gaa cac gct gcc att cga gca att gaa gtt gca cga gat att tct ggt 2115
Glu His Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly
690 695 700
caa gac aaa att aat gta ctt ggc ttt tgt gtt ggt ggt aca att gtt 2163
Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val
705 710 715
tct acg gca tta gct gtc ctt gct gct cga gga gaa cat cct gcc gct 2211
Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala
720 725 730
tct gtc aca ttg ttg aca aca tta tta gat ttt gct gat act ggc att 2259
Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile

735	740	745	750	
ctt gat gtg ttt gtc gat gaa ggt cac gta caa tta aga gaa gca acc				2307
Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr				
755	760	765		
tta ggt gga gga gct ggc gct cca tgt gct ttg tta aga ggt ttg gaa				2355
Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu				
770	775	780		
ctt gct aat aca ttt agc ttt ctt cga cca aat gat ttg gtc tgg aac				2403
Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn				
785	790	795		
tac gtg gtt gac aat tat tta aaa ggt aat acg cca gtt cct ttc gat				2451
Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp				
800	805	810		
tta ttg ttc tgg aac ggt gat gca act aat tta cca gga cct tgg tac				2499
Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp Tyr				
815	820	825	830	
tgt tgg tat tta aga cac aca tat tta caa aat gaa ctt aaa gtc cca				2547
Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys Val Pro				
835	840	845		
gga aaa tta aca gtc tgt ggt gtt cct gta gat tta gca tca atc gac				2595
Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp Leu Ala Ser Ile Asp				
850	855	860		
gta cct act tat att tat ggt agt cgt gaa gat cat att gtg cct tgg				2643
Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His Ile Val Pro Trp				
865	870	875		
aca gca gca tat gct tca aca gca ctt ttg gcc aat aaa tta cgt ttc				2691
Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala Asn Lys Leu Arg Phe				
880	885	890		
gtt ctt gga gct agt gga cac att gct gga gtt att aat cct cca gct				2739

Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala
895 900 905 910
aaa aat aaa cgt tct cat tgg aca aat gat gct ttg cca gaa agt cct 2787
Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro
915 920 925
caa caa tgg tta gcc gga gca atc gaa cat cat ggt tca tgg tgg cca 2835
Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro
930 935 940
gat tgg act gca tgg ttg gct ggt caa gcc ggt gca aaa cgt gca gca 2883
Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala
945 950 955
cca gcc aat tat ggc aat gct cga tat aga gct att gaa cct gca cca 2931
Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro
960 965 970
ggc cgt tat gtc aaa gca aaa gca tga 2958
Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala
975 980
<210> 4
<211> 982
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Synthetic Construct
<400> 4
Met Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser
1 5 10 15
Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Ala
20 25 30
Asn Ser Pro Ala Leu Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp
35 40 45
Phe Ser Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Asp Gln
50 55 60
Ser Gly Leu Ser Val Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr

65 70 75 80
 Ser Asp Trp Tyr Gln Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr

 85 90 95
 Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu Gln Ala
 100 105 110
 Asn Arg His Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Val Val Gly Leu Ser Met
 115 120 125
 Ala Ala Ser Ser Ala Leu Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe
 130 135 140
 Val Tyr Ala Gly Ala Met Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met

 145 150 155 160
 Gly Pro Thr Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys
 165 170 175
 Ala Ser Asp Met Trp Gly Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Arg Asn
 180 185 190
 Asp Pro Leu Leu Asn Val Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val
 195 200 205
 Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn

 210 215 220
 Leu Pro Ala Lys Phe Leu Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys
 225 230 235 240
 Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp
 245 250 255
 Phe Pro Asp Ser Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu
 260 265 270
 Asn Ala Met Lys Pro Asp Leu Gln Arg Ala Leu Gly Ala Thr Pro Asn

 275 280 285
 Thr Gly Pro Ala Pro Gln Gly Ala Gly Ser Thr Glu Gln Gln Trp Asn
 290 295 300
 Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr
 305 310 315 320

Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu
325 330 335

Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln
340 345 350

Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn
355 360 365

Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu
370 375 380

Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala Thr Ser Ala Thr Gly Lys Gly Ala
385 390 395 400

Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro
405 410 415

Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln
420 425 430

Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu
435 440 445

Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile
450 455 460

Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala
465 470 475 480

Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro Leu His Asp Arg Arg Phe Ala
485 490 495

Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe
500 505 510

Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu
515 520 525

Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp
530 535 540

Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala
545 550 555 560

Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val

565 570 575
 Arg Asn Met Met Glu Asp Leu Thr Arg Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp
 580 585 590
 Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr Glu Gly Ala

 595 600 605
 Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu
 610 615 620
 Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro Cys Ile
 625 630 635 640
 Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg
 645 650 655
 His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn

 660 665 670
 Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His
 675 680 685
 Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp
 690 695 700
 Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr
 705 710 715 720
 Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val

 725 730 735
 Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp
 740 745 750
 Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly
 755 760 765
 Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala
 770 775 780
 Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val

 785 790 795 800
 Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu
 805 810 815

Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp
820 825 830
Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys
835 840 845
Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro
850 855 860
Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His Ile Val Pro Trp Thr Ala
865 870 875 880
Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu
885 890 895
Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn
900 905 910
Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln
915 920 925
Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp
930 935 940
Thr Ala Trp Leu Ala Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala
945 950 955 960
Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg
965 970 975
Tyr Val Lys Ala Lys Ala
980

<210> 5

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer-synthesised in laboratory

<400> 5

gctactagta ataaggagat atacatatgt tttcccgcc ggccttgc

48

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer-synthesised in laboratory

<400> 6

tgcactagtt gcgaacatcc cagtgcagtt 30

<210> 7

<211> 2361

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct from pET-14b-HepC-PhaC

<400> 7

atgtctacta atcctaaacc tcagcgtaaa accaagcgta gcaccaaccg tcgtccgcag 60

gacgttaagt ttccgggtgg tggccagatt gtgggtggcg tctacctgct gccgcgtcgt 120

ggtccgcgtt tgggtgttcg cgcgaccgcg aaaacgagcg aacgctcca accgcgtggc 180

cgctgtcaac cgatcccaaa agcgcgccaa ccggaaggtc gcgcatgggc ccagccaggc 240

tacccatggc cgctgtatgg caacgagggt atgggctggg ctggttggct gttgagcccg 300

cgtaggtagc gtccgagctg ggggtccgacc gacccgcgtc gccgtctctg taatctgggt 360

aagggtattg ataccttgac gtgcggtttc gcggatctga tgggttacat cccgctgggtg 420

ggcgcaccgc tgggcggtgc agcccgtgca ctggcgcacg gcgtccgcgt tctggaggac 480

ggtgtcaact atgcgacggg caatctgccg ggtttagct tttcgatctt cctgctggcc 540

ctgctgagct gcctgacct tccggcgagc gcacgtacgg gtggcggtgg cgggtcgacc 600

ggcaaaggcg cggcagcttc cagcgaggaa ggcaagtccc aaccattcaa ggtcacgccg 660

gggccattcg atccagccac atggctggaa tgggtccgcc agtggcaggg cactgaaggc 720

aacggccacg cggccgcgtc cggcattccg ggcttgatg cgctggcagg cgtcaagatc 780

gcgccggcgc agctgggtga tatccagcag cgctacatga aggacttctc agcgtgtgg 840

caggccatgg ccgagggcaa ggccgaggcc accggtccgc tgcacgaccg gcgcttcgcc 900

ggcgacgcat ggcgaccaa cctcccatat cgcttcgctg ccggtttcta cctgctcaat 960

gcgcgcgcct tgaccgagct ggccgatgcc gtcgaggccg atgccaagac ccgccagcgc 1020

atccgcttcg cgatctcgca atgggtcgat gcgatgtcgc ccgccaactt ccttgccacc 1080

aatcccaggc cgcagcgctt gctgatcgag tcgggcggcg aatcgctgcg tgccggcgtg 1140

cgcaaatga tggaagacct gacacgcggc aagatctcgc agaccgacga gagcgcgttt 1200

gaggtcggcc gcaatgtcgc ggtgaccgaa ggcgccgtgg tcttcgagaa cgagtacttc 1260

cagctgttgc agtacaagcc gctgaccgac aaggtgcacg cgcgcccgt gctgatggtg 1320

ccgccgtgca tcaacaagta ctacatcctg gacctgcagc cggagagctc gctggtgcgc 1380

catgtggtgg agcagggaca tacggtgttt ctggtgtcgt ggcgcaatcc ggacgccagc 1440

atggccggca gcacctggga cgactacatc gagcacgcgg ccatccgcgc catcgaagtc 1500

gcgcgcgaca tcagcgccca ggacaagatc aacgtgctcg gcttctgcgt gggcggcacc 1560

attgtctcga ccgcgtggc ggtgtgtggc gcgcgcggcg agcacccggc cgccagcgtc 1620

acgtgctga ccacgtgct ggactttgcc gacacgggca tcctcgacgt ctttgcgcac 1680

gagggccatg tgcagttcg cgagggccacg ctggcgggcg gcgccggcg gccgtgcgcg 1740

ctgtgcgcg gccttgagct ggccaatacc ttctcgttct tgcgcccga cgacctggtg 1800

tggaactacg tggtcgacaa ctacctgaag ggcaacacgc cggtgccgtt cgacctgctg 1860

ttctggaacg gcgacgccac caacctgccg gggccgtggt actgttgta cctgcgccac 1920

acctactgc agaacgagct caaggtaccg ggcaagctga ccgtgtgcgg cgtgccggtg 1980

gacctggcca gcatcgacgt gccgacctat atctacggct cgcgcaaga ccatatcgtg 2040

ccgtggaccg cggcctatgc ctgaccgcg ctgctggcga acaagctgcg ctctgtgctg 2100

ggtgcgtcgg gccatatcgc cgggtgtgatc aaccgcggg ccaagaacaa gcgcagccac 2160

tggactaacg atgcgtgcc ggagtcgcc cagcaatggc tggccggcg catcgagcat 2220

cacggcagct ggtggccgga ctggaccgca tgctggccg ggcaggccgg cgcgaaacgc 2280

gccgcgccc ccaactatgg caatgcgcgc tatcgcgcaa tcgaaccgc gcctgggcga 2340

tacgtcaaag ccaaggcatg a 2361

<210> 8

<211> 786

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hep C-PhaC fusion polypeptide encoded by pET-14b-HepC-PhaC

<400> 8

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Ser Thr Asn

1	5	10	15
Arg	Arg	Pro	Gln
Asp	Val	Lys	Phe
Pro	Gly	Gly	Gly
Gln	Ile	Val	Gly
20	25	30	
Gly	Val	Tyr	Leu
Leu	Pro	Arg	Arg
Gly	Pro	Arg	Leu
Gly	Val	Arg	Ala
35	40	45	

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
 50 55 60
 Ile Pro Lys Ala Arg Gln Pro Glu Gly Arg Ala Trp Ala Gln Pro Gly

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

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

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

 260 265 270
 Met Lys Asp Phe Ser Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala
 275 280 285
 Glu Ala Thr Gly Pro Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp

290 295 300
 Arg Thr Asn Leu Pro Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn
 305 310 315 320
 Ala Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys

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

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

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

 515 520 525
 Leu Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr
 530 535 540

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

 580 585 590
 Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr
 595 600 605
 Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly
 610 615 620
 Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His
 625 630 635 640
 Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys

 645 650 655
 Gly Val Pro Val Asp Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr
 660 665 670
 Gly Ser Arg Glu Asp His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser
 675 680 685
 Thr Ala Leu Leu Ala Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly
 690 695 700
 His Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His

 705 710 715 720
 Trp Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly
 725 730 735
 Ala Ile Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu
 740 745 750
 Ala Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn
 755 760 765
 Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala

 770 775 780
 Lys Ala

785

<210> 9

<211> 2361

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct pNZ-HepC-PhaCAB

<400> 9

atggcaagta caaatccaaa acctcaaaga aaaacaaaac gttcaactaa tcgtagacca	60
caagatgtta aatttcctgg tggagggtcaa attgttggag gtgtttatctt acttcacgt	120
agaggaccta gattaggtgt tagagctaca cgtaaaacat cagaaagatc acaaccacgt	180
ggtcgtagac aaccaattcc taaagcaaga caaccagaag gtcgtgcttg ggcacaacct	240
ggatacctt ggccctttata tggtaatgaa ggaatgggtt gggctggatg gttactttct	300
ccaagaggat ctctcctag ttgggtcca actgacctc gtagacgttc acgtaatctt	360
ggtaaagtta ttgatacact tactttgtga ttgtctgac ttatgggtta tattccatta	420
gttggagcac ctcttggagg tgctgcaaga gctcttgac atggagtctg tgttttagaa	480
gatggtgtta attatgctac aggaatctt ccaggttgtt catcttctat tttctttta	540
gctttacttt catgtttaac tattcttctt tctgcaacta gtggagggtg aggtggagca	600
acaggaaaag gtgccgcagc ttcaacgcaa gaaggaaaat cacaaccatt taaagttacc	660
ccaggcccat ttgatccagc aacatggttg gaatggtcaa gacaatggca aggaactgaa	720
ggaaatggac atgctgtgc tagcgggtatt cctggtttag atgcacttg tggagtcaaa	780
attgtccag ctcaattagg tgatattcaa caacgatata tgaaagattt ttcagctttg	840
tggcaagcaa tggccgaagg aaaagctgaa gctacaggac cacttcatga tcgacgtttt	900
gcaggagatg cctggcgtac aaatttgcct tacagatttg cagctgcttt ttatttatta	960
aatgctcgtg cttaacaga attggcagat gctgtggaag ctgatgctaa aactcgtcaa	1020
cgtattagat ttgcaattag tcaatgggtt gatgctatga gtctgcaaa tttcttggca	1080
accaatcctg aagcacaacg attacttatt gaatcaggcg gtgaatcact tcgtgctggt	1140
gttagaaata tgatggaaga tttaactcga ggtaaaatta gtcaaaccga tgaatcagca	1200
tttgaagtgg gtcgaaatgt agctgttacg gaaggtgctg ttgttttcga aaatgaatat	1260
tttcaattgt tacaataaa acctttaaca gataaagttc atgcccgctc ttgtcttatg	1320
gttctctctt gtattaataa atattacatt ttggatcttc aaccagaaag ctcaattgtt	1380
cgacatgttg tcgaacaagg tcataccgtc tttttgtta gttggcgaaa tcctgacgct	1440

agtatggcag gtagtacgtg ggatgattat attgaacacg ctgccattcg agcaattgaa 1500

 gttgcacgag atatttctgg tcaagacaaa attaatgtac ttggcttttg tgttggtggt 1560
 acaattgttt ctacggcatt agctgtcctt gctgctcgag gagaacatcc tgccgcttct 1620
 gtcacattgt tgacaacatt attagatttt gctgatactg gcattcttga tgtgtttgtc 1680
 gatgaaggtc acgtacaatt aagagaagca accttaggtg gaggagctgg cgctccatgt 1740
 gctttgttaa gaggtttgga acttgctaata acatttagct ttcttcgacc aaatgatttg 1800
 gtctggaact acgtggttga caattattta aaagtaata cgccagttcc ttctgattta 1860
 ttgttctgga acggtgatgc aactaattta ccaggacctt ggtactgttg gtatttaaga 1920

 cacacatatt tacaaaatga acttaaagtc ccaggaaaat taacagtctg tgggtgtcct 1980
 gtagatttag catcaatcga cgtacctact tatatttatg gtagtcgtga agatcatatt 2040
 gtgccttgga cagcagcata tgcttcaaca gcacttttgg ccaataaatt acgtttcgtt 2100
 cttggagcta gtggacacat tgctggagtt attaatcctc cagctaaaaa taaacgttct 2160
 cattggacaa atgatgcttt gccagaaagt cctcaacaat ggtagccgg agcaatcgaa 2220
 catcatgggt catggtggcc agattggact gcatggttgg ctggtcaagc cggtgcaaaa 2280
 cgtgcagcac cagccaatta tggcaatgct cgatatagag ctattgaacc tgcaccaggc 2340

 cgttatgtca aagcaaaagc a 2361

 <210> 10
 <211> 787
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> HepC-PhaC fusion polypeptide encoded by pNZ-HepC-PhaCAB
 <400> 10
 Met Ala Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Ser Thr
 1 5 10 15
 Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val
 20 25 30
 Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg
 35 40 45
 Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln
 50 55 60
 Pro Ile Pro Lys Ala Arg Gln Pro Glu Gly Arg Ala Trp Ala Gln Pro

65				70				75				80			
Gly	Tyr	Pro	Trp	Pro	Leu	Tyr	Gly	Asn	Glu	Gly	Met	Gly	Trp	Ala	Gly
				85				90				95			
Trp	Leu	Leu	Ser	Pro	Arg	Gly	Ser	Arg	Pro	Ser	Trp	Gly	Pro	Thr	Asp
				100				105				110			
Pro	Arg	Arg	Arg	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Ile	Asp	Thr	Leu	Thr
				115				120				125			
Cys	Gly	Phe	Ala	Asp	Leu	Met	Gly	Tyr	Ile	Pro	Leu	Val	Gly	Ala	Pro
130				135				140							
Leu	Gly	Gly	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	His	Gly	Val	Arg	Val	Leu	Glu
145				150				155				160			
Asp	Gly	Val	Asn	Tyr	Ala	Thr	Gly	Asn	Leu	Pro	Gly	Cys	Ser	Phe	Ser
				165				170				175			
Ile	Phe	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu	Thr	Ile	Pro	Ala	Ser	Ala
				180				185				190			
Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Gly	Lys	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser
195				200				205							
Thr	Gln	Glu	Gly	Lys	Ser	Gln	Pro	Phe	Lys	Val	Thr	Pro	Gly	Pro	Phe
210				215				220							
Asp	Pro	Ala	Thr	Trp	Leu	Glu	Trp	Ser	Arg	Gln	Trp	Gln	Gly	Thr	Glu
225				230				235				240			
Gly	Asn	Gly	His	Ala	Ala	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Gly	Leu	Asp	Ala	Leu
				245				250				255			
Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Gly	Asp	Ile	Gln	Gln	Arg
				260				265				270			
Tyr	Met	Lys	Asp	Phe	Ser	Ala	Leu	Trp	Gln	Ala	Met	Ala	Glu	Gly	Lys
275				280				285							
Ala	Glu	Ala	Thr	Gly	Pro	Leu	His	Asp	Arg	Arg	Phe	Ala	Gly	Asp	Ala
290				295				300							
Trp	Arg	Thr	Asn	Leu	Pro	Tyr	Arg	Phe	Ala	Ala	Ala	Phe	Tyr	Leu	Leu
305				310				315				320			

Asn Ala Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala
 325 330 335
 Lys Thr Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala
 340 345 350
 Met Ser Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu
 355 360 365
 Leu Ile Glu Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val Arg Asn Met
 370 375 380
 Met Glu Asp Leu Thr Arg Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala
 385 390 395 400
 Phe Glu Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe
 405 410 415
 Glu Asn Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys
 420 425 430
 Val His Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr
 435 440 445
 Tyr Ile Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val
 450 455 460
 Glu Gln Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala
 465 470 475 480
 Ser Met Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile
 485 490 495
 Arg Ala Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn
 500 505 510
 Val Leu Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala
 515 520 525
 Val Leu Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu
 530 535 540
 Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val
 545 550 555 560
 Asp Glu Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala

565 570 575
 Gly Ala Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Thr Phe
 580 585 590
 Ser Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn
 595 600 605
 Tyr Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn

610 615 620
 Gly Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg
 625 630 635 640
 His Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val
 645 650 655
 Cys Gly Val Pro Val Asp Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile
 660 665 670
 Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala

675 680 685
 Ser Thr Ala Leu Leu Ala Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser
 690 695 700
 Gly His Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser
 705 710 715 720
 His Trp Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala
 725 730 735
 Gly Ala Ile Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp

740 745 750
 Leu Ala Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly
 755 760 765
 Asn Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys
 770 775 780
 Ala Lys Ala

785

<210> 11

<211> 2775

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct - pET-14b-PhaC-HA1 of H3-PhaC

<400> 11

atgcagaaac tgccgggtaa cgataatagt accgcaacgc tgtgcctggg tcatcacgca	60
gtgccgaacg gtaccattgt taaaaccatc acgaacgac agattgaagt gaccaatgcg	120
acggaactgg ttcagagctc tagtaccggt gaaatctgcg atagcccgca tcagattctg	180
gatggcgaaa attgtacgct gatcgatgcc ctgctgggcg atccgcagtg cgatggtttt	240
cagaacaaaa aatgggatct gtctgtggaa cgctctaaag catacagtaa ctgttacccg	300
tatgatgtgc cggattacgc cagcctgcgt tctctggttg caagctctgg caccctggaa	360
tttaacaatg aaagcttcaa ctggaccggc gttacgcaga atggtacgag tagcgcgctgc	420
attcgtcgca gtaacaatag ctttttctct cgtctgaact ggctgacca cctgaaattt	480
aaatatccgg ccctgaatgt gacgatgccg aacaacgaaa aattcgataa actgtacatc	540
tggggcggtt atcaccgggg taccgataac gatcagattt ttccgtatgc ccaggcaagc	600
ggtcgcata ccgtgagcac gaaacgttct cagcagaccg ttattccgaa catcggtctt	660
cgtccgcgcg tgcgtaatat tccgagtcgc attagcatct actggaccat cgtaaaccg	720
ggcgatatc tgcgatcaa cagcacgggc aatctgattg caccgcgcgg ttattttaaa	780
atccgttctg gaaatctag tattatgcgt agtgcgcgc cgatcggtaa atgcaatagc	840
gaatgtatca ccccgaaagg ctctattccg aatgataaac cgttccagaa cgtgaatcgc	900
attacgtatg gtgcctgccc gcgttacgtt aaacagaaca ccctgaaact ggcaacgggc	960
atgcgcaatg tgccggaaaa acagaccggt acgggtggcg gtggcgggtgc gaccggcaaa	1020
ggcgcgccag cttccacgca ggaaggcaag tcccaacct tcaaggtcac gccggggcca	1080
ttcgatccag ccacatggct ggaatggtcc cgccagtggc agggcactga aggcaacggc	1140
cacgcggcgg cgtccggcat tccgggcctg gatgcgctgg caggcgtcaa gatcgcgccg	1200
gcgcagctgg gtgatatcca gcagcgctac atgaaggact tctcagcgt gtggcaggcc	1260
atggccgagg gcaaggccga ggccaccggt ccgctgcacg accggcgctt cgccggcgac	1320
gcatggcgca ccaacctccc atatcgcttc gctgccgctg tctacctgct caatgcgcgc	1380
gccttgaccg agctggccga tgccgtcgag gccgatgcca agaccgcca gcgcattccg	1440
ttcgcgatct cgcaatgggt cgatcgcatg tcgcccgcga acttccttgc caccaatccc	1500
gaggcgacgc gctgctgat cgagtcgggc ggcaatcgc tgcgtgccgg cgtgcgcaac	1560
atgatggaag acctgacacg cggcaagatc tcgcagaccg acgagagcgc gtttgaggtc	1620
ggccgcaatg tcgcggtgac cgaaggcgcc gtggtcttcg agaacagta cttccagctg	1680

ttgcagtaca agccgctgac cgacaagggtg cacgcgcgcc cgctgctgat ggtgccgccg 1740

tgcataca agtactacat cctggacctg cagccggaga gtcgctggt gcgcatgtg 1800

gtggagcagg gacatacggg gtttctgggt tcgtggcgca atccggacgc cagcatggcc 1860

ggcagcacct gggacgacta catcgagcac gcggccatcc gcgcatcga agtcgcgcgc 1920

gacatcagcg gccaggacaa gatcaacgtg ctgggttct gcgtgggcgg caccattgtc 1980

tcgaccgcgc tggcgggtgt ggccgcgcgc ggcgagcacc cggccgccag cgtcacgtg 2040

ctgaccacgc tgctggactt tgccgacacg ggcatcctcg acgtctttgt cgacaggggc 2100

catgtgcagt tgcgcgaggc cacgtgggc ggccggccgc gcgcgccgtg cgcgctgtg 2160

cgcgcccttg agctggccaa taccttctcg ttcttgccgc cgaacgacct ggtgtggaac 2220

tacgtggtcg acaactacct gaagggaac acgccgtgc cgttcgacct gctgttctgg 2280

aacggcgacg ccaccaacct gccggggccg tggtactgt ggtacctgcg ccacacctac 2340

ctgcagaacg agctcaagg accgggcaag ctgacctgt gcggcgtgcc ggtggacctg 2400

gccagcatcg acgtgccgac ctatatctac ggctcgcgcg aagaccatat cgtgccgtgg 2460

accggggcct atgcctcgac gcgctgtgt gcgaacaagc tgcgttctgt gctgggtgcg 2520

tcggggcata tcgccgtgt gatcaaccg ccggccaaga acaagcgag cactggact 2580

aacgatgcgc tgccggagtc gccgcagcaa tggtggccg gcgcatcga gcatcacggc 2640

agctgggtggc cggactggac cgcatggctg gccgggcagg ccggcgcgaa acgcgcgcgc 2700

cccggcaact atggcaatgc gcgctatgc gcaatgaac ccgcgcctgg gcgatacgtc 2760

aaagccaagg catga 2775

<210> 12

<211> 924

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HA1 of H3-PhaC fusion polypeptide encoded by pET-14b-HA1 of
H3-PhaC

<220><221> Protein

<222> (1)..(924)

<223> HA1 of H3-PhaC

<400> 12

Met Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu

1

5

10

15

Gly His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Ile Val Lys Thr Ile Thr Asn
 20 25 30
 Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser
 35 40 45
 Thr Gly Glu Ile Cys Asp Ser Pro His Gln Ile Leu Asp Gly Glu Asn
 50 55 60

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

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

 Ile Phe Pro Tyr Ala Gln Ala Ser Gly Arg Ile Thr Val Ser Thr Lys
 195 200 205
 Arg Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Arg Val
 210 215 220
 Arg Asn Ile Pro Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro
 225 230 235 240
 Gly Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg
 245 250 255

 Gly Tyr Phe Lys Ile Arg Ser Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg Ser Asp

260 265 270
 Ala Pro Ile Gly Lys Cys Asn Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser
 275 280 285
 Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile Thr Tyr Gly
 290 295 300
 Ala Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly
 305 310 315 320

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

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

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

Ser Leu Arg Ala Gly Val Arg Asn Met Met Glu Asp Leu Thr Arg Gly
 515 520 525
 Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn Val
 530 535 540
 Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln Leu
 545 550 555 560
 Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu Leu
 565 570 575

 Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln Pro
 580 585 590
 Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val Phe
 595 600 605
 Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr Trp
 610 615 620
 Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala Arg
 625 630 635 640

 Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val Gly
 645 650 655
 Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly Glu
 660 665 670
 His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ala
 675 680 685
 Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln Leu
 690 695 700

 Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu Leu
 705 710 715 720
 Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn Asp
 725 730 735
 Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr Pro
 740 745 750
 Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu Pro

755 760 765
 Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn Glu
 770 775 780
 Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp Leu
 785 790 795 800
 Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His
 805 810 815
 Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala Asn
 820 825 830

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

 Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala Ile
 900 905 910
 Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala
 915 920
 <210> 13
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer - synthesised in the laboratory
 <400> 13
 agatactagt atgcagaaac tgccgggtaa cgataatagt acc
 <210> 14
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial

43

<220><223> Primer - synthesised in the laboratory

<400> 14

gatgcgtacg ggtctgtttt tccggcacat tgcgcatgcc 40

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer - synthesised in the laboratory

<400> 15

agatctcgag cagaaactgc cgggtaacga taatagtacc 40

<210> 16

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer - synthesised in the laboratory

<400> 16

gatgggatcc tcaggtctgt ttttccggca cattgcgcat gcc 43

<210> 17

<211> 3195

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct - pET-14b-NA-PhaC

<400> 17

atgaatccaa atcaaaagat aataacgatt ggctctgttt ctctcaccat ttccacaata 60

tgcttcttca tgcaaatgc catcttgata actactgtaa cattgcattt caagcaatat 120

gaattcaact ccccccaaa caaccaagtg atgctgtgtg aaccaacaat aatagaaaga 180

aacataacag agatagtgtg tctgaccaac accaccatag agaaggaaat atgccccaaa 240

ctagcagaat acagaaattg gtcaaagccg caatgtgaca ttacaggatt tgcacctttt 300

tctaaggaca attcgattag gctttccgct ggtggggaca tctgggtgac aagagaacct 360

tatgtgtcat gcgatcctga caagtgttat caatttgccc ttggacaggg aacaacacta 420

aacaacgtgc attcaaatga cacagtacgt gataggaccc cttatcggac cctattgatg 480

aatgagttag gtgttccttt tcatctgggg accaagcaag tgtgcatagc atggtccagc 540

tcaagttgtc acgatggaaa agcatggctg catgtttgta taacggggga tgataaaaat	600
gcaactgcta gcttcattta caatgggagg cttgtagata gtattgtttc atggtccaaa	660
gaaatcctca ggaccagga gtcagaatgc gtttgtatca atggaacttg tacagtagta	720
atgactgatg ggagtgttc aggaaaagct gatactaaaa tactattcat tgaggagggg	780
aaaatcgttc atactagcac attgtcagga agtgtcagc atgtcgagga gtgtcctgc	840
tatcctcgat atcctgggtg cagatgtgtc tgcagagaca actggaaagg ctccaatagg	900
cccatcgtag atataaacat aaaggatcat agcactgttt ccagttatgt gtgttcagga	960
cttgttggag acacaccag aaaaaacgac agctccagca gtagccattg tttagatcct	1020
aacaatgaag aaggtggta tggagtgaag ggctgggcct ttgatgatgg aaatgacgtg	1080
tggatgggaa gaacgatcag cgagaagtcg cgcttagggg atgaaacctt caaagtcatt	1140
gaaggtcgtt ccaaccctaa gtccaaattg cagataaata ggcaagtcac agttgacaga	1200
ggtaaataggt ccggttattc tggatatttc tctgttgaag gcaaaagctg catcaatcgg	1260
tgttttatg tggagttagt aagggaaga aaagaggaaa ctgaagtctt gtggacctca	1320
aacagtattg ttgtgtttg tggcacctca ggtacatatg gaacaggctc atggcctgat	1380
ggggcggaca tcaatctcat gcctatacgt acgggtggcg gtggcgggtc gaccggcaaa	1440
ggcgcggcag cttccacgca ggaaggcaag tcccaacctt tcaaggtcac gccggggcca	1500
ttcgatccag ccacatggct ggaatgggtc cgccagtggc agggcactga aggcaacggc	1560
cacgcggccg cgtccggcat tccgggcctg gatgcgctgg caggcgtcaa gatcgcgccg	1620
gcgcagctgg gtgatatcca gcagcgctac atgaaggact tctcagcgt gtggcaggcc	1680
atggccgagg gcaaggcca gggcaccggt ccgctgcacg accggcgctt cgccggcgac	1740
gcatggcgca ccaacctccc atatcgcttc gctgccgct tctacctgt caatgcgcgc	1800
gccttgaccg agctggcga tggcgtcag gccgatgcca agaccgcca gcgcacccg	1860
ttcgcgatct cgcaatgggt cgatgcgatg tgcgccgcca acttccttgc caccaatccc	1920
gaggcgagc gcctgctgat cgagtcgggc ggcaaatcgc tgcgtgccg cgtgcgcaac	1980
atgatggaag acctgacacg cggcaagatc tcgcagaccg acgagagcgc gtttagagtc	2040
ggccgcaatg tcgcggtgac cgaaggcgcc gtggtcttcg agaacagta cttccagctg	2100
ttgcagtaca agccgtgac gcacaagggt cacgcgcgcc cgctgctgat ggtgccgccc	2160
tgcataaca agtactacat cctggacctg cagccggaga gctcgctggt gcgcatgtg	2220
gtggagcagg gacatacgtt gtttctggtg tctggcgca atccggacgc cagcatggcc	2280
ggcagcacct gggacgacta catcgagcac gcggccatcc gcgccatcga agtcgcgcgc	2340
gacatcagcg gccaggacaa gatcaacgtg ctgggtctct gcgtggcgcc caccattgtc	2400

tcgaccgcgc tggcgggtgct ggccgcgcgc ggcgagcacc cggccgccag cgtcacgctg 2460

ctgaccacgc tgcctggactt tgccgacacg ggcatcctcg acgtctttgt cgacgagggc 2520

catgtgcagt tgcgcgaggc cacgtgggc ggccggcccg gcgcgccgtg cgcgctgctg 2580

cgcggccttg agctggccaa taccttctcg ttcttgccg cgaacgacct ggtgtggaac 2640

tacgtggtcg acaactacct gaagggaac acgccgtgc cgttcgacct gctgttctgg 2700

aacggcgacg ccaccaacct gccggggccg tggtagtctg ggtacctgcg ccacacctac 2760

ctgcagaacg agctcaaggt accgggcaag ctgaccgtgt gcggcgtgcc ggtggacctg 2820

gccagcatcg acgtgccgac ctatatctac ggctcgcgcg aagaccatat cgtgccgtgg 2880

accgcggcct atgcctcgac cgcgtgctg gcgaacaagc tgcgcttcgt gctgggtgcg 2940

tcgggccata tcgccgtgt gatcaaccg ccggccaaga acaagcgcag cactggact 3000

aacgatgcgc tgcggagtc gccgcgcaa tggctggccg gcgccatcga gcatcacggc 3060

agctggtggc cggactggac cgcattggctg gccgggcagg ccggcgcgaa acgcgccgcg 3120

cccgccaaact atggcaatgc gcgctatcg gcaatcgaac ccgcgcctgg gcgatacgtc 3180

aaagccaagg catga 3195

<210> 18

<211> 1064

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> NA-PhaC fusion polypeptide encoded by pET-14b-NA-PhaC

<400> 18

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Ser Leu Thr

1 5 10 15

Ile Ser Thr Ile Cys Phe Phe Met Gln Ile Ala Ile Leu Ile Thr Thr

20 25 30

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

35 40 45

Gln Val Met Leu Cys Glu Pro Thr Ile Ile Glu Arg Asn Ile Thr Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Ala Glu Tyr Arg Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Asp Ile Thr Gly

85 90 95
 Phe Ala Pro Phe Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly
 100 105 110
 Asp Ile Trp Val Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Asp Lys
 115 120 125
 Cys Tyr Gln Phe Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Asn Asn Val His
 130 135 140
 Ser Asn Asp Thr Val Arg Asp Arg Thr Pro Tyr Arg Thr Leu Leu Met
 145 150 155 160
 Asn Glu Leu Gly Val Pro Phe His Leu Gly Thr Lys Gln Val Cys Ile
 165 170 175
 Ala Trp Ser Ser Ser Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val
 180 185 190
 Cys Ile Thr Gly Asp Asp Lys Asn Ala Thr Ala Ser Phe Ile Tyr Asn
 195 200 205
 Gly Arg Leu Val Asp Ser Ile Val Ser Trp Ser Lys Glu Ile Leu Arg
 210 215 220
 Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Thr Val Val
 225 230 235 240
 Met Thr Asp Gly Ser Ala Ser Gly Lys Ala Asp Thr Lys Ile Leu Phe
 245 250 255
 Ile Glu Glu Gly Lys Ile Val His Thr Ser Thr Leu Ser Gly Ser Ala
 260 265 270
 Gln His Val Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Gly Val Arg
 275 280 285
 Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Ile Val Asp
 290 295 300
 Ile Asn Ile Lys Asp His Ser Thr Val Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly
 305 310 315 320
 Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Lys Asn Asp Ser Ser Ser Ser Ser His
 325 330 335

Cys Leu Asp Pro Asn Asn Glu Glu Gly Gly His Gly Val Lys Gly Trp
 340 345 350
 Ala Phe Asp Asp Gly Asn Asp Val Trp Met Gly Arg Thr Ile Ser Glu
 355 360 365
 Lys Ser Arg Leu Gly Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Glu Gly Trp Ser
 370 375 380
 Asn Pro Lys Ser Lys Leu Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Asp Arg
 385 390 395 400
 Gly Asn Arg Ser Gly Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser
 405 410 415
 Cys Ile Asn Arg Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Lys Glu
 420 425 430
 Glu Thr Glu Val Leu Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys Gly
 435 440 445
 Thr Ser Gly Thr Tyr Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Ile
 450 455 460
 Asn Leu Met Pro Ile Arg Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ala Thr Gly Lys
 465 470 475 480
 Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser Gln Pro Phe Lys Val
 485 490 495
 Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu Glu Trp Ser Arg Gln
 500 505 510
 Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala Ala Ser Gly Ile Pro
 515 520 525
 Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala Pro Ala Gln Leu Gly
 530 535 540
 Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser Ala Leu Trp Gln Ala
 545 550 555 560
 Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro Leu His Asp Arg Arg
 565 570 575
 Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro Tyr Arg Phe Ala Ala

580 585 590
 Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala
 595 600 605
 Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile Ser
 610 615 620
 Gln Trp Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro

 625 630 635 640
 Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Ala
 645 650 655
 Gly Val Arg Asn Met Met Glu Asp Leu Thr Arg Gly Lys Ile Ser Gln
 660 665 670
 Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr Glu
 675 680 685
 Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr Lys

 690 695 700
 Pro Leu Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro
 705 710 715 720
 Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser Leu
 725 730 735
 Val Arg His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser Trp
 740 745 750
 Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile

 755 760 765
 Glu His Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly
 770 775 780
 Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val
 785 790 795 800
 Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala
 805 810 815
 Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile

 820 825 830

Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr
 835 840 845
 Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu
 850 855 860
 Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn
 865 870 875 880
 Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp
 885 890 895
 Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp Tyr
 900 905 910
 Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys Val Pro
 915 920 925
 Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp Leu Ala Ser Ile Asp
 930 935 940
 Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His Ile Val Pro Trp
 945 950 955 960
 Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala Asn Lys Leu Arg Phe
 965 970 975
 Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala
 980 985 990
 Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro
 995 1000 1005
 Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu His His Gly Ser Trp Trp
 1010 1015 1020
 Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg
 1025 1030 1035
 Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu
 1040 1045 1050
 Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala
 1055 1060
 <210> 19
 <211> 3228

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct - pET-14b-PhaC-linker-NA

<400> 19

atggcgaccg gcaaaggcgc ggcagcttcc acgcaggaag gcaagtccca accattcaag	60
gtcacgccgg ggccattcga tccagccaca tggctggaat ggtcccgcga gtggcagggc	120
actgaaggca acggccacgc ggccgcgtcc ggcatccgg gcctggatgc gctggcaggc	180
gtcaagatcg cgccggcgca gctgggtgat atccagcagc gctacatgaa ggactttctca	240
gcgctgtggc aggccatggc cgagggaag gccgaggcca ccggtccgct gcacgaccgg	300
cgcttcgccg gcgacgatg gcgcaccaac ctcccatatc gcttcgctgc cgcgtttctac	360
ctgctcaatg cgcgcgcctt gaccgagctg gccgatgccg tcgaggccga tgccaagacc	420
cgccagcgca tccgcttcgc gatctcgcaa tgggtcgatg cgatgtcgcc cgccaacttc	480
cttgccacca atcccaggc gcagcgcctg ctgatcgagt cggcgggcga atcgctgcgt	540
gccggcgctg gcaacatgat ggaagacctg acacggcgca agatctcgca gaccgacgag	600
agcgcgtttg aggtcggccg caatgtcgcg gtgaccgaag gcgccgtggt cttcgagaac	660
gagtacttcc agctgttgca gtacaagccg ctgaccgaca aggtgcacgc gcgcccgctg	720
ctgatggtgc cgccgtgcat caacaagtac tacatcctgg acctgcagcc ggagagctcg	780
ctggtgcgcc atgtggtgga gcagggacat acggtgtttc tgggtgcgtg gcgcaatccg	840
gacgccagca tggccggcag cacctgggac gactacatcg agcacgcggc catccgcgcc	900
atcgaagtcg cgcgcgacat cagcggccag gacaagatca acgtgctcgg cttctgcgtg	960
ggcggcacca ttgtctcgac gcgctggcg gtgctggccg cgcgcgcgca gcacccggcc	1020
gccagcgtea cgtgctgac cacgtgctg gactttgccg acacgggcat cctcgacgtc	1080
tttgtcgacg agggccatgt gcagttgcgc gaggccacgc tggcgggcgg cgccggcgcg	1140
ccgtgcgcgc tgcgtgcgg ccttgagctg gccaatacct tctcgttctt gcgccgaac	1200
gacctggtgt ggaactacgt ggtcgacaac tacctgaagg gcaacacgcc ggtgccgttc	1260
gacctgctgt tctggaacgg cgacgccacc aacctgccgg ggccgtggtg ctgctggtac	1320
ctgcgccaca cctacctgca gaacgagctc aaggtaccgg gcaagctgac cgtgtgcggc	1380
gtgccggtgg acctggccag catcgacgtg ccgacctata tctacggctc gcgcgaagac	1440
catatcgtgc cgtggaccgc ggcctatgcc tcgaccgcgc tgctggcgaa caagctgcgc	1500
ttcgtgctgg gtgcgtcggg ccataatgcc ggtgtgatca accgcggcgc caagaacaag	1560
cgcagccact ggactaacga tgcgtgccg gagtgcgcgc agcaatggct ggccggcgcc	1620

atcgagcatc acggcagctg gtggccggac tggaccgcat ggctggccgg gcaggccggc 1680

gcgaaacgcg ccgcgcccgc caactatggc aatgcgcgct atcgcgcaat cgaaccgcg 1740

cctgggcgat acgtcaaagc caaggcacaat atggtgctgg cggtagcgat tgataaacgc 1800

ggaggcggtg gaggcctcga gaatccaaat caaaagataa taacgattgg ctctgtttct 1860

ctcaccattt ccacaatatg cttcttcatg caaattgcc aatttgataac tactgttaaca 1920

ttgcatttca agcaatatga attcaactcc ccccaaaaca accaagtgat gctgtgtgaa 1980

ccaacaataa tagaaagaaa cataacagag atagtgtatc tgaccaacac caccatagag 2040

aaggaaatat gcccctaaact agcagaatac agaaattggc caaagccgca atgtgacatt 2100

acaggatttg cacttttttc taaggacaat tcgattaggg tttccgctgg tggggacatc 2160

tgggtgacaa gagaacctta tgtgtcatgc gatcctgaca agtgttatca atttgcctt 2220

ggacagggaa caacactaaa caacgtgcat tcaaatgaca cagtacgtga taggaccctt 2280

tatcggaccc tattgatgaa tgagttaggt gtctcttttc atctggggac caagcaagtg 2340

tgcatagcat ggtccagctc aagtgtgtac gatggaaaag catggctgca tgtttgtata 2400

acgggggatg ataaaaatgc aactgctagc ttcatattaca atgggaggct ttagatagat 2460

attgtttcat ggtccaaaga aatcctcagg acccaggagt cagaatgcgt ttgtatcaat 2520

ggaacttgta cagtagtaat gactgatggg agtgcctcag gaaaagctga tactaaaata 2580

ctattcattg aggaggggaa aatcgttcat actagcacat tgtcaggaag tgctcagcat 2640

gtcagaggat gtcctgcta tcctcgatat cctgggtgtc gatgtgtctg cagagacaac 2700

tggaaaggct ccaataggcc catcgtagat ataaacataa aggatcatag cactgtttcc 2760

agttatgtgt gttcaggact tgttgagac acaccagaa aaaacgacag ctccagcagt 2820

agccattgtt tggatcctaa caatgaagaa ggtggtcatg gaggtaaagg ctgggccttt 2880

gatgatggaa atgacgtgtg gatgggaaga acgatcagcg agaagtcgcg cttagggtat 2940

gaaaccttca aagtcattga aggtggtcc aacctaaagt ccaattgca gataaatagg 3000

caagtcatag ttgacagagg taataggtcc ggttattctg gtattttctc tgttgaaggc 3060

aaaagctgca tcaatcgggtg cttttatgtg gatttgataa ggggaagaaa agaggaaact 3120

gaagtcttgt ggacctcaaa cagtattgtt gtgtttgtg gcacctcagg tacatatgga 3180

acaggctcat ggcctgatgg ggcggacatc aatctcatgc ctatataa 3228

<210> 20

<211> 1075

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> PhaC-linker-NA fusion polypeptide encoded by
pET-14b-PhaC-linker-NA

<400> 20

Met Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser
1 5 10 15
Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu
20 25 30
Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala
35 40 45
Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala
50 55 60

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

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

Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn
195 200 205
Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln
210 215 220

Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu
 225 230 235 240
 Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln
 245 250 255

 Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val
 260 265 270
 Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr
 275 280 285
 Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala
 290 295 300
 Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val
 305 310 315 320

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

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

 Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp
 450 455 460
 Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp

465 470 475 480
 His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala
 485 490 495
 Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val
 500 505 510

 Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp Ala
 515 520 525
 Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu His His
 530 535 540
 Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala Gly Gln Ala Gly
 545 550 555 560
 Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala
 565 570 575

 Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala His Met Val
 580 585 590
 Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg Gly Gly Gly Gly Gly Leu Glu Asn
 595 600 605
 Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Ser Leu Thr Ile Ser
 610 615 620
 Thr Ile Cys Phe Phe Met Gln Ile Ala Ile Leu Ile Thr Thr Val Thr
 625 630 635 640

 Leu His Phe Lys Gln Tyr Glu Phe Asn Ser Pro Pro Asn Asn Gln Val
 645 650 655
 Met Leu Cys Glu Pro Thr Ile Ile Glu Arg Asn Ile Thr Glu Ile Val
 660 665 670
 Tyr Leu Thr Asn Thr Thr Ile Glu Lys Glu Ile Cys Pro Lys Leu Ala
 675 680 685
 Glu Tyr Arg Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Asp Ile Thr Gly Phe Ala
 690 695 700

 Pro Phe Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly Asp Ile
 705 710 715 720

Trp Val Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Asp Lys Cys Tyr
 725 730 735
 Gln Phe Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Asn Asn Val His Ser Asn
 740 745 750
 Asp Thr Val Arg Asp Arg Thr Pro Tyr Arg Thr Leu Leu Met Asn Glu
 755 760 765

 Leu Gly Val Pro Phe His Leu Gly Thr Lys Gln Val Cys Ile Ala Trp
 770 775 780
 Ser Ser Ser Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val Cys Ile
 785 790 795 800
 Thr Gly Asp Asp Lys Asn Ala Thr Ala Ser Phe Ile Tyr Asn Gly Arg
 805 810 815
 Leu Val Asp Ser Ile Val Ser Trp Ser Lys Glu Ile Leu Arg Thr Gln
 820 825 830

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

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

 Asp Asp Gly Asn Asp Val Trp Met Gly Arg Thr Ile Ser Glu Lys Ser

965 970 975
 Arg Leu Gly Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Glu Gly Trp Ser Asn Pro
 980 985 990
 Lys Ser Lys Leu Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Asp Arg Gly Asn
 995 1000 1005
 Arg Ser Gly Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser Cys
 1010 1015 1020

Ile Asn Arg Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Lys Glu
 1025 1030 1035
 Glu Thr Glu Val Leu Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys
 1040 1045 1050
 Gly Thr Ser Gly Thr Tyr Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala
 1055 1060 1065
 Asp Ile Asn Leu Met Pro Ile
 1070 1075

<210> 21

<211> 2544

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct - pET-14b-M1-PhaC

<400> 21

atgagccttc taaccgaggt cgaaacgtat gttctctcta tcgttccatc aggccccctc	60
aaagccgaga tcgcgcagag acttgaagat gtctttgctg ggaaaaacac agatcttgag	120
gctctcatgg aatggctaaa gacaagacca attctgtcac ctctgactaa ggggattttg	180
gggtttgtgt tcacgtcac cgtgcccagt gaggcaggac tgcagcgtag acgctttgtc	240
caaaatgccc tcaatgggaa tggagatcca aataacatgg acaaagcagt taaactgtat	300
aggaaactta agaggagat aacgttccat ggggccaaag aaatagctct cagttattct	360
gttggtgcac ttgccagtgt catgggcctc atatacaata gaatgggggc tgtaaccact	420
gaagtggcat ttggcctggt atgtgcaaca tgtgagcaaa ttgctgactc ccagcacagg	480
tctcataggc aaatggtggc aacaaccaat ccattaataa aacatgagaa cagaatggtt	540
ttggccagca ctacagctaa ggctatggag caaatggctg gatcaagtga gcaggcagcg	600
gaggccatgg agattgctag tcaggccagg cagatggtgc aggcaatgag agccattggg	660

actcatccta gticcagtlac tggcttaaga gatgatcttc ttgaaaattt gcagacctat	720
cagaaacgaa tgggggtgca gatgcaacga ttcaagcgta cgggtggcgg tggcgggtgcg	780
accggcaaag gcgcggcagc ttccacgcag gaaggcaagt cccaaccatt caaggtcacg	840
ccggggccat tcgatccagc cacatggctg gaatgggtccc gccagtggca gggcactgaa	900
ggcaacggcc acgcggccgc gtccggcatt ccgggccttg atgcgtggc aggcgtcaag	960
atcgcgccgg cgcagctggg tgatatccag cagcgctaca tgaaggactt ctcagcgctg	1020
tggcaggcca tggccgaggg caaggccgag gccaccggtc cgctgcacga ccggcgcttc	1080
gccggcgacg catggcgcac caacctccca tatcgcttcg ctgccgcgtt ctacctgctc	1140
aatgcgcgcg ccttgaccga gctggccgat gccgtcgagg ccgatgcaa gacccgccag	1200
cgcatccgct tcgcgatctc gcaatgggtc gatgcgatgt cggccgcaa cttccttgcc	1260
accaatcccc aggcgcagcg cctgctgac gagtcgggcg gcgaatcgct gcgtgccggc	1320
gtgcgcaaca tgatggaaga cctgacacgc ggcaagatct cgcagaccga cgagagcgcg	1380
tttgaggteg gccgcaatgt cgcggtgacc gaaggcgccg tggctttcga gaacgagtac	1440
ttccagctgt tgcagtacaa gccgctgacc gacaaggtgc acgcgcgccc gctgctgatg	1500
gtgccccgt gcatcaacaa gtactacatc ctggacctgc agccggagag ctcgctggtg	1560
cgccatgtgg tggagcaggg acatacggtg tttctggtgt cgtggcgcaa tccggacgcc	1620
agcatggcgg gcagcacctg ggacgactac atcgagcacg cggccatccg cgccatcgaa	1680
gtcgcgcgcg acatcagcgg ccaggacaag atcaacgtgc tcggctttctg cgtgggcggc	1740
accattgtct cgaccgcgtt ggcggtgctg gccgcgcgcg gcgagcacc gccccgcagc	1800
gtcacgtgc tgaccacgt gctggacttt gccgacacgg gcatcctcga cgtctttgtc	1860
gacgagggcc atgtgcagtt gcgcgaggcc acgtgggcg gcggcgccgg cgcgcctgc	1920
gcgtgctgc gcggccttga gctggccaat accttctcgt tcttgcgccc gaacgacctg	1980
gtgtggaact acgtggtcga caactacctg aagggaaca cgccggtgcc gttcgacctg	2040
ctgttttgga acggcgacgc caccaacctg ccggggccgt ggtactgctg gtacctgcgc	2100
cacacctacc tgcagaacga gctcaaggta ccgggcaagc tgaccgtgtg cggcgtgccg	2160
gtggacctgg ccagcatcga cgtgccgacc tatatctacg gctcgcgca agaccatac	2220
gtgccgtgga ccgcggccta tgcccgacc gcgtgctgg cgaacaagct gcgttctgtg	2280
ctgggtgctg cgggccaat atcaaccgc cggccaagaa caagcgacg	2340
cactggacta acgatgcgt gccggagtcg ccgcagcaat ggctggccgg cgccatcgag	2400

catcacggca gctggtggcc ggactggacc gcatggctgg ccgggcaggc cggcgcgaaa 2460

cgcgccgcgc ccgccaacta tggcaatgcg cgctatcgcg caatcgaacc cgcgcctggg 2520

cgatacgtca aagccaaggc atga 2544

<210> 22

<211> 847

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> M1-PhaC fusion polypeptide encoded by pET-14b-M1-PhaC

<400> 22

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro

1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe

20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr

35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe

50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val

65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Lys Ala

85 90 95

Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala

100 105 110

Lys Glu Ile Ala Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met

115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Ala Val Thr Thr Glu Val Ala Phe

130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg

145 150 155 160

Ser His Arg Gln Met Val Ala Thr Thr Asn Pro Leu Ile Lys His Glu

165 170 175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
 180 185 190
 Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Ile Ala Ser Gln
 195 200 205
 Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Ala Ile Gly Thr His Pro Ser
 210 215 220

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

 Trp Leu Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His
 290 295 300
 Ala Ala Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys
 305 310 315 320
 Ile Ala Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp
 325 330 335
 Phe Ser Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr
 340 345 350

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

 Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser

420 425 430
 Gly Gly Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val Arg Asn Met Met Glu Asp Leu
 435 440 445
 Thr Arg Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly
 450 455 460
 Arg Asn Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr
 465 470 475 480

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

 Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu
 545 550 555 560
 Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe
 565 570 575
 Cys Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala
 580 585 590
 Arg Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu
 595 600 605

 Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His
 610 615 620
 Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys
 625 630 635 640
 Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg
 645 650 655
 Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly
 660 665 670

Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr
675 680 685
Asn Leu Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu
690 695 700
Gln Asn Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro
705 710 715 720
Val Asp Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg
725 730 735

Glu Asp His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu
740 745 750
Leu Ala Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala
755 760 765
Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr Asn
770 775 780
Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu
785 790 795 800

His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala Gly Gln
805 810 815
Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr
820 825 830
Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala
835 840 845

<210> 23

<211> 2577

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct - pET-14b-PhaC-linker-M1

<400

> 23

atggcgaccg gcaaaggcgc ggcagcttcc acgcaggaag gcaagtccca accattcaag	60
gtcacgccgg ggccattcga tccagccaca tggtctggaat ggtcccgcca gtggcagggc	120
actgaaggca acggccacgc ggccgcgtcc ggcattccgg gcctggatgc gctggcaggc	180
gtcaagatcg cgccggcgca gctgggtgat atccagcagc gctacatgaa ggacttctca	240

gcgctgtggc aggccatggc cgagggaag gccgaggcca ccggtccgct gcacgaccgg	300
cgcttcgccc gcgacgcatg gcgaccaac ctcccatatc gcttcgctgc cgcgttctac	360
ctgctcaatg cgcgcgcctt gaccgagctg gccgatgccg tcgaggccga tgccaagacc	420
cgccagcgca tccgcttcgc gatctcgca tgggtcgatg cgatgtcgcc cgccaacttc	480
cttgccacca atcccgaggc gcagcgctg ctgatcgagt cggcgggcga atcgctgcgt	540
gccggcgctgc gcaacatgat ggaagacctg acacgaggca agatctcgca gaccgacgag	600
agcgcgtttg aggtcggccg caatgtcgcg gtgaccgaag gcgccgtggt cttcgagaac	660
gagtacttcc agctgttgca gtacaagccg ctgaccgaca aggtgcacgc gcgcccgtg	720
ctgatggctg cgccgtgcat caacaagtac tacatcctgg acctgcagcc ggagagctcg	780
ctggtgcgcc atgtggtgga gcagggacat acggtgtttc tgggtgctg gcgcaatccg	840
gacgccagca tggccggcag cacctgggac gactacatcg agcacgggc catccgcgcc	900
atcgaagtgc cgcgcgacat cagcgccag gacaagatca acgtgctcgg cttctgcgtg	960
ggcggcacca ttgtctcgac cgcgtggcg gtgctggccg cgcggcgga gcacccggcc	1020
gccagcgta cgtgctgac cacgtgctg gactttgccg acacgggcat cctcgacgtc	1080
tttgtcgacg agggccatgt gcagttgcgc gaggccacgc tggcgggcgg cgccggcgcg	1140
ccgtgcgcgc tgcgtgcgg ccttgagctg gccaatacct tctcgttctt gcgcccgaac	1200
gacctggtgt ggaactacgt ggtcgacaac tacctgaagg gcaacagcc ggtgccgttc	1260
gacctgctgt tctggaacgg cgacgccacc aacctgccgg ggccgtggtg ctgctggtac	1320
ctgcgccaca cctacctgca gaacgagctc aaggtaccgg gcaagctgac cgtgtgcggc	1380
gtgccgttg accctggccag catcgacgtg ccgacctata tctacggctc gcgcgaagac	1440
catatcgtgc cgtggaccgc ggcctatgcc tcgaccgcgc tgcgtggcgaa caagctgcgc	1500
ttcgtgctgg gtgcgtcgg ccatatgcc ggtgtgatca acccgccggc caagaacaag	1560
cgcagccact ggactaacga tgcgtgccg gagtgcgcgc agcaatggct ggccggcgcc	1620
atcgagcatc acggcagctg gtggccggac tggaccgcat ggctggccgg gcaggccggc	1680
gcgaaacgcg ccgcgcccgc caactatggc aatgcgcgt atcgcgcaat cgaaccgcg	1740
cctgggcgat acgtcaaac caaggcaca atggtgctgg cggtggcgat tgataaacgc	1800
ggaggcggtg gaggcctcga gagcttcta accgaggtcg aaacgtatgt tctctctatc	1860
gttccatcag gccccctcaa agccgagatc gcgcagagac ttgaagatgt ctttgcctgg	1920
aaaaacacag atcttgaggc tctcatggaa tggtctaaaga caagaccaat tctgtcacct	1980
ctgactaagg ggattttggg gtttgtgttc acgtcaccg tgcccagtga gcgaggactg	2040

cagcgtagac gctttgtcca aaatgccctc aatgggaatg gagatccaaa taacatggac 2100

aaagcagtta aactgtatag gaaacttaag agggagataa cgttccatgg ggccaaagaa 2160

atagctctca gttattctgc tgggtgcactt gccagttgca tgggcctcat atacaataga 2220

atgggggctg taaccactga agtggcattt ggcttggtat gtgcaacatg tgagcaaatt 2280

gctgactccc agcacaggtc tcataggcaa atggtggcaa caaccaatcc attaataaaa 2340

catgagaaca gaatggtttt ggccagcact acagctaagg ctatggagca aatggctgga 2400

tcaagtgagc aggcagcgga ggccatggag attgctagtc aggccaggca gatgggtcag 2460

gcaatgagag ccattgggac tcatcctagt tccagtactg gtctaagaga tgatcttctt 2520

gaaaatttgc agacctatca gaaacgaatg ggggtgcaga tgcaacgatt caagtga 2577

<210> 24

<211> 858

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> PhaC-linker-M1 fusion polypeptide encoded by

pET-14b-PhaC-linker-M1

<400> 24

Met Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser

1 5 10 15

Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu

20 25 30

Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala

35 40 45

Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala

50 55 60

Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser

65 70 75 80

Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro

85 90 95

Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro

100 105 110

Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr

115 120 125
 Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile
 130 135 140
 Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe
 145 150 155 160
 Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly

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

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

 290 295 300
 Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val
 305 310 315 320
 Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly
 325 330 335
 Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe
 340 345 350
 Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln

 355 360 365

Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu
 370 375 380
 Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn
 385 390 395 400
 Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr
 405 410 415
 Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu
 420 425 430
 Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn
 435 440 445
 Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp
 450 455 460
 Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp
 465 470 475 480
 His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala
 485 490 495
 Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val
 500 505 510
 Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp Ala
 515 520 525
 Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu His His
 530 535 540
 Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala Gly Gln Ala Gly
 545 550 555 560
 Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala
 565 570 575
 Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala His Met Val
 580 585 590
 Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg Gly Gly Gly Gly Gly Leu Glu Ser
 595 600 605
 Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro Ser Gly

610 615 620
 Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly
 625 630 635 640
 Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro
 645 650 655
 Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
 660 665 670
 Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val Gln Asn

 675 680 685
 Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Lys Ala Val Lys
 690 695 700
 Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala Lys Glu
 705 710 715 720
 Ile Ala Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met Gly Leu
 725 730 735
 Ile Tyr Asn Arg Met Gly Ala Val Thr Thr Glu Val Ala Phe Gly Leu

 740 745 750
 Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg Ser His
 755 760 765
 Arg Gln Met Val Ala Thr Thr Asn Pro Leu Ile Lys His Glu Asn Arg
 770 775 780
 Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met Ala Gly
 785 790 795 800
 Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Ile Ala Ser Gln Ala Arg

 805 810 815
 Gln Met Val Gln Ala Met Arg Ala Ile Gly Thr His Pro Ser Ser Ser
 820 825 830
 Thr Gly Leu Arg Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Thr Tyr Gln Lys
 835 840 845
 Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
 850 855
 <210> 25

<211> 4005

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct - pET14b-NA-PhaC-linker-M1

<400> 25

atgaatccaa atcaaaagat aataacgatt ggctctgttt ctctcacat ttccacaata	60
tgctttctca tgcaaatgc catcttgata actactgtaa cattgcattt caagcaatat	120
gaattcaact ccccccaaa caaccaagtg atgctgtgtg aaccaacaat aatagaaaga	180
aacataacag agatagtgtg tctgaccaac accaccatag agaaggaaat atgccccaaa	240
ctagcagaat acagaaattg gtcaaagccg caatgtgaca ttacaggatt tgcacctttt	300
tctaaggaca attcagtag gctttccgct ggtggggaca tctgggtgac aagagaacct	360
tatgtgtcat gcgacctga caagtgttat caatttcccc ttggacaggg aacaacacta	420
aacaacgtgc attcaaatga cacagtacgt gataggaccc cttatcggac cctattgatg	480
aatgagttag gtgttccttt tcactcgggg accaagcaag tgtgcatagc atggtccagc	540
tcaagttgtc acgatggaaa agcatggctg catgtttgta taacggggga tgataaaat	600
gcaactgcta gcttcattta caatgggagg cttgtagata gtattgtttc atggtccaaa	660
gaaatcctca ggaccagga gtcagaatgc gtttgtatca atggaacttg tacagtagta	720
atgactgatg ggagtgcctc aggaaaagct gatactaaaa tactattcat tgaggagggg	780
aaaatcgctc atactagcac attgtcagga agtgcctcagc atgtcgagga gtgctcctgc	840
tatcctcgat atcctgggtg cagatgtgtc tgcagagaca actggaaagg ctccaatagg	900
cccatcgtag atataaacat aaaggatcat agcactgttt ccagtatatg gtgttcagga	960
cttgttggag acacaccag aaaaaacgac agctccagca gtagccattg tttagatcct	1020
aacaatgaag aaggtggta tggagtgaag ggctgggcct ttgatgatgg aaatgacgtg	1080
tggatgggaa gaacgatcag cgagaagtcg cgcttagggg atgaaacctt caaagtcatt	1140
gaaggctggg ccaaccctaa gtccaaattg cagataaata ggcaagtcatt agttgacaga	1200
ggtaataggt cgggttatct tggatatttc tctgttgaag gcaaaagctg catcaatcgg	1260
tgcttttatg tggagttgat aagggaaga aaagaggaaa ctgaagtctt gtggacctca	1320
aacagtattg ttgtgttttg tggcacctca ggtacatatg gaacaggctc atggcctgat	1380
ggggcggaca tcaatctcat gcctatacgt acgggtggcg gtggcggat ggcgaccggc	1440
aaaggcggg cagcttccac gcaggaaggc aagtccaac cattcaaggt cacgccgggg	1500
ccattcgatc cagccacatg gctggaatgg tcccgccagt ggcagggcac tgaaggcaac	1560

ggccacgcgg ccgcgtccgg cattccgggc ctggatgcgc tggcaggcgt caagatcgcg 1620
ccggcgcagc tgggtgatat ccagcagcgc tacatgaagg acttctcagc gctgtggcag 1680

gccatggcgg agggcaaggc cgaggccacc ggtccgctgc acgaccggcg cttcgccggc 1740
gacgcatggc gcaccaacct cccatatcgc ttgctgcccg cgttctacct gctcaatgcg 1800
cgcgcttga ccgagctggc cgatgccgtc gaggccgatg ccaagaccg ccagcgcac 1860
cgcttcgca tctcgcaatg ggtcgatgcg atgtcgccc ccaacttcct tgccaccaat 1920
cccgaggcgc agcgcttct gatcgagtcg ggcgccgaat cgctgcgtgc cggcgtgcgc 1980
aacatgatgg aagacctgac acgcggcaag atctcgaga ccgacgagag cgcgtttgag 2040
gtcgcccgca atgtcgcggt gaccgaaggc gccgtggtct tcgagaacga gtacttcag 2100

ctgttgacgt acaagccgct gaccgacaag gtgcacgcgc gcccgctgct gatggtgccg 2160
ccgtgcatca acaagtacta catctggac ctgcagccgg agagctcgct ggtgcgccat 2220
gtggtggagc agggacatac ggtgtttctg gtgtcgctggc gcaatccgga cgccagcatg 2280
gccggcagca cctgggacga ctacatcgag cacgcggcca tccgcgccat cgaagtcgcg 2340
cgcgacatca gggccagga caagatcaac gtgctcggct tctgcgtggg cggcaccatt 2400
gtctcgaccg cgctggcgggt gctggcccg cgcgccgagc acccgccgc cagcgtcacg 2460
ctgctgacca cgctgctgga ctttccgac acgggcatcc tcgacgtctt tgtcgacgag 2520

ggccatgtgc agttgcgca ggccacgtg ggcgccggcg ccggcgcgcc gtgcgcgtg 2580
ctgcgcggcc ttgagctggc caataccttc tcgttcttgc gccgaacga cctggtgtgg 2640
aactacgtgg tcgacaacta cctgaagggc aacacgccgg tgccgttcga cctgctgttc 2700
tggaacggcg acgccacaa cctgccgggg ccgtggact gctggtacct gcgccacacc 2760
tacctgcaga acgagctcaa ggtaccgggc aagctgaccg tgtgcggcgt gccggtggac 2820
ctggccagca tcgacgtgcc gacctatctc tacggctcgc gcgaagacca tatcgtgccg 2880
tggaccgcgg cctatgcctc gaccgcgtg ctggcgaaca agctgcgctt cgtgctgggt 2940

gcgtcgggcc atatcgccgg tgtgatcaac ccgccggcca agaacaagcg cagccactgg 3000
actaacgatg cgctgccgga gtgcgcgag caatggctgg ccggcgccat cgagcatcac 3060
ggcagctggt ggccggactg gaccgatgg ctggccgggc aggcggcgcc gaaacgcgcc 3120
gcgccgcca actatggcaa tgcgcgtat cgcgaatcg aaccgcgcc tggcgatac 3180
gtcaaagcca aggcacatat ggtgtggcg gtggcgattg ataacgcgg aggcgtgga 3240
ggcctcgaga gccttctaac cgaggtcgaa acgtatgtt tctctatcgt tccatcaggc 3300

ccccctcaaag ccgagatcgc gcagagactt gaagatgtct ttgctgggaa aaacacagat 3360

cttgaggctc tcatggaatg gctaaagaca agaccaattc tgtcacctct gactaagggg 3420

atitttgggt ttgtgttcac gtcaccgtg cccagtgage gaggactgca gcgtagacgc 3480

tttgtccaaa atgccctcaa tgggaatgga gatccaaata acatggacaa agcagttaaa 3540

ctgtatagga aacttaagag ggagataacg ttccatgggg ccaaagaaat agctctcagt 3600

tattctgctg gtgcacttgc cagttgcatg ggcctcatat acaatagaat gggggctgta 3660

accactgaag tggcatttgg cctggatatg gcaacatgtg agcaaattgc tgactcccag 3720

cacaggtctc ataggcaaat ggtggcaaca accaatccat taataaaaca tgagaacaga 3780

atggtttttg ccagcactac agctaaggct atggagcaaa tggctggatc aagtgagecag 3840

gcagcggagg ccatggagat tgctagtcag gccaggcaga tggcgcaggc aatgagagcc 3900

attgggactc atcctagtgc cagtactggt ctaagagatg atcttcttga aaatttgcag 3960

acctatcaga aacgaatggg ggtgcagatg caacgattca agtga 4005

<210> 26

<211> 1334

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> NA-PhaC-linker-M1 fusion polypeptide encoded by
pET-14b-NA-PhaC-linker-M1

<400> 26

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Ser Leu Thr

1 5 10 15

Ile Ser Thr Ile Cys Phe Phe Met Gln Ile Ala Ile Leu Ile Thr Thr

20 25 30

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

35 40 45

Gln Val Met Leu Cys Glu Pro Thr Ile Ile Glu Arg Asn Ile Thr Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Ala Glu Tyr Arg Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Asp Ile Thr Gly

85 90 95

Phe Ala Pro Phe Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly
 100 105 110
 Asp Ile Trp Val Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Asp Lys
 115 120 125
 Cys Tyr Gln Phe Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Asn Asn Val His
 130 135 140
 Ser Asn Asp Thr Val Arg Asp Arg Thr Pro Tyr Arg Thr Leu Leu Met
 145 150 155 160
 Asn Glu Leu Gly Val Pro Phe His Leu Gly Thr Lys Gln Val Cys Ile
 165 170 175
 Ala Trp Ser Ser Ser Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val
 180 185 190
 Cys Ile Thr Gly Asp Asp Lys Asn Ala Thr Ala Ser Phe Ile Tyr Asn
 195 200 205
 Gly Arg Leu Val Asp Ser Ile Val Ser Trp Ser Lys Glu Ile Leu Arg
 210 215 220
 Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Thr Val Val
 225 230 235 240
 Met Thr Asp Gly Ser Ala Ser Gly Lys Ala Asp Thr Lys Ile Leu Phe
 245 250 255
 Ile Glu Glu Gly Lys Ile Val His Thr Ser Thr Leu Ser Gly Ser Ala
 260 265 270
 Gln His Val Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Gly Val Arg
 275 280 285
 Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Ile Val Asp
 290 295 300
 Ile Asn Ile Lys Asp His Ser Thr Val Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly
 305 310 315 320
 Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Lys Asn Asp Ser Ser Ser Ser Ser His
 325 330 335
 Cys Leu Asp Pro Asn Asn Glu Glu Gly Gly His Gly Val Lys Gly Trp

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

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

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

 515 520 525
 Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala Pro Ala Gln Leu
 530 535 540
 Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser Ala Leu Trp Gln
 545 550 555 560
 Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro Leu His Asp Arg
 565 570 575
 Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro Tyr Arg Phe Ala

 580 585 590

Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp
595 600 605

Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile
610 615 620

Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn
625 630 635 640

Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg
645 650 655

Ala Gly Val Arg Asn Met Met Glu Asp Leu Thr Arg Gly Lys Ile Ser
660 665 670

Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr
675 680 685

Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr
690 695 700

Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro
705 710 715 720

Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser
725 730 735

Leu Val Arg His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser
740 745 750

Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr
755 760 765

Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser
770 775 780

Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile
785 790 795 800

Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala
805 810 815

Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly
820 825 830

Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala

835	840	845	
Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu			
850	855	860	
Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp			
865	870	875	880
Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe			
885	890	895	
Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp			
900	905	910	
Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys Val			
915	920	925	
Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp Leu Ala Ser Ile			
930	935	940	
Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His Ile Val Pro			
945	950	955	960
Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala Asn Lys Leu Arg			
965	970	975	
Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro			
980	985	990	
Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser			
995	1000	1005	
Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu His His Gly Ser Trp			
1010	1015	1020	
Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala Gly Gln Ala Gly Ala Lys			
1025	1030	1035	
Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala Ile			
1040	1045	1050	
Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala His Met Val			
1055	1060	1065	
Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg Gly Gly Gly Gly Gly Leu Glu			
1070	1075	1080	

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro

1085 1090 1095

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val

1100 1105 1110

Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu

1115 1120 1125

Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly

1130 1135 1140

Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg

1145 1150 1155

Arg Arg Phe Val Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn

1160 1165 1170

Asn Met Asp Lys Ala Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu

1175 1180 1185

Ile Thr Phe His Gly Ala Lys Glu Ile Ala Leu Ser Tyr Ser Ala

1190 1195 1200

Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly

1205 1210 1215

Ala Val Thr Thr Glu Val Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys

1220 1225 1230

Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Val

1235 1240 1245

Ala Thr Thr Asn Pro Leu Ile Lys His Glu Asn Arg Met Val Leu

1250 1255 1260

Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met Ala Gly Ser Ser

1265 1270 1275

Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Ile Ala Ser Gln Ala Arg Gln

1280 1285 1290

Met Val Gln Ala Met Arg Ala Ile Gly Thr His Pro Ser Ser Ser

1295 1300 1305

Thr Gly Leu Arg Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Thr Tyr Gln

1310 1315 1320

Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys

1325 1330

<210> 27

<211> 3486

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct -

pET-14b-NA-PhaC-linker-M1/hemagglutinin-PhaC

<400> 27

atgaaaacca ttatcgcgct gtcttatatt ctgtgtctgg tgtttacgca gaaactgccg 60

ggtaacgata atagtaccgc aacgctgtgc ctgggtcatc acgcagtgcc gaacggtacc 120

attgttaaaa ccatcacgaa cgatcagatt gaagtgacca atgcgacgga actggttcag 180

agctctagta ccggtgaaat ctgcgatagc ccgcatacaga ttctggatgg cgaataattgt 240

acgctgatcg atgccctgct gggcgatccg cagtgcgatg gttttcagaa caaaaaatgg 300

gatctgttcg tggaacgctc taaagcatac agtaactgtt acccgatga tgtgccggat 360

tacgccagcc tgcgtttctt gggttgaagc tctggcaccc tggaatttaa caatgaaagc 420

ttcaactgga ccggcgctac gcagaatggc acgagtagcg cgtgcattcg tcgcagtaac 480

aatagctttt tctctcgtct gaactggctg acccacctga aatttaaata tccggccctg 540

aatgtgacga tgccgaacaa cgaaaaattc gataaactgt acatctgggg cgttcatcac 600

ccgggtaccg ataacgatca gatttttccg tatgccagg caagcggctg catcacctg 660

agcacgaaac gttctcagca gaccgttatt ccgaacatcg gctctcgtcc gcgcgtgcgt 720

aatattccga gtcgcattag catctactgg accatcgta aaccgggcga tattctgctg 780

atcaacagca cgggcaatct gattgcaccg cgcggttatt ttaaaatccg ttctggcaaa 840

tctagtatta tgcgtagtga tgcgccgac ggtaaatgca atagcgaatg tatcaccccg 900

aacggctcta ttccgaatga taaaccgttc cagaacgtga atcgattac gtatggtgcc 960

tgcccgctt acgttaaaca gaacaccctg aaactggcaa cgggcgatcg caatgtgccg 1020

gaaaaacaga cccgtggcat ttttggtgcg atcgccggtt tcattgaaaa cggctgggag 1080

ggtatggttg atggctggtg tggttttcgc catcagaata gtgaaggcat tggtcaggcg 1140

gccgatctga aaagcaccca ggcagcgatt gatcagatca acggtaaact gaatcgccctg 1200

attggcaaaa cgaacgaaaa attccaccag atcgaaaaag aatttagcga agtggaaggc 1260

cgtattcagg atctgaaaa atactgtgaa gatacaaaaa tcgatctgtg gagttacaac	1320
gcagaactgc tgggtgcgct ggaaaaatcag catacatttg atctgacgga tagcgaaatg	1380
aacaaactgt tcgaaaaaac caaaaaacag ctgcgcgaaa acgcggaaga tatgggcaat	1440
ggttgtttca aaatctacca taaatgcgat aacgcctgta ttggctctat ccgtaatggt	1500
acctatgatac acgatgtgta ccgcgatgaa gactgaaca atcgttttca gattaaaggc	1560
gttgaactga aaagcgggta taaagattgg attctgtgga tcagttttgc catcagctgc	1620
ttcctgctgt gtgttgcaact gctgggtttc attatgtggg cgtgccagaa aggcaacatc	1680
cgttgcaata tttgtatccg tacgggtggc ggtggcgggtg cgaccggcaa aggcgcggca	1740
gcttccacgc aggaaggcaa gtcccaacca ttcaaggtca cgccggggcc attcgatcca	1800
gccacatggc tggaatggtc ccgccagtgg cagggcactg aaggcaacgg ccacgcggcc	1860
gcgtccggca ttccgggctt ggatgcgctg gcaggcgtca agatcgcgcc ggccgagctg	1920
ggtgatatcc agcagcgcta catgaaggac ttctcagcgc tgtggcaggc catggccgag	1980
ggcaaggccg aggccaccgg tccgtgcac gaccggcgct tcgccggcga cgcattggcg	2040
accaacctcc catatcgctt cgctgccgctg ttctacctgc tcaatgcgctg cgccttgacc	2100
gagctggccg atgccgtcga ggccgatgcc aagaccgcc agcgcatccg cttcgcgatac	2160
tcgcaatggg tcgatgcgat gtgcgccgcc aacttccttg ccaccaatcc cgaggcgcag	2220
cgcttctga tcgagtcggg cggcgaatcg ctgcgtgccg gcgtgcgcaa catgatggaa	2280
gacctgacac gggcaagat ctgcgagacc gacgagagcg cgtttgaggt cggccgcaat	2340
gtgcggtga ccgaaggcgc cgtggtcttc gagaacgagt acttcagct gttgcagtac	2400
aagccgctga ccgacaaggt gcacgcgcgc ccgtgctga tggtgccgcc gtgcatcaac	2460
aagtactaca tcttgacct gcagccggag agctcgctgg tgcgcatgt ggtggagcag	2520
ggacatacgg tgtttctggt gtctggcgcc aatccggacg ccagcatggc cggcagcacc	2580
tgggacgact acatcgagca cgcggccatc cgcgcatcg aagtgcgctg cgacatcagc	2640
ggccaggaca agatcaacgt gctcggttc tgcgtggcg gcaccattgt ctcgaccg	2700
ctggcggcgc tggccgcg cggcgagcac ccggccgcca gcgtcacgt gctgaccag	2760
ctgctggact ttccgacac gggcatctc gacgtctttg tcgacgagg ccatgtgcag	2820
ttgcgcgagg ccacgtggg cggcggcgcc ggcgcgccgt gcgcgtgct gcgcggcctt	2880
gagctggcca ataccttctc gttcttgccg ccgaacgacc tgggttgga ctactggtc	2940
gacaactacc tgaagggcaa cagccgggtg ccgttcgacc tgctgttctg gaacggcgac	3000
gccaccaacc tgccggggcc gtggtactgc tggtaactgc gccacaccta cctgcagaac	3060
gagctcaagg taccgggcaa gctgaccgtg tgcggcgtgc cggtggaact ggccagcatc	3120

gacgtgccga cctatatcta cggctcgcgc gaagaccata tcgtgccgtg gaccgcggcc 3180
tatgcctcga ccgcgtgct ggccaacaag ctgcgttcg tgctgggtgc gtcgggcat 3240

atgcgcggtg tgatcaaccc gccggccaag aacaagcgca gccactggac taacgatgcg 3300
ctgccggagt cgccgcagca atggctggcc ggcccatcg agcatcacgg cagctggtgg 3360
ccggactgga ccgatggct ggccgggcag gccggcgcga aacgcgccgc gcccgccaac 3420
tatggcaatg cgcgctatcg cgcaatcgaa cccgcgcctg ggcgatacgt caaagccaag 3480
gcatga 3486

<210> 28

<211> 1161

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hemagglutinin-PhaC fusion polypeptide encoded by
pET-14b-NA-PhaC-linker-M1/hemagglutinin-PhaC

<400> 28

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Thr

1 5 10 15

Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly

20 25 30

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Ile Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp

35 40 45

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr

50 55 60

Gly Glu Ile Cys Asp Ser Pro His Gln Ile Leu Asp Gly Glu Asn Cys

65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro Gln Cys Asp Gly Phe Gln

85 90 95

Asn Lys Lys Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Tyr Ser Asn

100 105 110

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val

115 120 125

Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Asn Asn Glu Ser Phe Asn Trp Thr

130	135	140	
Gly Val Thr Gln Asn Gly Thr Ser Ser Ala Cys Ile Arg Arg Ser Asn			
145	150	155	160
Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr His Leu Lys Phe Lys			
	165	170	175
Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Glu Lys Phe Asp Lys			
	180	185	190
Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Gly Thr Asp Asn Asp Gln Ile			
	195	200	205
Phe Pro Tyr Ala Gln Ala Ser Gly Arg Ile Thr Val Ser Thr Lys Arg			
	210	215	220
Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Arg Val Arg			
225	230	235	240
Asn Ile Pro Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly			
	245	250	255
Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Gly			
	260	265	270
Tyr Phe Lys Ile Arg Ser Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg Ser Asp Ala			
	275	280	285
Pro Ile Gly Lys Cys Asn Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile			
	290	295	300
Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile Thr Tyr Gly Ala			
305	310	315	320
Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met			
	325	330	335
Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala			
	340	345	350
Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly			
	355	360	365
Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Ile Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys			
	370	375	380

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

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

Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys
515 520 525
Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys
530 535 540
Val Ala Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile
545 550 555 560
Arg Cys Asn Ile Cys Ile Arg Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ala Thr Gly
565 570 575

Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser Gln Pro Phe Lys
580 585 590
Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu Glu Trp Ser Arg
595 600 605
Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala Ala Ser Gly Ile
610 615 620
Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala Pro Ala Gln Leu

625				630				635				640			
Gly	Asp	Ile	Gln	Gln	Arg	Tyr	Met	Lys	Asp	Phe	Ser	Ala	Leu	Trp	Gln
645				650				655							
Ala	Met	Ala	Glu	Gly	Lys	Ala	Glu	Ala	Thr	Gly	Pro	Leu	His	Asp	Arg
660				665				670							
Arg	Phe	Ala	Gly	Asp	Ala	Trp	Arg	Thr	Asn	Leu	Pro	Tyr	Arg	Phe	Ala
675				680				685							
Ala	Ala	Phe	Tyr	Leu	Leu	Asn	Ala	Arg	Ala	Leu	Thr	Glu	Leu	Ala	Asp
690				695				700							
Ala	Val	Glu	Ala	Asp	Ala	Lys	Thr	Arg	Gln	Arg	Ile	Arg	Phe	Ala	Ile
705				710				715				720			
Ser	Gln	Trp	Val	Asp	Ala	Met	Ser	Pro	Ala	Asn	Phe	Leu	Ala	Thr	Asn
725				730				735							
Pro	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	Leu	Ile	Glu	Ser	Gly	Gly	Glu	Ser	Leu	Arg
740				745				750							
Ala	Gly	Val	Arg	Asn	Met	Met	Glu	Asp	Leu	Thr	Arg	Gly	Lys	Ile	Ser
755				760				765							
Gln	Thr	Asp	Glu	Ser	Ala	Phe	Glu	Val	Gly	Arg	Asn	Val	Ala	Val	Thr
770				775				780							
Glu	Gly	Ala	Val	Val	Phe	Glu	Asn	Glu	Tyr	Phe	Gln	Leu	Leu	Gln	Tyr
785				790				795				800			
Lys	Pro	Leu	Thr	Asp	Lys	Val	His	Ala	Arg	Pro	Leu	Leu	Met	Val	Pro
805				810				815							
Pro	Cys	Ile	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Asp	Leu	Gln	Pro	Glu	Ser	Ser
820				825				830							
Leu	Val	Arg	His	Val	Val	Glu	Gln	Gly	His	Thr	Val	Phe	Leu	Val	Ser
835				840				845							
Trp	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Ser	Met	Ala	Gly	Ser	Thr	Trp	Asp	Asp	Tyr
850				855				860							
Ile	Glu	His	Ala	Ala	Ile	Arg	Ala	Ile	Glu	Val	Ala	Arg	Asp	Ile	Ser
865				870				875				880			

Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile
885 890 895

Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala
900 905 910

Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly
915 920 925

Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala
930 935 940

Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu
945 950 955 960

Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp
965 970 975

Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe
980 985 990

Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp
995 1000 1005

Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys
1010 1015 1020

Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp Leu Ala
1025 1030 1035

Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His
1040 1045 1050

Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala
1055 1060 1065

Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly
1070 1075 1080

Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr Asn
1085 1090 1095

Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile
1100 1105 1110

Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala

1115	1120	1125	
Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg	Ala Ala Pro Ala Asn	Tyr Gly Asn	
1130	1135	1140	
Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu	Pro Ala Pro Gly Arg	Tyr Val Lys	
1145	1150	1155	
Ala Lys Ala			
1160			
<210>	29		
<211>	8587		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223>	Synthetic construct -pET14b-AcpA-PhaC-IgIC		
<400>	29		
ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat		60	
aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg		120	
tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat		180	
gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat		240	
tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt		300	
aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag		360	
cggtaagatc ctigagagtt ttgcgccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa		420	
agttctgcta tgggcgcggt tattatcccg tgttgacgcc gggcaagagc aactcggtcg		480	
ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct		540	
tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac		600	
tgcgccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca		660	
caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat		720	
accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact		780	
attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc		840	
ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgtc ggcccttcg gctggctggt ttattgctga		900	
taaactctga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg		960	
taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg		1020	
aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca		1080	

agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggtacta 1140
 ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca 1200
 ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg 1260
 cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga 1320
 tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa 1380
 tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc 1440

 tacatacctc gctctgctaa tctgtttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg 1500
 tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac 1560
 ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct 1620
 acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc 1680
 ggtaagcggc agggctcgaa caggagagcg cagcagggag cttccagggg gaaacgcctg 1740
 gtatctttat agtcctgtcg gggttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgatg 1800
 ctgctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct 1860

 ggccttttgc tggccttttg ctacatgtt ctttctgcg ttatccctg attctgtgga 1920
 taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgtcgc gcgagccgaa cgaccgagcg 1980
 cagcagtgca gtgagcagg aagcgggaaga gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca 2040
 tctgtcgggt atttcacacc gcatatatgg tgcaactctca gtacaatctg ctctgatgcc 2100
 gcatagttaa gccagtatac actccgctat cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc 2160
 gacacccgcc aacacccgct gacgcgcct gacgggcttg tctgctccg gcatccgctt 2220
 acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac 2280

 cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga 2340
 tgtctgcctg ttcatccgcg tccagctcgt tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc 2400
 ttctgataaa gcgggcatg ttaagggcgg ttttttctg tttggctact gatgcctccg 2460
 tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa tgataccgat gaaacgagag aggatgctca 2520
 cgatacgggt tactgatgat gaacatgcc ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaa 2580
 tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa aaatcactca gggccaatgc cagcgcttcg 2640
 ttaatacaga ttaggtgtt ccacagggtg gccagcagca tctgcgatg cagatccgga 2700

 acataatggt gcaggcgct gacttccgcg ttccagact ttacgaaaca cggaaaccga 2760
 agaccattca tgttgttct caggctcgag acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc 2820
 gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac cagtaaggca accccgccag ctagccggg 2880
 tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca cccgtggcca ggaccaacg ctgcccgaga 2940

tgccgcgcgt ggcgctgctg gagatggcgg acgcgatgga tatgttctgc caagggttgg	3000
tttgcgcatt cacagtcttc cgcaagaatt gattggctcc aattcttgga gtggtgaatc	3060
cgtttagcgag gtgccgccgg ctccattca ggtcgagggtg gcccggctcc atgcaccgcg	3120
acgcaacgcg gggaggcaga caaggtatag ggcggcgcct acaatccatg ccaaccggtt	3180
ccatgtgctc gccgaggcgg cataaatcgc cgtgacgac agcggtccag tgatcgaagt	3240
taggctggta agagccgcga gcgatccttg aagctgtccc tgatggctgt catctacctg	3300
cctggacagc atggcctgca acgcgggcat cccgatgccg ccggaagcga gaagaatcat	3360
aatggggaag gccatccagc ctgcgtcgc gaacgccagc aagacgtagc ccagcgcgtc	3420
ggccgccatg ccggcgataa tggcctgctt ctgcgcgaaa cgtttgggtg cgggaccagt	3480
gacgaaggct tgagcgaggg cgtgcaagat tccgaatacc gcaagcgaca ggccgatcat	3540
cgtcgcgtc cagcgaaagc ggtcctcgcc gaaaatgacc cagagcgtg ccggcacctg	3600
tcctacgagt tgcatgataa agaagacagt cataagtgcg gcgacgatag tcatgccccg	3660
cgccaccgg aaggagctga ctgggttgaa ggctctcaag ggcatcggtc gacgtctcc	3720
cttatgcgac tctgcatta ggaagcagcc cagtagtagg ttgaggccgt tgagcaccgc	3780
cgccgaagg aatgggtgat gcaaggagat ggcgcccaac agtccccgg ccacggggcc	3840
tgccaccata cccacgccga aacaagcgt catgagcccg aagtggcgag cccgatcttc	3900
cccatcggtg atgtcggcga tataggcgcc agcaaccgca cctgtggcgc cggatgatgcc	3960
ggccacgatg cgtccggcgt agaggatcga gatctcgatc ccgcgaaatt aatacgactc	4020
actataggga gaccacaacg gtttccctct agaatatagg agataccagt atgaaactga	4080
acaaaattac ctigggcatt ctgagcctga gcattgacg caccaccttt gcgaccgatg	4140
tgaacaacag caaacccaac gattatggca ccttgggtgaa aattaaacag aaactgttta	4200
acaacgcga caccctgaaa accaccacc cgattaaaca tgtggtgatt atttttcagg	4260
aaaacaacag ctttgatcgc tattttggca tgtatccgaa cgcgaaaaac ccggaaggcg	4320
aaccgaaatt tgtggcgaaa gaaaacacc cgaacgtgaa cggcctgacc aaacagctgc	4380
tggaatacaa cccgaacacc aaaaaccgt atcgcttgga tcgcaacttt cagccgtgca	4440
gccagaacca tgaatatcat caggaaatta gcagctttaa cgcggcctg atgaacaaat	4500
ttgtggaaca tggcgccat gataacgata cctataaaca gaactgcgat ggccaggtga	4560
tgggctatta tgatggcaac accgtgaccg cgctgtggaa ctatgcgcag aactttgcgc	4620
tgaacgataa cacctttggc accacctttg gcccgagcac cccgggcgcg ctgaacctgg	4680
tggcgggcgc gaacggcccg gcgatgagcc cgagcgcaa cctggaaaac attgaaaaca	4740

gctatattat tgatgatccg aaccctgatt atgatgattg cagctatggc accagcaaaa 4800

gcggcgatac caacaccgcg gtggcgaaaa ttaccgatgg ctataacatt ggccattatc 4860

tgaccagaa aggcattacc tggggctggt ttcagggcgg ctttaaaccg accagctata 4920

gcggcaaaac cgcgatttgc gatgcgatga gcaccaacaa atttggcatt aaaagccgcg 4980

attatattcc gcatcatgaa ccgtttaact attggaaaga aaccagcaac ccgcatcatc 5040

tggcgccgag cgatgataaa tatattggca gcaacgatca ggcgaaacct cagtatgata 5100

ttagcgaatt ttggaaagcg ctggatcaga acaccatgcc ggcggtgagc tatctgaaag 5160

cgccgggcta tcaggatggc catggcggct atagcaaccc gctggatgaa caggaatggc 5220

tggtgaacac cattaaccgc attaaacaga gcaaagattg ggatagcacc gcgattatta 5280

ttattttatga tgatagcgat ggcgattatg atcatgtgta tagcccgaaa agccagttaa 5340

gcgatattaa aggccgccag ggctatggcc cgcgcctgcc gatgctggtg attagccgt 5400

ataccaaagc gaactatatt gatcatagcc tgctgaacca ggcgagcgtg ctgaaattta 5460

ttgaatataa ctggggcatt ggccagcgtga gcaaatatag caacgataaa tatagcaaca 5520

acattctgaa catgtttgat tttaacaaaa aacagaaaac ccgaaaactg attctggatc 5580

cgaaaaccgg cctgggtggtg gataaactga aactagtgc gaccggcaaa ggccgcgag 5640

cttcacgca ggaaggcaag tcccaacct tcaaggcac gccggggcca ttcgatccag 5700

ccacatggct ggaatgggcc cgccagtggc agggcactga aggcaacggc cacgcggccg 5760

cgtccggcat tccgggcctg gatgcgctgg caggcgtcaa gatcgcccg gcgcagctgg 5820

gtgatatcca gcagcgtac atgaaggact tctcagcgt gtggcaggcc atggccgagg 5880

gcaaggccga ggccaccgt ccgctgcacg accggcgctt cgccggcgac gcatggcgca 5940

ccaacctccc atatcgcttc gctgccgct tctacctgct caatgcgcgc gccttgaccg 6000

agctggccga tgccgtcgag gccgatgcca agaccgccca gcgcatccgc ttcgcatct 6060

cgcaatgggt cgatcgatg tgcgcccca acttccttgc caccaatccc gaggcgcagc 6120

gcctgctgat cgagtcgggc ggcgaaatgc tgcgtgccgg cgtgcgcaac atgatggaag 6180

acctgacacg cggcaagatc tcgcagaccg acgagagcgc gtttgaggtc ggccgcaatg 6240

tcgcggtgac cgaaggcgcc gtggtcttcg agaacagta cttccagctg ttgcagtaca 6300

agccgctgac cgacaagggt cagcgcgcc cgtgctgat ggtgccgccc tgcataca 6360

agtactacat cctggacctg cagccggaga gctcgctggt gcgccatgtg gtggagcagg 6420

gacatacgtt gtttctggtg tcgtggcgca atccggacgc cagcatggcc ggcagcacct 6480

gggacgacta catcgagcac gcggccatcc gcgccatcga agtcgcgcgc gacatcagcg 6540
 gccaggacaa gatcaacgtg ctgcgttctt gctggggcgg caccattgtc tcgaccgcgc 6600
 tggcgtgtct ggccgcgcgc ggcgagcacc cggccgccag cgtcacgtg ctgaccacgc 6660
 tgctggactt tgccgacacg ggcatcctcg acgtctttgt cgacgagggc catgtgcagt 6720
 tgcgcgaggc cacgtgggc ggccgcgcgc gcgcgccgtg cgcgtgtctg cgcggccttg 6780
 agctggccaa taccttctcg ttcttgcgcc cgaacgacct ggtgtggaac tacgtggtcg 6840
 acaactacct gaagggcaac acgccgggtg cgttcgacct gctgttctgg aacggcgacg 6900

 ccaccaacct gccggggccg tggtagtctt ggtacctgcg ccacacctac ctgcagaacg 6960
 agctcaaggt accgggcaag ctgaccgtgt gcggcgtgcc ggtggacctg gccagcatcg 7020
 acgtgccgac ctatatctac ggctcgcgcg aagaccatat cgtgccgtgg accgcggcct 7080
 atgcctcgac cgcgtgtctg gcgaacaagc tgcgttctgt gctgggtgcg tcgggccata 7140
 tcgccgtgt gatcaaccg ccggccaaga acaagcgag cactggact aacgatgcgc 7200
 tgccggagtc gccgcagcaa tggctggccg gcgccatcga gcatcacggc agctggtggc 7260
 cggactggac cgcattggtg gccgggcagg ccggcgcgaa acgcgccgcg cccgccaact 7320

 atggcaatgc gcgtatcgc gcaatcgaac ccgcgcctgg gcgatacgtc aaagccaagg 7380
 cacatatggt gctggcggtg gcgattgata aacgcggagg cgtggaggc ctcgagatga 7440
 ttatgagcga aatgattacc ccgcagcagg tgaccagcgg cgaaaccatt catgtgcgca 7500
 ccgatccgac cgcgtgcatt ggcagccatc cgaactgcc cctgtttatt gatagcctga 7560
 ccattgcggg cgaaaaactg gataaaaaca ttgtggcgat tgaaggcggc gaagatgtga 7620
 ccaaagcgga tagcgcgacc gcggcggcga gcgtgattcg cctgagcatt accccgggca 7680
 gcattaacct gaccattagc attaccctgg gcgtgctgat taaaagcaac gtgcgcacca 7740

 aaattgaaga aaaagtgagc agcattctgc aggcgagcgc gaccgatatg aaaattaaac 7800
 tgggcaacag caacaaaaa caggaataa aaaccgatga agcgtggggc attatgattg 7860
 atctgagcaa cctggaactg tatccgatta gcgcgaaagc gtttagcatt agcattgaac 7920
 cgaccgaact gatgggcgtg agcaaagatg gcatgagcta tcatattatt agcattgatg 7980
 gcctgaccac cagccagggc agcctgccgg tgtgctgcgc ggcgagcacc gataaaggcg 8040
 tggcgaaaat tggtatatt gcggcggcgt gaggatccgg ctgctaaca agcccgaag 8100
 gaagctgagt tggctgtgc caccgtgag caataactag cataaccct tggggcctct 8160

 aaacgggtct tgagggttt ttgtctgaaa ggaggaaacta tatccgata tccacaggac 8220
 ggggtgtgtc gccatgatcg cgtagtcat agtggctcca agtagcgaag cgagcaggac 8280
 tggcgggcgg ccaaagcgtt cggacagtgc tccgagaacg ggtgcgcata gaaattgcat 8340

caacgcatat agcgctagca gcacgccata gtgactggcg atgctgtcgg aatggacgat 8400
atcccgaag agggccggca gtaccggcat aaccaagcct atgcctacag catccagggt 8460
gacggtgccg aggatgacga tgagcgcat ttagatttc atacacggtg cctgactgcg 8520
ttagcaattt aactgtgata aactaccgca ttaaagctta tcgatgataa gctgtcaaac 8580

atgagaa 8587

<210> 30

<211> 1331

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AcpA-PhaC-IgIC fusion polypeptide encoded by
pET-14b-AcpA-PhaC-IgIC

<400> 30

Met Lys Leu Asn Lys Ile Thr Leu Gly Ile Leu Ser Leu Ser Ile Ala

1 5 10 15

Thr Thr Thr Phe Ala Thr Asp Val Asn Asn Ser Lys Pro Asn Asp Tyr

20 25 30

Gly Thr Leu Val Lys Ile Lys Gln Lys Leu Phe Asn Asn Ala Asn Thr

35 40 45

Leu Lys Thr Thr Thr Pro Ile Lys His Val Val Ile Ile Phe Gln Glu

50 55 60

Asn Asn Ser Phe Asp Arg Tyr Phe Gly Met Tyr Pro Asn Ala Lys Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Gly Leu Thr Lys Gln Leu Leu Glu Asn Asn Pro Asn Thr Lys Asn

100 105 110

Pro Tyr Arg Leu Asp Arg Asn Phe Gln Pro Cys Ser Gln Asn His Glu

115 120 125

Tyr His Gln Glu Ile Ser Ser Phe Asn Gly Gly Leu Met Asn Lys Phe

130 135 140

Val Glu His Gly Gly His Asp Asn Asp Thr Tyr Lys Gln Asn Cys Asp

145 150 155 160

Gly Gln Val Met Gly Tyr Tyr Asp Gly Asn Thr Val Thr Ala Leu Trp

165 170 175

Asn Tyr Ala Gln Asn Phe Ala Leu Asn Asp Asn Thr Phe Gly Thr Thr

180 185 190

Phe Gly Pro Ser Thr Pro Gly Ala Leu Asn Leu Val Ala Gly Ala Asn

195 200 205

Gly Pro Ala Met Ser Pro Ser Gly Asn Leu Glu Asn Ile Glu Asn Ser

210 215 220

Tyr Ile Ile Asp Asp Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp Asp Cys Ser Tyr Gly

225 230 235 240

Thr Ser Lys Ser Gly Asp Thr Asn Thr Ala Val Ala Lys Ile Thr Asp

245 250 255

Gly Tyr Asn Ile Gly His Tyr Leu Thr Gln Lys Gly Ile Thr Trp Gly

260 265 270

Trp Phe Gln Gly Gly Phe Lys Pro Thr Ser Tyr Ser Gly Lys Thr Ala

275 280 285

Ile Cys Asp Ala Met Ser Thr Asn Lys Phe Gly Ile Lys Ser Arg Asp

290 295 300

Tyr Ile Pro His His Glu Pro Phe Asn Tyr Trp Lys Glu Thr Ser Asn

305 310 315 320

Pro His His Leu Ala Pro Ser Asp Asp Lys Tyr Ile Gly Ser Asn Asp

325 330 335

Gln Ala Asn His Gln Tyr Asp Ile Ser Glu Phe Trp Lys Ala Leu Asp

340 345 350

Gln Asn Thr Met Pro Ala Val Ser Tyr Leu Lys Ala Pro Gly Tyr Gln

355 360 365

Asp Gly His Gly Gly Tyr Ser Asn Pro Leu Asp Glu Gln Glu Trp Leu

370 375 380

Val Asn Thr Ile Asn Arg Ile Lys Gln Ser Lys Asp Trp Asp Ser Thr

385 390 395 400

Ala Ile Ile Ile Ile Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Asp Tyr Asp His Val

405 410 415
 Tyr Ser Pro Lys Ser Gln Phe Ser Asp Ile Lys Gly Arg Gln Gly Tyr

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

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

 545 550 555 560
 Ala Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile
 565 570 575
 Ala Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe
 580 585 590
 Ser Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly
 595 600 605
 Pro Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu

 610 615 620
 Pro Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu
 625 630 635 640
 Thr Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg
 645 650 655

Ile Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn
660 665 670
Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly
675 680 685
Gly Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val Arg Asn Met Met Glu Asp Leu Thr
690 695 700
Arg Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg
705 710 715 720
Asn Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe
725 730 735
Gln Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro
740 745 750
Leu Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu
755 760 765
Gln Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu Gln Gly His Thr
770 775 780
Val Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser
785 790 795 800
Thr Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val
805 810 815
Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys
820 825 830
Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg
835 840 845
Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp
850 855 860
Phe Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His Val
865 870 875 880
Gln Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala
885 890 895
Leu Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro

900 905 910
 Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn
 915 920 925
 Thr Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn

930 935 940
 Leu Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln
 945 950 955 960
 Asn Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val
 965 970 975
 Asp Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu
 980 985 990
 Asp His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu

995 1000 1005
 Ala Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala
 1010 1015 1020
 Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr
 1025 1030 1035
 Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala
 1040 1045 1050
 Ile Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu

1055 1060 1065
 Ala Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly
 1070 1075 1080
 Asn Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val
 1085 1090 1095
 Lys Ala Lys Ala His Met Val Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg
 1100 1105 1110
 Gly Gly Gly Gly Gly Leu Glu Met Ile Met Ser Glu Met Ile Thr

1115 1120 1125
 Arg Gln Gln Val Thr Ser Gly Glu Thr Ile His Val Arg Thr Asp
 1130 1135 1140

Pro Thr Ala Cys Ile Gly Ser His Pro Asn Cys Arg Leu Phe Ile
1145 1150 1155

Asp Ser Leu Thr Ile Ala Gly Glu Lys Leu Asp Lys Asn Ile Val
1160 1165 1170

Ala Ile Glu Gly Gly Glu Asp Val Thr Lys Ala Asp Ser Ala Thr
1175 1180 1185

Ala Ala Ala Ser Val Ile Arg Leu Ser Ile Thr Pro Gly Ser Ile
1190 1195 1200

Asn Pro Thr Ile Ser Ile Thr Leu Gly Val Leu Ile Lys Ser Asn
1205 1210 1215

Val Arg Thr Lys Ile Glu Glu Lys Val Ser Ser Ile Leu Gln Ala
1220 1225 1230

Ser Ala Thr Asp Met Lys Ile Lys Leu Gly Asn Ser Asn Lys Lys
1235 1240 1245

Gln Glu Tyr Lys Thr Asp Glu Ala Trp Gly Ile Met Ile Asp Leu
1250 1255 1260

Ser Asn Leu Glu Leu Tyr Pro Ile Ser Ala Lys Ala Phe Ser Ile
1265 1270 1275

Ser Ile Glu Pro Thr Glu Leu Met Gly Val Ser Lys Asp Gly Met
1280 1285 1290

Ser Tyr His Ile Ile Ser Ile Asp Gly Leu Thr Thr Ser Gln Gly
1295 1300 1305

Ser Leu Pro Val Cys Cys Ala Ala Ser Thr Asp Lys Gly Val Ala
1310 1315 1320

Lys Ile Gly Tyr Ile Ala Ala Ala
1325 1330

<210> 31

<211> 6844

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct - pET-14b-PhaC-omp16

<400> 31

ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat	60
aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa ccctatttg	120
tttatTTTT taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat	180
gcttcaataa tattgaaaa ggaagagtat gattattcaa catttccgtg tcgcccttat	240
tccctTTTT gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt	300
aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag	360
cggtaagatc ctigagagtt ttccccga agaactttt ccaatgatga gcacttttaa	420
agtctgcta tgtggcgcggt tattatcccg tttgacgcc gggcaagagc aactcggtcg	480
ccgcatacac tttctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct	540
tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataaac	600
tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagtaaccg cttttttgca	660
caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat	720
accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact	780
attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc	840
ggataaagt gcaggaccac ttctgcgtc ggcccttccg gctggctggt ttattgctga	900
taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg	960
taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg	1020
aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgcagacca	1080
agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta	1140
ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taactgagt tttcgttcca	1200
ctgagcgtca gacccctgag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg	1260
cgtaatctgc tcttgcaaa caaaaaaacc accgtacca gcggtggttt gtttgccgga	1320
tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agatacaaaa	1380
tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc	1440
tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg	1500
tcttaccggg ttggactcaa gacgatagt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac	1560
ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct	1620
acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc	1680
ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cagcaggagg cttccagggg gaaacgcctg	1740

gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg	1800
ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct	1860
ggcctttttg tggccttttg ctccacatgtt ctttcttgcg ttatccccctg attctgtgga	1920
taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg	1980
cagcgagtca gtgagcgagg aagcgggaaga gcgcctgatg cggatatttc tccttacgca	2040
tctgtcgggt atttcacacc gcatatatgg tgcaactctca gtacaatctg ctctgatgcc	2100
gcatagttaa gccagtatac actccgctat cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc	2160
gacacccgcc aacacccgct gacgcgcctt gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt	2220
acagacaagc tigtaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca cgtcatcac	2280
cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga	2340
tgtctgcctg ttcatccgcg tccagctcgt tgagtttttc cagaagcgtt aatgtctggc	2400
ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg ttttttctg tttggctact gatgcctccg	2460
tgttaaggggg atttctgttc atgggggtaa tgataccgat gaaacgagag aggatgctca	2520
cgatacgggt tactgatgat gaacatgcc ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac	2580
tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa aaatcactca gggatcaatgc cagcgcttcg	2640
ttaatacaga tgtaggtgtt ccacagggtg gccagcagca tctgcgatg cagatccgga	2700
acataatggt gcagggcgct gacttccgcg ttccagact ttacgaaaca cggaaaccga	2760
agaccattca tgttgttgtc caggtcgcag acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc	2820
gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac cagtaaggca accccgccag cctagccggg	2880
tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca cccgtggcca ggaccaaac ctgcccgaga	2940
tgcgccgcgt gcggctgtg gagatggcgg acgcgatgga tatgttctgc caagggttgg	3000
tttgcgcatt cacagttctc cgcaagaatt gattggctcc aattcttgga gtggtgaatc	3060
cgtttagcgag gtgccgccgg cttccattca ggtcaggtg gcccggctcc atgcaccgcg	3120
acgcaacgcg gggaggcaga caaggtatag ggccggcctt acaatccatg ccaacccgtt	3180
ccatgtgctc gccgaggcgg cataaatcgc cgtgacgatc agcgggccag tgatcgaagt	3240
taggctggta agagccgcga gcgatccttg aagctgtccc tgatggctgt catctacctg	3300
cctggacagc atggcctgca acgcgggcat cccgatgccg ccggaagcga gaagaatcat	3360
aatggggaag gccatccagc ctgcgctcgc gaacgccagc aagacgtagc ccagcgcgtc	3420
ggccgccatg ccggcgataa tggcctgctt ctgcgcgaaa cgtttggtgg cgggaccagt	3480

gacgaaggct tgagcgaggg cgtgcaagat tccgaatacc gcaagcgaca ggccgatcat	3540
cgtcgcgctc cagcgaaagc ggtcctcgcc gaaaatgacc cagagcgctg ccggcacctg	3600
tcctacgagt tgcatgataa agaagacagt cataagtgcg gcgacgatag tcatgccccg	3660
cgcccaccgg aaggagctga ctgggttgaa ggctctcaag ggcatcggtc gacgctctcc	3720
cttatgcgac tctgcatta ggaagcagcc cagtagtagg ttgaggccgt tgagcaccgc	3780
cgccgcaagg aatggtgcat gcaaggagat ggcgcccaac agtccccgg ccacggggcc	3840
tgccaccata cccacgccga aacaagcgct catgagcccg aagtggcgag cccgatcttc	3900
cccatcggtg atgtcggcga tataggcgcc agcaaccgca cctgtggcg cggtgatgcc	3960
ggccacgatg cgtccggcgt agaggatcga gatctcgatc ccgcgaaatt aatacgactc	4020
actataggga gaccacaacg gtttcctct agaaataagg agatactagt gcgaccggca	4080
aaggcgcggc agcttcacg caggaaggca agtcccaacc attcaagtc acgccggggc	4140
cattcgatcc agccacatgg ctggaatggt cccgccagtgc gcagggcact gaaggcaacg	4200
gccacgcggc cggtccggc attccgggcc tggatgcgct ggaggcgctc aagatcgcg	4260
cggcgcagct gggatgatc cagcagcgct acatgaagga cttctcagcg ctgtggcagg	4320
ccatggccga gggcaaggcc gaggccaccg gtccgctgca cgaccggcg ttcgccggcg	4380
acgatggcg caccaacctc ccatatcgct tcgctgccg gttctacctg ctcaatgcg	4440
gcgccttgac cgagctggcc gatgccgtcg aggccgatgc caagaccgc cagcgcatcc	4500
gcttcgcat ctgcaatgg gtcatgca tgcgcccgc caacttcctt gccaccaatc	4560
ccgagcgca gcgcctgctg atcgagtcgg gcggcgcaatc gctgcgtgcc ggcgtgcgca	4620
acatgatgga agacctgaca cgcggaaga tctcgagac cgacgagagc gcgtttgagg	4680
tcggccgcaa tgcgcggtg accgaaggcg ccgtggtctt cgagaacgag tacttccagc	4740
tggtgcagta caagccgctg accgacaagg tgcacgcgcg cccgtgctg atggtgccg	4800
cgtgcatcaa caagtactac atcctggacc tgcagccgga gagctcgctg gtgcgccatg	4860
tggtggagca gggacatacg gtgtttctgg tgcgtggcg caatccggac gccagcatgg	4920
ccggcagcac ctgggacgac tacatcgagc acgcgcccat ccgcgccatc gaagtgcgc	4980
gcgacatcag cggccaggac aagatcaacg tgctcgctt ctgcgtgggc ggcaccattg	5040
tctcgaccgc gctggcggtg ctggccgcgc gcggcgagca cccggccgc agcgtcacgc	5100
tgctgaccac gctgctggac tttgccgaca cgggcatcct cgacgtcttt gtcgacgagg	5160
gccatgtgca gttgcgcgag gccacgctgg gcggcgcgcg cggcgcgccg tgcgcgtgc	5220
tgcgcgccct tgagctggcc aatactttct cgttcttgcg cccgaacgac ctggtgtgga	5280
actacgtggt cgacaactac ctgaagggca acacgccggt gccgttcgac ctgctgttct	5340

ggaacggcga cgccaccaac ctgccggggc cgtggtactg ctggtacctg cgccacacct 5400
 acctgcagaa cgagctcaag gtaccgggca agctgaccgt gtgcggcgtg ccggtggacc 5460
 tggccagcat cgacgtgccg acctatatct acggctcgcg cgaagaccat atcgtgccgt 5520
 ggaccgcggc ctatgcctcg accgcgctgc tggcgaacaa gctgcgcttc gtgctgggtg 5580

 cgtcgggcca tatgccggt gtgatcaacc cgccggccaa gaacaagcgc agccactgga 5640
 ctaacgatgc gctgccggag tcgccgcagc aatggctggc cggcgccatc gagcatcacg 5700
 gcagctggtg gccggactgg accgcatggc tggccgggca ggccggcgcg aaacgcgccg 5760
 cggccgcca ctatggcaat gcgcgctatc gcgcaatcga acccgcgctt gggcgatacg 5820
 tcaaagccaa ggcacatatg gtgctggcgg tggcgattga taaacgcgga ggcggtggag 5880
 gcctcgagat gggctgcgcg agcaaaaaa acctgccgaa caacgcgggc gatctgggcc 5940
 tgggcgcggg cgcgcgacc ccgggcagca gccaggattt tacctgaac gtgggcgac 6000

 gcattttttt tgatctggat agcagcctga ttcgcgcgga tgcgcagcag accctgagca 6060
 aacaggcgca gtggctgcag cgctatccgc agtatagcat taccattgaa ggccatgcgg 6120
 atgaacgcgg caccgcgaa tataacctgg cgtgggcca gcgcgcgcg gcggcgaccc 6180
 gcgattttct ggcgagccgc ggcgtgccga ccaaccgat gcgcaccatt agctatggca 6240
 acgaacgcc ggtggcggtg tgcgatgcgg atacctgctg gagccagaac cgccgcgcgg 6300
 tgaccgtgct gaacggcgcg ggccgctgag gatccggctg ctaacaaagc ccgaaaggaa 6360
 gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa taactagcat aacccttgg ggcctctaaa 6420

 cgggtcttga ggggtttttt gctgaaagga ggaactatat ccggatatcc acaggacggg 6480
 tgtggtcgcc atgatcgct agtcgatagt ggctccaagt agcgaagcga gcaggactgg 6540
 gcggcgccca aagcggctcg acagtgtcc gagaacgggt gcgcatagaa attgcatcaa 6600
 cgcatatagc gctagcagca cgccatagt actggcgatg ctgtcggaat ggacgatatc 6660
 ccgaagagg cccggcagta ccggcataac caagcctatg cctacagcat ccagggtgac 6720
 ggtgccgagg atgacgatga gcgcattgtt agatttcata cacggtgcct gactgcgtta 6780
 gcaatttaac tgtgataaac taccgatta aagcttatcg atgataagct gtcaaacatg 6840

 agaa 6844

 <210> 32
 <211> 752
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> PhaC-omp16 fusion polypeptide encoded by pET-14b-PhaC-omp16

<400> 32

Met Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser
1 5 10 15
Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu
20 25 30
Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala
35 40 45
Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala
50 55 60
Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser
65 70 75 80
Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro
85 90 95
Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro
100 105 110
Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr
115 120 125
Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile
130 135 140
Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe
145 150 155 160
Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly
165 170 175
Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val Arg Asn Met Met Glu Asp Leu Thr Arg
180 185 190
Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn
195 200 205
Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln
210 215 220
Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu
225 230 235 240

Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln
 245 250 255
 Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val
 260 265 270
 Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr
 275 280 285
 Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala
 290 295 300
 Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val
 305 310 315 320
 Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly
 325 330 335
 Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe
 340 345 350
 Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln
 355 360 365
 Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu
 370 375 380
 Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn
 385 390 395 400
 Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr
 405 410 415
 Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu
 420 425 430
 Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn
 435 440 445
 Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp
 450 455 460
 Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp
 465 470 475 480
 His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala

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

 545 550 555 560
 Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala
 565 570 575
 Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala His Met Val
 580 585 590
 Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg Gly Gly Gly Gly Gly Leu Glu Gly
 595 600 605
 Cys Ala Ser Lys Lys Asn Leu Pro Asn Asn Ala Gly Asp Leu Gly Leu

 610 615 620
 Gly Ala Gly Ala Ala Thr Pro Gly Ser Ser Gln Asp Phe Thr Val Asn
 625 630 635 640
 Val Gly Asp Arg Ile Phe Phe Asp Leu Asp Ser Ser Leu Ile Arg Ala
 645 650 655
 Asp Ala Gln Gln Thr Leu Ser Lys Gln Ala Gln Trp Leu Gln Arg Tyr
 660 665 670
 Pro Gln Tyr Ser Ile Thr Ile Glu Gly His Ala Asp Glu Arg Gly Thr

 675 680 685
 Arg Glu Tyr Asn Leu Ala Leu Gly Gln Arg Arg Ala Ala Ala Thr Arg
 690 695 700
 Asp Phe Leu Ala Ser Arg Gly Val Pro Thr Asn Arg Met Arg Thr Ile
 705 710 715 720
 Ser Tyr Gly Asn Glu Arg Pro Val Ala Val Cys Asp Ala Asp Thr Cys
 725 730 735

Trp Ser Gln Asn Arg Arg Ala Val Thr Val Leu Asn Gly Ala Gly Arg

740	745	750	
<210> 33			
<211> 6375			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220><223> Synthetic construct - pET-14b-6Cys-PhaC			
<400> 33			
ttcttgaaga cgaagggcc tcgtgatacg cctatnttta taggttaatg tcatgataat			60
aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg			120
tttatntttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat			180
gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat			240
tccctntttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt			300
aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag			360
cggtaagatc cttagagagtt ttgcctccga agaacgtttt ccaatgatga gcactnttaa			420
agttctgcta tgtggcgagg tattatcccg tgttgacgcc gggcaagagc aactcggtcg			480
ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct			540
tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtctgcc ataaccatga gtgataacac			600
tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttntttgca			660
caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat			720
accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact			780
attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc			840
ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgttc ggcccttccg gctggctggt ttattgctga			900
taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg			960
taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg			1020
aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca			1080
agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat tnttaattta aaaggatcta			1140
ggtgaagatc cttnttgata atctcatgac caaaatccct taactgaggt tttcgttcca			1200
ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tntttctgcg			1260
cgtaatctgc tgettgcaaa caaaaaaacc accgtacca gcggtggttt gtttgccgga			1320
tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa			1380

tactgtcctt ctagtgiagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcacccgc	1440
tacatacctc gctctgctaa tctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg	1500
tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac	1560
gggggggttcg tgcacacagc ccagcttga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct	1620
acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc	1680
ggtaagcggc agggctggaa caggagagcg cagcaggag cttccagggg gaaacgcctg	1740
glatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtatg	1800
ctcgtcaggg gggcggagcc tatgaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt	1860
ggccttttgc tggccttttg ctacatggt ctttctgcg ttatccccg attctgtgga	1920
taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc gcgagccgaa cgaccgagcg	1980
cagcgagtca gtgagcagg aagcggaga gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca	2040
tctgtcgggt atttcacacc gcatatatgg tgcaacttca gtacaatctg ctctgatgcc	2100
gcatagttaa gccagtatac actccgctat cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc	2160
gacacccgcc aacaccgct gacgcgcct gacgggcttg tctgtcccg gcatccgctt	2220
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac	2280
cgaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct catcagctg gtcgtgaagc gattcacaga	2340
tgtctgcctg ttcatccgcg tccagctcgt tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc	2400
ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg ttttttctg tttggctact gatgcctccg	2460
tgttaagggg atttctgttc atgggggtaa tgataccgat gaaacgagag aggatgctca	2520
cgatacgggt tactgatgat gaacatgcc ggttactgga acgttgtgag ggtaaacac	2580
tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa aaatcactca gggtaaatgc cagcgcttcg	2640
ttaatacaga ttaggtgtt ccacagggtg gccagcagca tctgcgatg cagatccgga	2700
acataatggt gcagggcgct gacttccgcg ttccagact ttacgaaaca cggaaaccga	2760
agaccattca tgttgtgtc caggtcgcag acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc	2820
gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac cagtaaggca accccgccag ctagccggg	2880
tcctcaacga caggagcacg atcatgcga cccgtggcca ggaccaacg ctgccgaga	2940
tgcgcgcgt gcggctgtg gagatggcgg acgcgatgga tatgttctgc caagggttgg	3000
tttgcgcatc cacagtctc cgcaagaatt gattggctcc aattcttgga gtggtgaatc	3060
cgtagcgag gtgcccgcg cttcattca ggtcaggtg gcccggtcc atgcaccgcg	3120
acgaacgcg gggaggcaga caaggtatag ggccggcctt acaatccatg ccaaccgtt	3180

ccatgtgctc gccgaggcgg cataaatcgc cgtgacgac agcgggccag tgatcgaagt 3240

taggctggta agagccgcga gcgacccctt aagctgtccc tgatggctgt catctacctg 3300

cctggacagc atggcctgca acgcgggcat cccgatgccg ccggaagcga gaagaatcat 3360

aatggggaag gccatccagc ctgcgctgc gaacgccagc aagacgtagc ccagcgcgtc 3420

ggccgccatg ccggcgataa tggcctgtct ctgccgaaa cgtttgttgg cgggaccagt 3480

gacgaaggct tgagcgaggc cgtgcaagat tccgaatacc gcaagcgaca ggccgatcat 3540

cgtcgcgtc cagcgaaagc ggtcctcgcc gaaaatgacc cagagcgtg ccggcacctg 3600

tcctacgagt tgcatgataa agaagacagt cataagtgcg gcgacgatag tcatgccccg 3660

cgccccaccg aaggagctga ctgggttgaa ggctctcaag ggcatcggtc gacgctctcc 3720

cttatgcgac tctgcatga ggaagcagcc cagtagtagg ttgaggccgt tgagcaccgc 3780

cgccgcaagg aatggtgcat gcaaggagat ggccgccaac agtcccccg ccacggggcc 3840

tgccaccata cccacgccga aacaagcgt catgagcccg aagtggcgag cccgatcttc 3900

cccatcggtg atgtcggcga tataggcgcc agcaaccgca cctgtggcgc cggatgatgcc 3960

ggccacgatg cgtccggcgt agaggatcga gatctcgac ccgcgaaatt aatacgactc 4020

actatagga gaccacaacg gtttcctctc agaaataagg agatactagt atgtgtgtt 4080

gtgtgtgtt tgccaccggc aaaggcgagg cagcttccac gcaggaaggc aagtcccaac 4140

cattcaaggt cagccggggg ccattcgatc cagccacatg gctggaatgg tcccgcagc 4200

ggcaggcac tgaaggcaac ggccacgcgg ccgcgtccgg cattccgggc ctggatgcgc 4260

tggcaggcgt caagatcgcg ccggcgagc tgggtgatat ccagcagcgc tacatgaagg 4320

acttctcagc gctgtggcag gccatggccg agggcaaggc cgaggccacc ggtccgctgc 4380

acgaccggcg cttcgccggc gacgatggc gcaccaacct cccatctgc ttcgctgccg 4440

cgttctacct gctcaatgcg cgcgccttga ccgagctggc cgatgcgcgc gaggccgatg 4500

ccaagaccg ccagcgcac cgttcgcga tctcgcaatg ggtcgatgcg atgtgccccg 4560

ccaacttct tgccaccaat cccgaggcgc agcgcctgct gatcgagtgc ggccggcaat 4620

cgctgcgtgc cggcgtgcgc aacatgatgg aagacctgac acgcggaag atctcgaga 4680

ccgacgagag cgcgtttgag gtcggccgca atgtcgcggt gaccgaaggc gccgtggtct 4740

tcgagaacga gtacttccag ctgttgcatg acaagccgct gaccgacaag gtgcacgcgc 4800

gcccgtgct gatggtgccg ccgtgcatca acaagtacta catcctggac ctgcagccgg 4860

agagctcgct ggtgcgcat gtggaggagc agggacatac ggtgtttctg gtgtcgtggc 4920

gcaatccgga cgccagcatg gccggcagca cctgggacga ctacatcgag cacgcggcca 4980
 tccgcgccat cgaagtcgag cgcgacatca gcgccagga caagatcaac gtgctcggct 5040
 tctgcgtggg cggcaccatt gtctcgaccg cgtggcggt gctggccgag cgcggcgagc 5100
 acccgccgag cagcgtcacg ctgctgacca cgtgctgga ctttgccgac acgggcatcc 5160
 tcgacgtctt tctcgacgag ggccatgtgc agttgcgca ggccacgctg ggcggcggcg 5220
 ccggcgccg cgtcgcgctg ctgcccggcc ttgagctggc caataccttc tcgttcttgc 5280
 gcccgaacga cctgggtgtg aactacgtgg tcgacaacta cctgaaggga aacacgccgg 5340

 tgccgttcga cctgctgttc tggaacggcg acgccacca cctgccgggg cctggttact 5400
 gctggtacct gcgccacac tacctgcaga acgagctcaa ggtaccgggc aagctgaccg 5460
 tgtgcggcgt gccggtggac ctggccagca tcgacgtgcc gacctatctc tacggctcgc 5520
 gcgaagacca tatcgtgccg tggaccggcg cctatgcctc gaccgcgctg ctggcgaaca 5580
 agctgcgctt cgtgctgggt gcgtcgggcc atatcgccgg tgtgatcaac ccgccggcca 5640
 agaacaagcg cagccactgg actaacgatg cgtgccgga gtcgccgag caatggctgg 5700
 ccggcgccat cgagcatcac ggcagctggt ggcgggactg gaccgcatgg ctggccgggc 5760

 aggcggcgcg gaaacgcgcc gcgcccgcga actatggcaa tgcgcgtat cgcgcaatcg 5820
 aaccgcgcc tgggcgatac gtcaaagcca agcagtgtaa ggatccggct gctaacaag 5880
 cccgaaagga agctgagttg gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taacccttg 5940
 gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tccggatctc 6000
 cacaggacgg gtgtggtcgc catgatcgcg tagtcgatag tggctccaag tagcgaagcg 6060
 agcaggactg ggcggcgccc aaagcggctg gacagtgtc cgagaacggg tgcgcataga 6120
 aattgcatac acgcatatag cgctagcagc acgcatagt gactggcgat gctgtcggaa 6180

 tggacgatat cccgcaagag gcccggcagt accggcataa ccaagcctat gcctacagca 6240
 tccagggtga cggtgccgag gatgacgatg agcgattgt tagatttcat acacgtgccc 6300
 tgactgcgtt agcaatttaa ctgtgataaa ctaccgatt aaagcttctc gatgataagc 6360
 tgtcaaacat gagaa 6375

 <210> 34
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Cys6-PhaC fusion polypeptide encoded by pET-14b-6Cys-PhaC
 <400> 34

Met Cys Cys Cys Cys Cys Cys Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser

1 5 10 15
 Thr Gln Glu Gly Lys Ser Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe
 20 25 30
 Asp Pro Ala Thr Trp Leu Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu
 35 40 45
 Gly Asn Gly His Ala Ala Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu
 50 55 60
 Ala Gly Val Lys Ile Ala Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg

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

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

195 200 205
 Phe Glu Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe
 210 215 220
 Glu Asn Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys
 225 230 235 240
 Val His Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr

245 250 255
Tyr Ile Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val

260 265 270
Glu Gln Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala

275 280 285
Ser Met Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile

290 295 300
Arg Ala Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn

305 310 315 320
Val Leu Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala

325 330 335
Val Leu Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu

340 345 350
Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val

355 360 365
Asp Glu Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala

370 375 380
Gly Ala Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Thr Phe

385 390 395 400
Ser Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn

405 410 415
Tyr Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn

420 425 430
Gly Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg

435 440 445
His Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val

450 455 460
Cys Gly Val Pro Val Asp Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile

465 470 475 480
Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala

485 490 495

Ser Thr Ala Leu Leu Ala Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser

500 505 510

Gly His Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser

515 520 525

His Trp Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala

530 535 540

Gly Ala Ile Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp

545 550 555 560

Leu Ala Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly

565 570 575

Asn Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys

580 585 590

Ala Lys Ala

595

<210> 35

<211> 8464

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct - pET-14b-PorA-PhaC-PorB

<400> 35

ttctcatgtt tgacagctta tcatgataa gctttaatgc ggtagtttat cacagttaa 60

ttgctaacgc agtcaggcac cgtgtatgaa atctaacaat gcgctcatcg tcatcctcgg 120

caccgtcacc ctggatgctg taggcatagg ctgggttatg ccggtactgc cgggcctctt 180

gcgggatatc gtccattccg acagcatcgc cagtcactat ggctgtctgc tagcgtata 240

tgcgttgatg caatttctat gcgcacccgt tctcggagca ctgtccgacc gctttggcgg 300

ccgccagtc ctgctcgctt cgctacttgg agccactatc gactacgca tcatggcgac 360

cacaccgctc ctgtggatat ccggatatag ttctctcttt cagcaaaaaa cccctcaaga 420

cccgtttaga ggccccaagg gggttatgcta gttattgctc agcgggtggca gcagccaact 480

cagcttcctt tcgggctttg ttagcagccg gatccttaga atttgtgacg cagaccgaca 540

ccgccggcag tcgatacgaa ttgttttcg cctttgcctt cttgcaacca accggcagaa 600

accaaggcag aagtgcgttt ggagaagtcg tattccgcac cgacaaccac ttggtcgtaa 660

tcgttgctta agtcgtcatc atcaaacgag cttttgaagc cgtgggctga agaaacgcgg	720
ggcgttacgt tgccgaagcg gtatgccaag gtacggcga cttcggtttg agagtgtgc	780
gaattgtcgt ttggcaaagc caatttcgca tcttgttgtt gtacggctac ggaggcgtac	840
agggcatcat tgcgtgaacc gctgacaaaa cggatgaatct ggtatttctc aatattcacg	900
ttctcttgca cttgatgatg tcttttatag gcaccgcat attgcacgaa gaagccgccg	960
ttttttagt tgaagccggc gtggaagat tcgctgttat gtctgcctgc attgtcgta	1020
agcgcgtatt gtacgtgcc gctgaggccg gcaaattcgg gagaatcgta gcgtacggaa	1080
atgaggcgtg cttcggttc ggcaattttg ttacaccca aatagtcgt tttgctatcc	1140
caaggattga tgcgccggt atctttcagg acgctgttca aacggccgac gcgcaattta	1200
ccgaagccgc cttcaagcc gatgaaggat tggcggttgc cccaaccgga gtcagtaccg	1260
gcgatagatg ctttttgctc aacctgccaa atggctttca ggccgttacc gaggtcttct	1320
tggcctttga agccgatttt cgaacccaaa tcaacgatgc cggtagccgt ttcaacgcta	1380
gccgcctgag ctccattgtg agctacggag cgggaagttt ctacgccgcg ttgatgggtg	1440
ccgtacaggg taacgtcctc gaggcctcca ccgcctccgc gtttatcaat cgccaccgcc	1500
agcaccatat gtgccttggc tttagcgtat cggccaggcg cgggttcgat tgcgcgatag	1560
cgcgcattgc catagtggc gggcgccgcg cgtttcgcgc cggcctgccc ggccagccat	1620
gcggtccagt ccggccacca gctgccgtga tgcctgatgg cgcggccag ccattgtctgc	1680
ggcgactccg gcagcgcac gttagtccag tggctgcgt tgttcttggc cggcggttg	1740
atcacaccgg cgatatggc cgacgcacc agcacgaagc gcagcttgtt cgccagcagc	1800
gcggtcgagg cataggccgc ggtccacggc acgatatggt cttcgcgca gccgtagata	1860
taggtcggca cgtcgatgct ggccaggctc accggcacgc cgcacacggt cagcttgccc	1920
ggtaccttga gtcgttctg caggtaggtg tggcgagggt accagcagta ccacggcccc	1980
ggcaggttgg tggcgtgcc gttccagaac agcaggtcga acggcaccgg cgtgttgccc	2040
ttcaggtagt tgcgaccac gtagttccac accaggtcgt tcgggcgcaa gaacgagaag	2100
gtattggcca gtcgaagcc gcgcagcagc gcgcacggcg cgcggcgcc gccgcccagc	2160
gtggcctcgc gcaactgcac atggccctcg tcgacaaaga cgtcgaggat gccgtgtcg	2220
gcaaagtcca gcagcgtgt cagcagcgtg acgttggcgg ccgggtgtct gccgcgcgcg	2280
gccagaccg ccagcgcggt cgagacaatg gtccgccca cgcagaagcc gagcacgttg	2340
atcttgcct ggccgtgat gtcgcgcgcg acttcgatgg cgcggatggc cgcgtgctcg	2400
atgtagtct cccaggtgct gccggccatg ctggcgtccg gattgcgca cgacaccaga	2460
aacaccgtat gtcctgtct caccacatgg cgcaccagcg agctctccg ctgcaggtcc	2520

aggatgtagt acttgttgat gcacggcggc accatcagca gcgggcgcgc gtgcaccttg 2580

tcggtcagcg gcttgtactg caacagctgg aagtactcgt tctcgaagac cacggcgctt 2640

tcggtcaccg cgacattgcg gccgacctca aacgcgtctt cgtcggctctg cgagatcttg 2700

ccgcgtgtca ggctttccat catgttgcgc acgccggcac gcagcgattc gccgcccgc 2760

tcgatcagca ggcgctgcgc ctcgggattg gtggcaagga agttggcggg cgacatcgca 2820

tcgaccatt gcgagatcg gcagcgatg cgtggcggg tcttggcatc gccctcgacg 2880

gcatcgcca gctcggtaaa ggcgcgcgc ttagcaggt agaacgcgc agcgaagcga 2940

tatgggaggt tggcgcgca tgcgtgcgc gcgaagcgcc ggtcgtgcag cggaccggtg 3000

gcctcggcct tgcctcggc catggcctgc cacagcgctg agaagtcctt catgtagcgc 3060

tgttgatat caccagctg cgccggcgcg atcttgacgc ctgccagcgc atccaggccc 3120

ggaatgccgg acgcggccgc gtggccgttg ccttcagtgc cctgccactg gcgggacct 3180

tccagccatg tggctggatc gaatggcccc ggctgacct tgaatggtg ggacttgcct 3240

tcctgcgtgg aagctgccgc gcctttgccg gtgcgaaatt tatggcgag gccaatgctc 3300

gccgcgttaa tctgggtata gttgccaatg ccggtgttgc gtttcagcca cgcgccgctc 3360

acaatcgcg tggcgtgtt gctaaaatca taatccacgc ccgcaataat ctgatcatag 3420

ctggtgtttt cgcctttttt gcccggttca ataaaatcaa agccatgcgc atagctaatg 3480

cgcggcaccg cgttgccaaa gcgatagctc gcggtcgcgc caatttcggt ggtgctgttt 3540

ttggttttat cgcggtttt gctcagatcc agctgcgcgc ccagcgccag gttcaggccg 3600

ccttttcat agccgccggt caggcgatgc acctgatgtt ttttcagcg atcggtgctt 3660

ttcgcttcat catcatcgcc aatgcggccc agcagaaaca ggttaaagc atcgcggccc 3720

acgttcgcat ggcgcgcata tttaaagcga tagttgcccg caaagccgc gtttttatag 3780

ttcaggcccc cataatacac atcgtgcgc ggtttgccca ccaccgccg cacgcgaata 3840

atggtgttgt tcgcgccgtt gccagggtc gccggggtat acgcgctttt gctgttctgc 3900

gccggcaca actgcacgt gccgtaaaag ccgctaaatt ccgggctatc atagcgacg 3960

ctcaccgga tatcatcatg gcgtttaaaa atgccagct ggctgccac atcgttgttg 4020

ctatcccag gatcaatgc ctggctcgca tcataaact ggttcgccac gcggcccgcg 4080

cgcagggtgc caaattcgcc gccaggcca ataaagcttt cgcggttgcc cactgggtc 4140

gcgccccgc ccgccacgt cacatcctgt tccagtgcc acaccgcttt caggccatcg 4200

cccagatctt cgtgccttt aaagccaata aagctgcca aatcgctaat ttggtgcga 4260

atggcgcttt tcgttttgt cactttacc tggccgtcg cgcgcgctt cgcgcctgc 4320

gcttcggtca gctcagctg atagttgcgg ccttcacgc ccgtttaat ttcgccatac 4380

aggctcacat ccatactggt atctcctata ttctagaggg aaaccgttgt ggtctcccta 4440

tagtgagtcg tattaatttc gcgggatcga gatctcgatc ctctacgccg gacgcatcgt 4500

ggccggcatc accggcgcca caggtgcggt tgcctggcgcc tatacgccg acatcaccga 4560

tggggaagat cgggctcgcc acttcgggct catgagcgct tgtttcggcg tgggtatggt 4620

ggcaggcccc gtggccgggg gactgttggg cgccatctcc ttgcatgcac cattccttgc 4680

ggcggcggtg ctcaacggcc tcaacctact actgggctgc ttctaatgc aggagtcgca 4740

taaggagag cgctgaccga tgccttgag agccttcaac ccagtcagct ccttcgggtg 4800

ggcgcggggc atgactatcg tcgccgcaact tatgactgtc ttctttatca tgcaactcgt 4860

aggacaggtg ccggcagcgc tctgggtcat ttctggcgag gaccgcttcc gctggagcgc 4920

gacgatgatc ggctgtcgc ttgcggtatt cggaatcttg cacgccctcg ctcaagcctt 4980

cgctactggt cccgccacca aacgtttcgg cgagaagcag gccattatcg ccggcatggc 5040

ggccgacgcg ctgggctacg tcttctggc gtctcgacg cgaggctgga tggccttccc 5100

cattatgatt ctctcgtt ccggcggcat cgggatgccc gcgttgagg ccatgctgtc 5160

caggcaggtg gatgacgacc atcagggaca gcttcaagga tcgctcgagg ctcttaccag 5220

cctaacttcg atcactggac cgctgatcgt cacggcgatt tatgccgcct cggcgagcac 5280

atggaacggg ttggcatgga ttgtaggcgc cgcctatac cttgtctgcc tcccccggtt 5340

gcgtcgcggt gcatggagcc gggccaccct gacctgaatg gaagccggcg gcacctcgt 5400

aacggattca cactccaag aattggagcc aatcaattct tgcggagaac tgtgaatgcg 5460

caaaccaacc cttggcagaa catatccatc gcgtccgcca tctccagcag ccgcacgcgg 5520

cgcatctcgg gcagcgttgg gtcctggcca cgggtgcgca tgatcgtgct cctgtcgttg 5580

aggacccggc taggctggcg gggttgcctt actggttagc agaatgaatc accgatacgc 5640

gagcgaacgt gaagcgactg ctgctgcaaa acgtctgcga cctgagcaac aacatgaatg 5700

gtcttcggtt tccgtgttcc gtaaagtctg gaaacgcgga agtcagcgcc ctgcaccatt 5760

atgttcgga tctgcatcgc aggatgctgc tggtaccct gtggaacacc tacatctgta 5820

ttaacgaagc gctggcattg accctgagtg atttttctct ggtcccgcg catccatacc 5880

gccagttgtt taccctcaca acgttccagt aaccgggcat gttcatcatc agtaaccgt 5940

atcgtgagca tctctctcg ttctatcggt atcattacce ccatgaacag aaatccccct 6000

tacacggagg catcagtac caaacaggaa aaaaccgccc ttaacatggc ccgctttatc 6060

agaagccaga cattaacgt tctggagaaa ctcaacgagc tggacgcgga tgaacaggca 6120

gacatctgtg aatcgcttca cgaccacgct gatgagcttt accgcagctg cctcgcgctg 6180
ttcggatgat acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggt cacagcttgt 6240
ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttgccggg 6300
tgtcggggcg cagccatgac ccagtcacgt agcgatagcg gagtgtatac tggcttaact 6360
atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatat atgcggtgtg aaataccgca 6420
cagatgcgta aggagaaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc 6480
gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg 6540

gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa 6600
ggccaggaac cgtaaaaagg ccgctgttgc ggcgtttttc cataggtcc gcccccctga 6660
cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagag gactataaag 6720
ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgt 6780
taccggatac ctgtccgct tttcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg 6840
ctgtaggtat ctcagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc 6900
ccccgttcag cccgaccgct gcgccttacc cggtaactat cgtcttgagt ccaaccggt 6960

aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta 7020
tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac 7080
agtatttggg atctgcgtc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc 7140
ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt tttgtttgca agcagcagat 7200
tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc tttctacgg ggtctgacgc 7260
tcagtggaaac gaaaactcac gtttaaggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt 7320
cacctagatc cttttaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaagta tatatgagta 7380

aacttggctt gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct 7440
atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg 7500
cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgtcac cggctccaga 7560
tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt 7620
atccgctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt 7680
taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tgcaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt 7740
tggtatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccat 7800

gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc 7860
cgcagtgtta tcaactatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc 7920
cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat 7980

gcggcgaccg agttgctctt gcccgcgctc aacacgggat aataccgcgc cacatagcag 8040
aactttaaaa gtgtcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt 8100
accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc 8160
ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa 8220

gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttcttttttc aatattattg 8280
aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata ttggaatgta ttagaaaaa 8340
taaacaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac 8400
cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca 8460
agaa 8464

<210> 36

<211> 1292

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> PorA-PhaC-PorB fusion polypeptide encoded by
pET-14b-PorA-PhaC-PorB

<400> 36

Met Asp Val Ser Leu Tyr Gly Glu Ile Lys Ala Gly Val Glu Gly Arg

1 5 10 15

Asn Tyr Gln Leu Gln Leu Thr Glu Ala Gln Ala Ala Asn Gly Gly Ala

20 25 30

Ser Gly Gln Val Lys Val Thr Lys Ala Lys Ser Arg Ile Arg Thr Lys

35 40 45

Ile Ser Asp Phe Gly Ser Phe Ile Gly Phe Lys Gly Ser Glu Asp Leu

50 55 60

Gly Asp Gly Leu Lys Ala Val Trp Gln Leu Glu Gln Asp Val Ser Val

65 70 75 80

Ala Gly Gly Gly Ala Thr Gln Trp Gly Asn Arg Glu Ser Phe Ile Gly

85 90 95

Leu Ala Gly Glu Phe Gly Thr Leu Arg Ala Gly Arg Val Ala Asn Gln

100 105 110

Phe Asp Asp Ala Ser Gln Ala Ile Asp Pro Trp Asp Ser Asn Asn Asp

115 120 125
 Val Ala Ser Gln Leu Gly Ile Phe Lys Arg His Asp Asp Met Pro Val
 130 135 140
 Ser Val Arg Tyr Asp Ser Pro Glu Phe Ser Gly Phe Ser Gly Ser Val
 145 150 155 160
 Gln Phe Val Pro Ala Gln Asn Ser Lys Ser Ala Tyr Thr Pro Ala Thr
 165 170 175
 Leu Ala Asn Gly Ala Asn Asn Thr Ile Ile Arg Val Pro Ala Val Val
 180 185 190

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

 Arg Leu Thr Gly Gly Tyr Glu Glu Gly Gly Leu Asn Leu Ala Leu Ala
 260 265 270
 Ala Gln Leu Asp Leu Ser Glu Asn Gly Asp Lys Thr Lys Asn Ser Thr
 275 280 285
 Thr Glu Ile Ala Ala Thr Ala Ser Tyr Arg Phe Gly Asn Ala Val Pro
 290 295 300
 Arg Ile Ser Tyr Ala His Gly Phe Asp Phe Ile Glu Arg Gly Lys Lys
 305 310 315 320

 Gly Glu Asn Thr Ser Tyr Asp Gln Ile Ile Ala Gly Val Asp Tyr Asp
 325 330 335
 Phe Ser Lys Arg Thr Ser Ala Ile Val Ser Gly Ala Trp Leu Lys Arg
 340 345 350
 Asn Thr Gly Ile Gly Asn Tyr Thr Gln Ile Asn Ala Ala Ser Ile Gly
 355 360 365

Leu Arg His Lys Phe Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln
 370 375 380

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

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

 Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser
 515 520 525
 Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile
 530 535 540
 Glu Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val Arg Asn Met Met Glu
 545 550 555 560
 Asp Leu Thr Arg Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu
 565 570 575

 Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn
 580 585 590
 Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His
 595 600 605
 Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile

610 615 620
 Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu Gln
 625 630 635 640

 Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met
 645 650 655
 Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala
 660 665 670
 Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu
 675 680 685
 Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu
 690 695 700

 Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr
 705 710 715 720
 Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu
 725 730 735
 Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala
 740 745 750
 Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe
 755 760 765

 Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu
 770 775 780
 Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp
 785 790 795 800
 Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr
 805 810 815
 Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly
 820 825 830

 Val Pro Val Asp Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly
 835 840 845
 Ser Arg Glu Asp His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr
 850 855 860

Ala Leu Leu Ala Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His
865 870 875 880

Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp
885 890 895

Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala
900 905 910

Ile Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala
915 920 925

Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala
930 935 940

Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys
945 950 955 960

Ala His Met Val Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg Gly Gly Gly Gly
965 970 975

Gly Leu Glu Asp Val Thr Leu Tyr Gly Thr Ile Lys Ala Gly Val Glu
980 985 990

Thr Ser Arg Ser Val Ala His Asn Gly Ala Gln Ala Ala Ser Val Glu
995 1000 1005

Thr Gly Thr Gly Ile Val Asp Leu Gly Ser Lys Ile Gly Phe Lys
1010 1015 1020

Gly Gln Glu Asp Leu Gly Asn Gly Leu Lys Ala Ile Trp Gln Val
1025 1030 1035

Glu Gln Lys Ala Ser Ile Ala Gly Thr Asp Ser Gly Trp Gly Asn
1040 1045 1050

Arg Gln Ser Phe Ile Gly Leu Lys Gly Gly Phe Gly Lys Leu Arg
1055 1060 1065

Val Gly Arg Leu Asn Ser Val Leu Lys Asp Thr Gly Asp Ile Asn
1070 1075 1080

Pro Trp Asp Ser Lys Ser Asp Tyr Leu Gly Val Asn Lys Ile Ala
1085 1090 1095

Glu Pro Glu Ala Arg Leu Ile Ser Val Arg Tyr Asp Ser Pro Glu

1100 1105 1110
Phe Ala Gly Leu Ser Gly Ser Val Gln Tyr Ala Leu Asn Asp Asn
1115 1120 1125
Ala Gly Arg His Asn Ser Glu Ser Tyr His Ala Gly Phe Asn Tyr
1130 1135 1140

Lys Asn Gly Gly Phe Phe Val Gln Tyr Gly Gly Ala Tyr Lys Arg
1145 1150 1155
His His Gln Val Gln Glu Asn Val Asn Ile Glu Lys Tyr Gln Ile
1160 1165 1170
His Arg Leu Val Ser Gly Tyr Asp Asn Asp Ala Leu Tyr Ala Ser
1175 1180 1185
Val Ala Val Gln Gln Gln Asp Ala Lys Leu Ala Leu Pro Asn Asp
1190 1195 1200

Asn Ser His Asn Ser Gln Thr Glu Val Ala Ala Thr Leu Ala Tyr
1205 1210 1215
Arg Phe Gly Asn Val Thr Pro Arg Val Ser Tyr Ala His Gly Phe
1220 1225 1230
Lys Gly Ser Phe Asp Asp Ala Asp Leu Ser Asn Asp Tyr Asp Gln
1235 1240 1245
Val Val Val Gly Ala Glu Tyr Asp Phe Ser Lys Arg Thr Ser Ala
1250 1255 1260

Leu Val Ser Ala Gly Trp Leu Gln Glu Gly Lys Gly Glu Asn Lys
1265 1270 1275
Phe Val Ser Thr Ala Gly Gly Val Gly Leu Arg His Lys Phe
1280 1285 1290

<210> 37

<211> 10693

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct - pET-14b-FetA-PhaC-ZnuD

<400> 37

ttctcatgtt tgacagctta tcatcgataa gctttaatgc ggtagtttat cacagttaaa

60

ttgctaacgc agtcaggcac cgtgtatgaa atctaacaat gcgctcatcg tcatcctcgg	120
caccgtcacc ctggatgctg taggcatagg ctgtgttatg ccggtactgc cgggcctctt	180
gcgggatatc gtccattccg acagcatcgc cagtcaactat ggctgtgtgc tagcgtata	240
tgcgttgatg caatttctat gcgcacccgt tctcggagca ctgtccgacc gctttggccg	300
ccgccagtc ctgctcgctt cgctacttgg agccactatc gactacgcga tcatggcgac	360
cacacccgtc ctgtggatag ccggatatag ttctctcttt cagcaaaaaa cccctcaaga	420
cccgtttaga ggccccaagg ggttatgcta gttattgtc agcgggtggca gcagccaact	480
cagcttcctt tcgggcttgg ttagcagccg gatcctcaaa atttcacgtt cacgccgcg	540
gtaaagctgc ggcccatctg cggggtatcg ctcaaaaagc tgctatgcgc atacacgctc	600
tggttcagca ggttatccgc ttccacatac cagttccatt cgccatagcg ggtgttgccg	660
cgatagtctg cggccaggtt cagcatatga tggccggggg tgggggttcc atagcgcgc	720
agttttgtct gcgcaaacac gcgataataa tccaggttcg catcaatgcg atcggtcagg	780
ctcgttttca gatgaaagcc caggcgcgcc gccggcacgc gcggcgcggt ctgatcatcc	840
tgcgcaataa acgggcgggt gccatacgca tcttcgcggc ccggcaggct cggcaggttt	900
ttcaggcggc cgcgcacata atcgccgctc acgccaatgc gatagcgcg ggtcggttta	960
aaataaatTT cgccttccgc gccataaaaa tccgcgcgc tctggttata gcgcaccagt	1020
ttcatttcgc tatcatcttc aatgcttttc ggcccgcggc catcgttcag ggtctgcgca	1080
taaatatagt tgccaaagcg gttgcgatac agcgccaggt tatactgcca gcgatcgct	1140
tcatagccca gcgccagttc aatgttggtg ctgcttctt ttgttcagatg ttgttgccc	1200
acttcaaagg tgttggtcgc cacatgtttg ccatgcgcat acagttcctg ggtgctcggc	1260
aggcgttct gatggctcgc ggtcaggctc agtttatgct gcggggtaaa ataccagttg	1320
ccgctcagcg caaagctgcg cgcggtctgg cgatgcgcgc ccagatccgg cagcggtatg	1380
ttataatagt ttctcgatc aatcagcgct ttatcatact gaatgctcgc ttctgtttt	1440
tccacgcgca cggcgcttc cagggtaaag ttatccagtt tcgctgttc cagccaaaa	1500
aagctataat gctgcacttt gttatccagc agcatcggct gtttcaccgc ttcgctaate	1560
gcgctcagcg cgtgctttt ctgctgcaga tactgcacgc ccagctgcc ttccaggcgg	1620
ccaatcggt gatggcgagc ttcaatgcgc gcgttctggg tctggttgtt aaaaaagttt	1680
tccaccgcat cggcgcttt ttcatcatgg cgataatcgt tgcggttcag atgcacgcgc	1740
agcgttcaa agcccggaaa cggctgtttc cattccgcgc gcagttcata gcgtttgttg	1800

cgcagatcaa tccacgggcg gccgctatgg gtatgcgcat gcgcgttatc atcatcatga 1860
 aagccgcagc tcaggccccg gttatcataa tcaatatctt cttcggtcag cagatgcgga 1920
 tacagctgca gatagcggtt gttaatcagg cttttctgcc aaataatatc cgcattggcaa 1980
 tcatcatatt catggctatg cgccggcagg ccatactgat cgccggcgatc gctatacgcc 2040
 acgccaataa agcctttttc gccacccag ctacggccaa tgctgccggt ctggctatcc 2100
 gcatggctat ccggcaggcg ttctagggtt cgatagcgcg gcaccgcata atcgccgctt 2160
 ttgcgataca ggcccttcggt atgcagcaca aagtttttgc ccaggccaat gttaatgccg 2220

 ccgctggtea gtttttccag gttgccgctg ctacggcgca ggcccagttc gccgctcacg 2280
 ccgttttccg gcattttttc cggaattttg ccatccgcca catccaccag gcccgccacg 2340
 ttgccgctgc tatacagcag ggtcaccggg ccgcgcagaa ttccacctg ctggctcagc 2400
 gcggtatcca ccataatcgc atgatccggg ctaaaatccg ccataatgcc ggtttcgcca 2460
 tgatggttca gcactttaat gcggcgcccg gtctggccgc gaatcaccgg cgcgctcgcg 2520
 ccgccccat actggctcgc atgaatgcc ggccagccat ccagcgcatc gcccaggttc 2580
 accgctttct ggcgagggt atcgccgcta ataattttat cgctcgcggt gctggtatgc 2640

 agcaggccgc tggctcgcg cgggcggtt ttccccacca cgctcacggt ttccagatcc 2700
 acgctctgtt cggtttcatg ctcgaggcct ccaccgcctc cgcgtttate aatcgccacc 2760
 gccagcacca tatgtgcctt ggctttgacg tatcgcccag gcgcgggttc gattgcgcga 2820
 tagcgcgcat tgccatagtt ggccggcgcg gcgcgtttcg cgccggcctg cccggccagc 2880
 catgcggtcc agtccggcca ccagctgccg tgatgctcga tggcgccggc cagccattgc 2940
 tgcggcgact ccggcagcgc atcgttatg cagtggctgc gcttgttctt ggccggcggg 3000
 ttgatcacac cggcgatatg gcccgacgca ccagcacga agcgagctt gttcgccagc 3060

 agcgcggtcg aggcataagg cgcggtccac ggcacgatat ggtcttcgcg cgagccgtag 3120
 atataggtcg gcacgtcgat gctggccagg tcaccggca cgccgcacac ggtcagcttg 3180
 cccggtacct tgagctcgtt ctgcaggtag gtgtggcgca ggtaccagca gtaccacggc 3240
 cccggcagggt tggtagcgct gccgttccag aacagcagg cgaacggcac cggcgtgttg 3300
 cccttcagggt agttgtcgac cacgtagttc cacaccagg cgttcgggcg caagaacgag 3360
 aaggtattgg ccagctcaag gccgcgagc agcgcgacg gcgcgccggc gccgccgcc 3420
 agcgtggcct cgcgcaactg cacatggccc tcgtcgacaa agacgtcgag gatgcccggtg 3480

 tcggcaaagt ccagcagcgt ggtcagcagc gtgacgtgg cgccggggtg ctgcccgcg 3540
 gcggccagca ccgccagcg ggtcgagaca atggtgccg ccacgcagaa gccgagcacg 3600
 ttgatcttgt cctggccgct gatgtcgcg gcgacttca tggcgcggtt ggcccgctgc 3660

tcgatgtagt cgtcccaggt gctgccggcc atgctggcgt ccgatttgcg ccacgacacc	3720
agaaacaccg tatgtccctg tccaccaca tggcgacca gcgagctctc cggctgcagg	3780
tccaggatgt agtacttgtt gatgcacggc ggccacatca gcagcgggcg cgcgtgcacc	3840
ttgtcggta gcggcttgta ctgcaacagc tggaaagtact cgttctcgaa gaccacggcg	3900
ccttcggta ccgcgacatt gcggccgacc tcaaacgcgc tctcgtcggc ctgcgagatc	3960
ttgccgctg tcaggctctc catcatgttg cgcacgccgg cagcagcga ttgccgccc	4020
gactcgatca gcaggcgtg cgcctcggga ttggtggcaa ggaagtggc gggcgacatc	4080
gcatcgacc attgcgagat cgcgaagcgg atgcgctggc gggctctggc atcgccctcg	4140
acggcatcgg ccagctcggc caaggcgcgc gatttagca ggtagaacgc ggcagcgaag	4200
cgatatggga ggttggtgcg ccatgcgtcg ccggcgaagc gccggtcgtg cagcggaccg	4260
gtggcctcgg cttgccctc ggccatggcc tgccacagcg ctgagaagtc cttcatgtag	4320
cgctgctgga tatcaccag ctgcgccggc gcgatcttga cgcctgccag cgcattcagg	4380
cccggaatgc cggacgcggc cgcgtggcgg ttgccttcag tgccctgcca ctggcgggac	4440
cattccagcc atgtggctgg atcgaatggc ccggcgtga cttgaatgg ttgggacttg	4500
ccttctcgcg tggaaagctc cgcgcctttg ccggtcgac tagtaaatat atagttcacg	4560
cccagcgca catcgggcc cagcccgcc aggggtgttg tccagcgtg gctatcgga	4620
taataaaagg ttttaaacc gttgttcacg ctacaggtca cgttcagggt atctttgcc	4680
agcggtttcc agttcgaaa cacatcgtt acgcaaagc ctttcgcac cagttttcc	4740
aggttgccct ggcatcttt ctggccgcc accagaatgc tgcccaccgc tttctgcaca	4800
tagcgccgc gccagccaat ttccaggctt cgggttttta agcgatacgc caggctcgcg	4860
gtccaggtgc ggccacctg cgcgcaaat tccgggttcg cgtcagcag tttatcttta	4920
tgggtatcat aaaagcggg tttgtatgg ctacgcca ctttcgagg caggccgccc	4980
gtgcgatagc tcgcgccag ttcatagcca tggtttttaa tatagccgc gttaccgct	5040
tcgcgaccg ccacgtatc atggcggtt tcggggttcg ccagcgatc tttaatggtc	5100
tgcaaaaat agtgcggtt cgccgcaaag gtccatcgt tatagttaa gccaatttcg	5160
gtgttcgcg cgcgttcgc tttgttgcca tccgaatgc taataatgcc gcgtttgcca	5220
tgggtctgca gcgcatcata caggcgccgg ctgcggctcg catagttag gctcgcgcta	5280
aagctccaat attcatgcgg ctgccaatc acgcaaagc tcgggttcag gctgctgctg	5340
ctcacggtt tgccatcat ggttttact ttaaagcgat catagcgag gccgccggtc	5400
agggtaaag catcaatttc atgaatcgt tcaatatac gcgccgtatc ggttttggtc	5460
gggttggtca ggcgatacgc ttccacaatg tttcatcat cgcggtttt ctgttttcc	5520

gcctgggtcg cgccgctttt atctttaatt ttaaattcgc cgttcagaaa cgctgcggt 5580

ttaatttcct gatggcgata gttaatgcca tatttcagca gggctctgtc cgccaggcgg 5640

ctatcaaagt taaagttcgc gccatgggtg gtaatgcggg tatggttcgg gccttccacg 5700

ttgcccgcat agccgctgcc tttatcatcc gcgctatagc gtttttttc cagcacatac 5760

gcgttcgcat ccagtttttc cacaagccc aggtttttgc cggatatacg caggttggtg 5820

ttgctctggg tggtttcgag atacgccggc gcctggcggt ccatgctaag gcgttcttta 5880

tcgccgcca cggtlaattc ttcgcgcacg gtgcgaatgc cgcgatgctg atctttcata 5940

tggtcagca caatgcgatg atcgccatcg ccaaagctgg tgccaatttt cgccagatag 6000

ctgcgtttat ccagcgcgct atacggcacg gttttgccgc cgttaaagt gtgcgaaag 6060

cctttgcccg ctccataatc ttttctgtg ttgcggttat agctaaacag gccatcaaag 6120

ttgccttctt tgccaaacac gctcgcgcca tagctcacgc cttcgttctg cgcaaagccg 6180

ctgttcaggc gcacgcccc gtttttatcc aggcctttca gcagatcctg cgcattccacg 6240

gttttcgcaa taatcgcgcc gttggtcgcg ccaatgcccg cgctcgcgt gcccgcgct 6300

ttctgcacgc tcaccacttt caccagcgcc ggatccacaa taaagcgcc ctgatgatac 6360

agaatctggc tatcgtata cgcgttatcc actttaatat ccacgtgtt ctggcccatg 6420

ccgcgcaggg tcagaaactg gctggtgccg ttgccgccgc caaatcaat gctcggttct 6480

tccttcagca gttcgcgcat atcggtcgcg gtgctttcat ctttctgctg cagggtcaca 6540

atgttggtgc gaattttgct gccctggcga tcgcctttca cggtaatggt atccagcacc 6600

actttcgctg tgttttcgc cactactgga tctctatat tctagaggga aaccgttgtg 6660

gtctccctat agtgagtcgt attaatctcg cgggatcgag atctcgatcc tctacgccgg 6720

acgcacgtg gccggcatca ccggcgccac aggtgcgggt gctggcgct atatcgccga 6780

catcaccgat ggggaagatc gggctcgcca ctccgggctc atgagcgctt gtttcggcgt 6840

gggtatggtg gcaggccccg tggccggggg actgttgggc gccatctcct tgcattgcacc 6900

attccttgcg gcggcggtgc tcaacggcct caacctacta ctgggtgct tcctaattgca 6960

ggagtgcgat aaggagagc gtcgaccgat gcccttgaga gccttcaacc cagtacgctc 7020

cttcgggtgg gcgcggggca tgactatcgt cgccgcactt atgactgtct tctttatcat 7080

gcaactcgta ggacaggtc gcgcagcgt ctgggtcatt ttcggcgagg accgttttcg 7140

ctggagcgcg acgatgatcg gcctgtcgtg tgcggtatc ggaatcttgc acgccctcgc 7200

tcaagccttc gtcactggtc ccgccacaa acgtttcggc gagaagcagg ccattatcgc 7260

cgcatggcg gccgacgcg tgggtacgt cttgtggcg ttcgcgacgc gaggctggat	7320
ggccttcccc attatgattc ttctcgcttc cggcggcatc gggatgcccg cgttgcaggc	7380
catgctgtcc aggcaggtag atgacgacca tcaggacag cttcaaggat cgtcgcggc	7440
tcctaccagc ctaacttcga tcactggacc gctgatcgtc acggcgattt atgccgcctc	7500
ggcgagcaca tggaacgggt tggcatggat ttaggcgcc gccctatacc ttgtctgcct	7560
cccccggtt cgtcgggtg catggagccg ggccacctcg acctgaatgg aagccggcgg	7620
cacctcgcta acggattcac cactccaaga attggagcca atcaattctt gcggagaact	7680
gtgaatgcgc aaaccaaccc ttggcagaac atatccatcg cgtccgcat ctccagcagc	7740
cgcacgcggc gcatctcggg cagcgttggg tcttgccac gggcgcgat gatcgtgctc	7800
ctgtcgttga ggaccggct aggcctggcgg ggttgcctta ctggttagca gaatgaatca	7860
ccgatacgcg agcgaacgtg aagcgactgc tgcgcaaaa cgtctgcgac ctgagcaaca	7920
acatgaatgg tcttcggtt cctgttttcg taaagtctgg aaacgcggaa gtcagcggc	7980
tgcaccatta tgttcggat ctgcatcga ggatgctgct ggctaccctg tggaacacct	8040
acatctgtat taacgaagcg ctggcattga cctgagtga ttttctctg gtcccgcgc	8100
atccataccg ccagttgttt accctcaca cgttcagta accgggcatg ttcacatca	8160
gtaaccgta tcgtgagcat cctctctcgt ttcacggta tcattacccc catgaacaga	8220
aatccccctt acacggagcg atcagtgacc aaacaggaaa aaaccgcct taacatggcc	8280
cgtttatca gaagccagac attaacgtt ctggagaaac tcaacgagct ggacgcggat	8340
gaacaggcag acatctgtga atcgcttcac gaccacgtg atgagcttta ccgagctgc	8400
ctcgcgctt tcggtgatga cggtagaaa ccttgacaca tgcagctccc ggagacggtc	8460
acagcttgtc tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt	8520
gttggcgggt gtcggggcgc agccatgacc cagtcacgta gcgatagcgg agtgtatact	8580
ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcacatata tgcggtgtga	8640
aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgtcttccg cttctcgt	8700
cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc	8760
ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg	8820
ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg	8880
ccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg	8940
actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac	9000
cctgcgcgtt accggatacc tgctcgctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgttttctca	9060
tagctcacgc ttaggtatc tcagttcgtt gtaggtcgtt cgtccaagc tgggtgtgt	9120

gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 9180
caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 9240
agcaggtat gtagcggtg ctacagagtt ctgaagtgg tggcctaact acggctacac 9300
tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt 9360

tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa 9420
gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 9480
gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa 9540
aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat 9600
atatgagtaa acttggctcg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc 9660
gatctgtcta tttcgttcac ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat 9720
acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc 9780

ggctccagat ttatcagca taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgttcc 9840
tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag 9900
ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct gcaggcatcg tgggtgcacg 9960
ctcgtcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg 10020
atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctcttccggt cctccgatcg ttgtcagaag 10080
taagtggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt 10140
catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtagt tcaaccaagt cattctgaga 10200

atagtgtatg cggcgaccga gttgtctttg cccggcgta acacgggata ataccgcgcc 10260
acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc 10320
aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac ccaactgac 10380
ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc 10440
cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca 10500
atattattga agcatttacc aggggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat 10560
ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt 10620

ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt 10680
tcgtcttcaa gaa 10693

<210> 38
<211> 2029
<212> PRT
<213> Artificial

<220><223> fetA-PhaC-ZnuD fusion polypeptide encoded by

pET-14b-FetA-PhaC-ZnuD

<400> 38

Met Ala Glu Asn Asn Ala Lys Val Val Leu Asp Thr Ile Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly Asp Arg Gln Gly Ser Lys Ile Arg Thr Asn Ile Val Thr Leu Gln

20 25 30

Gln Lys Asp Glu Ser Thr Ala Thr Asp Met Arg Glu Leu Leu Lys Glu

35 40 45

Glu Pro Ser Ile Asp Phe Gly Gly Gly Asn Gly Thr Ser Gln Phe Leu

50 55 60

Thr Leu Arg Gly Met Gly Gln Asn Ser Val Asp Ile Lys Val Asp Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Pro Ala Leu Val Lys Val Val Ser Val Gln Lys Gly Ala Gly Ser

100 105 110

Ala Ser Ala Gly Ile Gly Ala Thr Asn Gly Ala Ile Ile Ala Lys Thr

115 120 125

Val Asp Ala Gln Asp Leu Leu Lys Gly Leu Asp Lys Asn Trp Gly Val

130 135 140

Arg Leu Asn Ser Gly Phe Ala Ser Asn Glu Gly Val Ser Tyr Gly Ala

145 150 155 160

Ser Val Phe Gly Lys Glu Gly Asn Phe Asp Gly Leu Phe Ser Tyr Asn

165 170 175

Arg Asn Asn Glu Lys Asp Tyr Glu Ala Gly Lys Gly Phe Arg Asn Asn

180 185 190

Phe Asn Gly Gly Lys Thr Val Pro Tyr Ser Ala Leu Asp Lys Arg Ser

195 200 205

Tyr Leu Ala Lys Ile Gly Thr Ser Phe Gly Asp Gly Asp His Arg Ile

210 215 220

Val Leu Ser His Met Lys Asp Gln His Arg Gly Ile Arg Thr Val Arg
225 230 235 240
Glu Glu Phe Thr Val Gly Gly Asp Lys Glu Arg Ile Ser Met Glu Arg
245 250 255
Gln Ala Pro Ala Tyr Arg Glu Thr Thr Gln Ser Asn Thr Asn Leu Ala
260 265 270
Tyr Thr Gly Lys Asn Leu Gly Phe Val Glu Lys Leu Asp Ala Asn Ala
275 280 285
Tyr Val Leu Glu Lys Lys Arg Tyr Ser Ala Asp Asp Lys Gly Ser Gly
290 295 300
Tyr Ala Gly Asn Val Glu Gly Pro Asn His Thr Arg Ile Thr Thr His
305 310 315 320
Gly Ala Asn Phe Asn Phe Asp Ser Arg Leu Ala Glu Gln Thr Leu Leu
325 330 335
Lys Tyr Gly Ile Asn Tyr Arg His Gln Glu Ile Lys Pro Gln Ala Phe
340 345 350
Leu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Lys Asp Lys Ser Gly Ala Thr Gln Ala
355 360 365
Glu Lys Gln Lys Asn Arg Asp Asp Glu Asn Ile Val Lys Ala Tyr Arg
370 375 380
Leu Thr Asn Pro Thr Lys Thr Asp Thr Gly Ala Tyr Ile Glu Ala Ile
385 390 395 400
His Glu Ile Asp Gly Phe Thr Leu Thr Gly Gly Leu Arg Tyr Asp Arg
405 410 415
Phe Lys Val Lys Thr His Asp Gly Lys Thr Val Ser Ser Ser Ser Leu
420 425 430
Asn Pro Ser Phe Gly Val Ile Trp Gln Pro His Glu Tyr Trp Ser Phe
435 440 445
Ser Ala Ser His Asn Tyr Ala Ser Arg Ser Pro Arg Leu Tyr Asp Ala
450 455 460
Leu Gln Thr His Gly Lys Arg Gly Ile Ile Ser Ile Ala Asp Gly Thr

465 470 475 480
 Lys Ala Glu Arg Ala Arg Asn Thr Glu Ile Gly Phe Asn Tyr Asn Asp
 485 490 495
 Gly Thr Phe Ala Ala Asn Gly Ser Tyr Phe Trp Gln Thr Ile Lys Asp
 500 505 510
 Ala Leu Ala Asn Pro Gln Asn Arg His Asp Ser Val Ala Val Arg Glu
 515 520 525
 Ala Val Asn Ala Gly Tyr Ile Lys Asn His Gly Tyr Glu Leu Gly Ala

 530 535 540
 Ser Tyr Arg Thr Gly Gly Leu Thr Ala Lys Val Gly Val Ser His Ser
 545 550 555 560
 Lys Pro Arg Phe Tyr Asp Thr His Lys Asp Lys Leu Leu Ser Ala Asn
 565 570 575
 Pro Glu Phe Gly Ala Gln Val Gly Arg Thr Trp Thr Ala Ser Leu Ala
 580 585 590
 Tyr Arg Phe Lys Asn Pro Asn Leu Glu Ile Gly Trp Arg Gly Arg Tyr

 595 600 605
 Val Gln Lys Ala Val Gly Ser Ile Leu Val Ala Gly Gln Lys Asp Arg
 610 615 620
 Gln Gly Asn Leu Glu Asn Val Val Arg Lys Gly Phe Gly Val Asn Asp
 625 630 635 640
 Val Phe Ala Asn Trp Lys Pro Leu Gly Lys Asp Thr Leu Asn Val Asn
 645 650 655
 Leu Ser Val Asn Asn Val Phe Asn Thr Phe Tyr Tyr Pro His Ser Gln

 660 665 670
 Arg Trp Thr Asn Thr Leu Pro Gly Val Gly Arg Asp Val Arg Leu Gly
 675 680 685
 Val Asn Tyr Lys Phe Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln
 690 695 700
 Glu Gly Lys Ser Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro
 705 710 715 720

Ala Thr Trp Leu Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn

725 730 735

Gly His Ala Ala Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly

740 745 750

Val Lys Ile Ala Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met

755 760 765

Lys Asp Phe Ser Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu

770 775 780

Ala Thr Gly Pro Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg

785 790 795 800

Thr Asn Leu Pro Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala

805 810 815

Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr

820 825 830

Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser

835 840 845

Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile

850 855 860

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

865 870 875 880

Asp Leu Thr Arg Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu

885 890 895

Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn

900 905 910

Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His

915 920 925

Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile

930 935 940

Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu Gln

945 950 955 960

Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met

965	970	975
Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala		
980	985	990
Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu		
995	1000	1005
Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val		
1010	1015	1020
Leu Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu		
1025	1030	1035
Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe		
1040	1045	1050
Val Asp Glu Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly		
1055	1060	1065
Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala		
1070	1075	1080
Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr		
1085	1090	1095
Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp		
1100	1105	1110
Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp		
1115	1120	1125
Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys		
1130	1135	1140
Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp Leu Ala		
1145	1150	1155
Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His		
1160	1165	1170
Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala		
1175	1180	1185
Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly		
1190	1195	1200

Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys	Asn Lys Arg Ser His	Trp Thr Asn
1205	1210	1215
Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro	Gln Gln Trp Leu Ala	Gly Ala Ile
1220	1225	1230
Glu His His Gly Ser Trp Trp	Pro Asp Trp Thr Ala	Trp Leu Ala
1235	1240	1245
Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg	Ala Ala Pro Ala Asn	Tyr Gly Asn
1250	1255	1260
Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu	Pro Ala Pro Gly Arg	Tyr Val Lys
1265	1270	1275
Ala Lys Ala Val Leu Ala Val	Ala Ile Asp Lys Arg	Gly Gly Gly
1280	1285	1290
Gly Gly His Glu Thr Glu Gln	Ser Val Asp Leu Glu	Thr Val Ser
1295	1300	1305
Val Val Gly Lys Ser Arg Pro	Arg Ala Thr Ser Gly	Leu Leu His
1310	1315	1320
Thr Ser Thr Ala Ser Asp Lys	Ile Ile Ser Gly Asp	Thr Leu Arg
1325	1330	1335
Gln Lys Ala Val Asn Leu Gly	Asp Ala Leu Asp Gly	Val Pro Gly
1340	1345	1350
Ile His Ala Ser Gln Tyr Gly	Gly Gly Ala Ser Ala	Pro Val Ile
1355	1360	1365
Arg Gly Gln Thr Gly Arg Arg	Ile Lys Val Leu Asn	His His Gly
1370	1375	1380
Glu Thr Gly Asp Met Ala Asp	Phe Ser Pro Asp His	Ala Ile Met
1385	1390	1395
Val Asp Thr Ala Leu Ser Gln	Gln Val Glu Ile Leu	Arg Gly Pro
1400	1405	1410
Val Thr Leu Leu Tyr Ser Ser	Gly Asn Val Ala Gly	Leu Val Asp
1415	1420	1425
Val Ala Asp Gly Lys Ile Pro	Glu Lys Met Pro Glu	Asn Gly Val

1430	1435	1440
Ser Gly Glu Leu Gly Leu Arg	Leu Ser Ser Gly Asn	Leu Glu Lys
1445	1450	1455
Leu Thr Ser Gly Gly Ile Asn	Ile Gly Leu Gly Lys	Asn Phe Val

1460	1465	1470
Leu His Thr Glu Gly Leu Tyr	Arg Lys Ser Gly Asp	Tyr Ala Val
1475	1480	1485
Pro Arg Tyr Arg Asn Leu Lys	Arg Leu Pro Asp Ser	His Ala Asp
1490	1495	1500
Ser Gln Thr Gly Ser Ile Gly	Leu Ser Trp Val Gly	Glu Lys Gly
1505	1510	1515
Phe Ile Gly Val Ala Tyr Ser	Asp Arg Arg Asp Gln	Tyr Gly Leu

1520	1525	1530
Pro Ala His Ser His Glu Tyr	Asp Asp Cys His Ala	Asp Ile Ile
1535	1540	1545
Trp Gln Lys Ser Leu Ile Asn	Lys Arg Tyr Leu Gln	Leu Tyr Pro
1550	1555	1560
His Leu Leu Thr Glu Glu Asp	Ile Asp Tyr Asp Asn	Pro Gly Leu
1565	1570	1575
Ser Cys Gly Phe His Asp Asp	Asp Asn Ala His Ala	His Thr His

1580	1585	1590
Ser Gly Arg Pro Trp Ile Asp	Leu Arg Asn Lys Arg	Tyr Glu Leu
1595	1600	1605
Arg Ala Glu Trp Lys Gln Pro	Phe Pro Gly Phe Glu	Ala Leu Arg
1610	1615	1620
Val His Leu Asn Arg Asn Asp	Tyr Arg His Asp Glu	Lys Ala Gly
1625	1630	1635
Asp Ala Val Glu Asn Phe Phe	Asn Asn Gln Thr Gln	Asn Ala Arg

1640	1645	1650
Ile Glu Leu Arg His Gln Pro	Ile Gly Arg Leu Lys	Gly Ser Trp
1655	1660	1665

Gly Val	Gln Tyr	Leu Gln Gln	Lys Ser	Ser Ala	Leu Ser	Ala Ile
1670		1675		1680		
Ser Glu	Ala Val	Lys Gln Pro	Met Leu	Leu Asp	Asn Lys	Val Gln
1685		1690		1695		
His Tyr	Ser Phe	Phe Gly Val	Glu Gln	Ala Asn	Trp Asp	Asn Phe
1700		1705		1710		
Thr Leu	Glu Gly	Gly Val Arg	Val Glu	Lys Gln	Lys Ala	Ser Ile
1715		1720		1725		
Gln Tyr	Asp Lys	Ala Leu Ile	Asp Arg	Glu Asn	Tyr Tyr	Asn His
1730		1735		1740		
Pro Leu	Pro Asp	Leu Gly Ala	His Arg	Gln Thr	Ala Arg	Ser Phe
1745		1750		1755		
Ala Leu	Ser Gly	Asn Trp Tyr	Phe Thr	Pro Gln	His Lys	Leu Ser
1760		1765		1770		
Leu Thr	Ala Ser	His Gln Glu	Arg Leu	Pro Ser	Thr Gln	Glu Leu
1775		1780		1785		
Tyr Ala	His Gly	Lys His Val	Ala Thr	Asn Thr	Phe Glu	Val Gly
1790		1795		1800		
Asn Lys	His Leu	Asn Lys Glu	Arg Ser	Asn Asn	Ile Glu	Leu Ala
1805		1810		1815		
Leu Gly	Tyr Glu	Gly Asp Arg	Trp Gln	Tyr Asn	Leu Ala	Leu Tyr
1820		1825		1830		
Arg Asn	Arg Phe	Gly Asn Tyr	Ile Tyr	Ala Gln	Thr Leu	Asn Asp
1835		1840		1845		
Gly Arg	Gly Pro	Lys Ser Ile	Glu Asp	Asp Ser	Glu Met	Lys Leu
1850		1855		1860		
Val Arg	Tyr Asn	Gln Ser Gly	Ala Asp	Phe Tyr	Gly Ala	Glu Gly
1865		1870		1875		
Glu Ile	Tyr Phe	Lys Pro Thr	Pro Arg	Tyr Arg	Ile Gly	Val Ser
1880		1885		1890		
Gly Asp	Tyr Val	Arg Gly Arg	Leu Lys	Asn Leu	Pro Ser	Leu Pro

1895 1900 1905
 Gly Arg Glu Asp Ala Tyr Gly Asn Arg Pro Phe Ile Ala Gln Asp
 1910 1915 1920
 Asp Gln Asn Ala Pro Arg Val Pro Ala Ala Arg Leu Gly Phe His
 1925 1930 1935
 Leu Lys Ala Ser Leu Thr Asp Arg Ile Asp Ala Asn Leu Asp Tyr

1940 1945 1950
 Tyr Arg Val Phe Ala Gln Asn Lys Leu Ala Arg Tyr Glu Thr Arg
 1955 1960 1965
 Thr Pro Gly His His Met Leu Asn Leu Gly Ala Asn Tyr Arg Arg
 1970 1975 1980
 Asn Thr Arg Tyr Gly Glu Trp Asn Trp Tyr Val Lys Ala Asp Asn
 1985 1990 1995
 Leu Leu Asn Gln Ser Val Tyr Ala His Ser Ser Phe Leu Ser Asp

2000 2005 2010
 Thr Pro Gln Met Gly Arg Ser Phe Thr Gly Gly Val Asn Val Lys
 2015 2020 2025
 Phe

<210> 39

<211> 8665

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct - pET-14b-PhaC-PA83

<400> 39

ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctatitttta taggttaatg tcatgataat	60
aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg	120
tttatitttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat	180
gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gattattcaa catttccgtg tcgcccttat	240
tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt	300
aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag	360
cggttaagatc cttgagagtt ttgcctccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa	420

agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tgttgacgcc gggcaagagc aactcggtcg 480
 ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct 540
 tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataaacac 600

 tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca 660
 caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat 720
 accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact 780
 attaaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc 840
 ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgtc ggcccttccg gctggctggg ttattgctga 900
 taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg 960
 taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg 1020

 aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca 1080
 agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta 1140
 ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt ttctgttcca 1200
 ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg 1260
 cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtgggtt gtttgccgga 1320
 tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agatacaaaa 1380
 tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcacgcgc 1440

 tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg 1500
 tcttaccggg ttggactcaa gacgatagt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac 1560
 ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct 1620
 acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgt tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc 1680
 ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cagcaggag cttccagggg gaaacgcctg 1740
 gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg 1800
 ctgctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct 1860

 ggcccttttg tggccttttg ctacatggt ctttctgcg ttatcccctg attctgtgga 1920
 taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctgc gcgagccgaa cgaccgagcg 1980
 cagcagtgca gtgagcgagg aagcgggaaga gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca 2040
 tctgtcgggt atttcacacc gcatatatgg tgcaactctca gtacaatctg ctctgatgcc 2100
 gcatagttaa gccagtatac actccgctat cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc 2160
 gacacccgcc aacaccgcgt gacgcgcct gacgggcttg tctgtcccg gcatccgctt 2220

acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgatcac 2280

cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga 2340

tgtctgcctg ttcatccgcg tccagctcgt tgagtttttc cagaagcgtt aatgtctggc 2400

ttctgataaa gcggggccatg ttaagggcgg ttttttctg tttggtcact gatgcctccg 2460

tgtaaagggg atttctgttc atgggggtaa tgataccgat gaaacgagag aggatgtcga 2520

cgatacgggt tactgatgat gaacatgcc ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaaac 2580

tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa aaatcactca gggccaatgc cagcgcttcg 2640

ttaatacaga ttaggtgtt ccacagggtg gccagcagca tctgcgatg cagatccgga 2700

acataatggt gcagggcgct gacttccgcg ttccagact ttacgaaaca cggaaaccga 2760

agaccattca tgttgttct caggctgcag acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc 2820

gctcgcgtat cgggtgattca ttctgctaac cagtaaggca accccgccag ctagccggg 2880

tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca cccgtggcca ggaccaacg ctgcccgaga 2940

tgcgccgct gcggctgctg gagatggcgg acgcgatgga tatgttctgc caagggttg 3000

tttgcgcatt cacagtctc cgcaagaatt gattggctcc aattcttgga gtggtgaatc 3060

cgttagcgag gtgcccgccg cttccattca ggtcgagggt gcccggtcc atgcaccgcg 3120

acgcaacgcg gggaggcaga caaggtatag ggcggcgcct acaatccatg ccaaccggtt 3180

ccatgtgctc gccgaggcgg cataaatcgc cgtgacgac agcggtcag tgatcgaagt 3240

taggctggta agagcccgca gcatccttg aagctgtccc tgatggtcgt catctacctg 3300

cctggacagc atggcctgca acgcgggcat cccgatgccg ccggaagcga gaagaatcat 3360

aatggggaag gccatccagc ctgcgtcgc gaacgccagc aagacgtagc ccagcgcgtc 3420

ggccgccatg ccggcgataa tggcctgctt ctgccgaaa cgtttggtgg cgggaccagt 3480

gacgaaggct tgagcgaggc cgtgcaagat tccgaatacc gcaagcgaca ggccgatcat 3540

cgtcgcgtc cagcgaaaag ggtcctcgcc gaaaatgacc cagagcgtg ccggcacctg 3600

tcctacgagt tgcatgataa agaagacagt cataagtgcg gcgacgatag tcatgccccg 3660

cgcccaccgg aaggagctga ctgggttgaa ggctctcaag ggcatcggtc gacgctctcc 3720

cttatgcgac tctgcatga ggaagcagcc cagtagtagg ttgaggccgt tgagcaccgc 3780

cgccgcaagg aatggtgat gcaaggagat ggcgcccaac agtcccccg ccacggggcc 3840

tgccaccata cccacgccga aacaagcgt catgagcccg aagtggcgag cccgatcttc 3900

cccatcggtg atgtcgcgca tataggcgcc agcaaccgca cctgtggcgc cgggtgatgcc 3960

ggccacgatg cgtccggcgt agaggatcga gatctcgatc ccgcgaaatt aatacgactc 4020
 actatagggg gaccacaacg gtttcctctt agaaataagg agatactagt atggcgaccg 4080
 gcaaaggcgc ggcagcttcc acgcaggaag gcaagtccca accattcaag gtcacgccgg 4140
 ggccattcga tccagccaca tggctggaat ggtcccgcca gtggcagggc actgaaggca 4200
 acggccacgc ggccgcgtcc ggcattccgg gcctggatgc gctggcaggc gtcaagatcg 4260
 cgccggcgca gctgggtgat atccagcagc gctacatgaa ggactttctca gcgctgtggc 4320
 aggccatggc cgagggcaag gccgaggcca ccggtccgct gcacgaccgg cgcttcgccg 4380

gcgacgcatg gcgcaccaac ctcccatatc gcttcgctgc cgcgttctac ctgctcaatg 4440
 cgcgcgcttt gaccgagctg gccgatgccg tcgaggccga tgccaagacc cgccagcgca 4500
 tccgcttcgc gatctcgaa tgggtcgatg cgatgtcgcc cgccaacttc cttgccacca 4560
 atcccaggcg gcagcgctg ctgatcgagt cgggcggcga atcgctgcgt gccggcgtgc 4620
 gcaacatgat ggaagacctg acacggcgca agatctcgca gaccgacgag agcgcgtttg 4680
 aggtcgcccg caatgtcgcg gtgaccgaag gcgccgtggt cttcgagaac gagtacttcc 4740
 agctgttgca gtacaagccg ctgaccgaca aggtgcacgc gcgcccgtg ctgatggtgc 4800

cgccgtgcat caacaagtac tacatcctgg acctgcagcc ggagagctcg ctggtgcgcc 4860
 atgtggtgga gcaggacat acggtgtttc tgggtgctg gcgcaatccg gacgccagca 4920
 tggccggcag cacctgggac gactacatcg agcacggcg catccgcgcc atcgaagtgc 4980
 cgcgcgacat cagcggccag gacaagatca acgtgctcgg cttctgctg ggcgccacca 5040
 ttgtctcgac cgcgctggcg gtgctggccg cgcgcgcgca gcacccggcc gccagcgta 5100
 cgctgctgac cagctgctg gactttgccg acacgggcat cctcgacgtc tttgtcgacg 5160
 agggccatgt gcagttgcgc gaggccacgc tggcgcgcg cgccggcgcg ccgtgcgcgc 5220

tgctgcgagg ccttgagctg gccataacct tctcgttctt gcgcccgaac gacctggtgt 5280
 ggaactacgt ggtcgacaac tacctgaagg gcaacacgcc ggtgccgttc gacctgctgt 5340
 tctggaacgg cgacgccacc aacctgccgg ggccgtggtg ctgctggtac ctgcgccaca 5400
 cctacctgca gaacgagctc aaggtaccgg gcaagctgac cgtgtgcggc gtgccggtgg 5460
 acctggccag catcgacgtg ccgacctata tctacgctc gcgcaagac catatcgtgc 5520
 cgtggaccgc ggcttatgcc tcgaccgcgc tgctggcgaa caagctgcgc ttcgtgctgg 5580
 gtgcgtcggg ccatatcgcc ggtgtgatca acccgccggc caagaacaag cgcagccact 5640

ggactaacga tgcgctgccg gagtgcggc agcaatggct ggccggcgcc atcgagcatc 5700
 acggcagctg gtggccggac tggaccgcat ggctggccgg gcaggccggc gcgaaacgcg 5760
 ccgcgcccgc caactatggc aatgcgcgt atcgcgcaat cgaacccgcg cctgggcgat 5820

acgtcaaagc caaggcacat atgggtgctgg cggtagcgat tgataaacgc ggaggcgggtg 5880
 gaggcctcga gatggatcgc atgaaacgcg gcctgtgctg cgtgctgctg ctgtgcggcg 5940
 cgggtgtttgt gagccccgagc gaagtgaac aggaaaaccg cctgctgaac gaaagcgaaa 6000
 gcagcagcca gggcctgctg ggctattatt ttagcgatct gaactttcag gcgccgatgg 6060

tggtgaccag cagcaccacc ggcgatctga gcattccgag cagcgaactg gaaaacattc 6120
 cgagcgaaaa ccagtatttt cagagcgcgga ttggagcggg ctttattaaa gtgaaaaaaa 6180
 gcgatgaata tacctttgcg accagcgcgga ataaccatgt gaccatgtgg gtggatgac 6240
 aggaagtgat taacaaagcg agcaacagca acaaaattcg cctggaaaaa ggccgcctgt 6300
 atcagattaa aattcagtat cagcgcgaaa acccgaccga aaaaggcctg gattttaaac 6360
 tgtattggac cgatagccag aacaaaaaag aagtgattag cagcgataac ctgcagctgc 6420
 cggaactgaa acagaaaagc agcaacacca gcgcggggccc gaccgtgccg gatcgcgata 6480

acgatggcat tccgcatagc ctggaagtgg aaggctatac cgtggatgtg aaaaacaaac 6540
 gcacctttct gagccccgtgg attagcaaca ttcattgaaaa aaaaggcctg accaaatata 6600
 aaagcagccc ggaaaaatgg agcaccgcga gcgatccgta tagcgatttt gaaaaagtga 6660
 ccggccgcat tgataaaaac gtgagccccg aagcgcgcca tccgtggtg gcggcgatc 6720
 cgattgtgca tgtggatatg gaaaacatta ttctgagcaa aaacgaagat cagagcacc 6780
 agaacaccga tagcgaaacc cgcaccatta gcaaaaacac cagcaccagc cgcaccata 6840
 ccagcgaagt gcatggcaac gcggaagtgc atgcgagctt ttttgataatt ggccgcagcg 6900

tgagcgcggg ctttagcaac agcaacagca gcaccgtggc gattgatcat agcctgagcc 6960
 tggcggcgga acgcacctgg gcggaacca tgggcctgaa caccgcggat accgcgcgcc 7020
 tgaacgcgaa cattcgctat gtgaacaccg gcaccgcgcc gatttataac gtgctgccga 7080
 ccaccagcct ggtgctgggc aaaaaccaga cctggcgac cattaaagcg aaagaaaacc 7140
 agctgagcca gattctggcg ccgaacaact attatccgag caaaaacctg gcgccgattg 7200
 cgctgaacgc gcaggatgat tttagcagca ccccgattac catgaactat aaccagtttc 7260
 tggaactgga aaaaacaaa cagctgcgcc tgataccga tcaggtgtat ggcaacattg 7320

cgacctataa ctttgaaaac ggccgcgtgc gcgtggatac cggcagcaac tggagcgaag 7380
 tgctgccga gattcaggaa accaccgcgc gcattatttt taacggcaaa gatctgaacc 7440
 tgggtgaacg ccgcattgcg gcggtgaacc cgagcgatcc gctggaaacc accaaaccgg 7500
 atatgacct gaaagaagcg ctgaaaattg cgtttgctt taacgaaccg aacggcaacc 7560
 tgcagtatca gggcaaagat attaccgaat ttgattttaa ctttgatcag cagaccagcc 7620
 agaacattaa aaaccagctg gcggaactga acgcgaccaa cattataacc gtgctggata 7680

aaattaaact gaacgcgaaa atgaacattc tgattcgca taaacgcttt cattatgatc 7740

gcaacaacat tgcggtgggc gcgcatgaaa gcgtggtgaa agaagcgcac cgcaagtga 7800

ttaacagcag caccgaaggc ctgctgctga acattgataa agatattcgc aaaattctga 7860

gcggctatat tgtggaaatt gaagataccg aaggcctgaa agaagtgatt aacgatcgct 7920

atgatatgct gaacattagc agcctgcgcc aggatggcaa aacctttatt gattttaaaa 7980

aatataacga taaactgccg ctgtatatta gcaaccgaa ctataaagtg aacgtgtatg 8040

cggtagacaa agaaaacacc attattaacc cgagcgaaaa cggcgatacc agcaccaacg 8100

gcattaaaaa aattctgatt tttagcaaaa aaggctatga aattggctga ggatccggct 8160

gctaacaaag cccgaaagga agctgagttg gctgctgcca ccgctgagca ataactagca 8220

taacccttg gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgctgaaagg aggaactata 8280

tccggatata cacaggacgg gtgtggtcgc catgatcgcg tagtcgatag tggctccaag 8340

tagcgaagcg agcaggactg ggcgcgccgc aaagcggtcg gacagtgtct cgagaacggg 8400

tgcgcataga aattgcatca acgcatatag cgctagcagc acgcatagt gactggcgat 8460

gtgtcgga tggacgatc cccgcaagag gcccggcagt accggcataa ccaagcctat 8520

gcctacagca tccaggggta cggtgccgag gatgacgatg agcgattgt tagatttcat 8580

acacggtgcc tgactgcgtt agcaatttaa ctgtgataaa ctaccgcatt aaagcttata 8640

gatgataagc tgcataacat gagaa 8665

<210> 40

<211> 1359

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> PhaC-PA83 fusion polypeptide encoded by pET-14b-PhaC-PA83

<400> 40

Met Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser

1 5 10 15

Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu

20 25 30

Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala

35 40 45

Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala

50 55 60

Pro	Ala	Gln	Leu	Gly	Asp	Ile	Gln	Gln	Arg	Tyr	Met	Lys	Asp	Phe	Ser
65			70			75			80						
Ala	Leu	Trp	Gln	Ala	Met	Ala	Glu	Gly	Lys	Ala	Glu	Ala	Thr	Gly	Pro
85			90			95									
Leu	His	Asp	Arg	Arg	Phe	Ala	Gly	Asp	Ala	Trp	Arg	Thr	Asn	Leu	Pro
100			105			110									
Tyr	Arg	Phe	Ala	Ala	Ala	Phe	Tyr	Leu	Leu	Asn	Ala	Arg	Ala	Leu	Thr
115			120			125									
Glu	Leu	Ala	Asp	Ala	Val	Glu	Ala	Asp	Ala	Lys	Thr	Arg	Gln	Arg	Ile
130			135			140									
Arg	Phe	Ala	Ile	Ser	Gln	Trp	Val	Asp	Ala	Met	Ser	Pro	Ala	Asn	Phe
145			150			155			160						
Leu	Ala	Thr	Asn	Pro	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	Leu	Ile	Glu	Ser	Gly	Gly
165			170			175									
Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Gly	Val	Arg	Asn	Met	Met	Glu	Asp	Leu	Thr	Arg
180			185			190									
Gly	Lys	Ile	Ser	Gln	Thr	Asp	Glu	Ser	Ala	Phe	Glu	Val	Gly	Arg	Asn
195			200			205									
Val	Ala	Val	Thr	Glu	Gly	Ala	Val	Val	Phe	Glu	Asn	Glu	Tyr	Phe	Gln
210			215			220									
Leu	Leu	Gln	Tyr	Lys	Pro	Leu	Thr	Asp	Lys	Val	His	Ala	Arg	Pro	Leu
225			230			235			240						
Leu	Met	Val	Pro	Pro	Cys	Ile	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Asp	Leu	Gln
245			250			255									
Pro	Glu	Ser	Ser	Leu	Val	Arg	His	Val	Val	Glu	Gln	Gly	His	Thr	Val
260			265			270									
Phe	Leu	Val	Ser	Trp	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Ser	Met	Ala	Gly	Ser	Thr
275			280			285									
Trp	Asp	Asp	Tyr	Ile	Glu	His	Ala	Ala	Ile	Arg	Ala	Ile	Glu	Val	Ala
290			295			300									
Arg	Asp	Ile	Ser	Gly	Gln	Asp	Lys	Ile	Asn	Val	Leu	Gly	Phe	Cys	Val

305 310 315 320
 Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly
 325 330 335
 Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe
 340 345 350

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

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

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

 Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala Gly Gln Ala Gly
 545 550 555 560

Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala
565 570 575

Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala His Met Val
580 585 590

Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg Gly Gly Gly Gly Gly Leu Glu Met
595 600 605

Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly Ala
610 615 620

Val Phe Val Ser Pro Ser Glu Val Lys Gln Glu Asn Arg Leu Leu Asn
625 630 635 640

Glu Ser Glu Ser Ser Ser Gln Gly Leu Leu Gly Tyr Tyr Phe Ser Asp
645 650 655

Leu Asn Phe Gln Ala Pro Met Val Val Thr Ser Ser Thr Thr Gly Asp
660 665 670

Leu Ser Ile Pro Ser Ser Glu Leu Glu Asn Ile Pro Ser Glu Asn Gln
675 680 685

Tyr Phe Gln Ser Ala Ile Trp Ser Gly Phe Ile Lys Val Lys Lys Ser
690 695 700

Asp Glu Tyr Thr Phe Ala Thr Ser Ala Asp Asn His Val Thr Met Trp
705 710 715 720

Val Asp Asp Gln Glu Val Ile Asn Lys Ala Ser Asn Ser Asn Lys Ile
725 730 735

Arg Leu Glu Lys Gly Arg Leu Tyr Gln Ile Lys Ile Gln Tyr Gln Arg
740 745 750

Glu Asn Pro Thr Glu Lys Gly Leu Asp Phe Lys Leu Tyr Trp Thr Asp
755 760 765

Ser Gln Asn Lys Lys Glu Val Ile Ser Ser Asp Asn Leu Gln Leu Pro
770 775 780

Glu Leu Lys Gln Lys Ser Ser Asn Thr Ser Ala Gly Pro Thr Val Pro
785 790 795 800

Asp Arg Asp Asn Asp Gly Ile Pro Asp Ser Leu Glu Val Glu Gly Tyr

805 810 815
 Thr Val Asp Val Lys Asn Lys Arg Thr Phe Leu Ser Pro Trp Ile Ser
 820 825 830
 Asn Ile His Glu Lys Lys Gly Leu Thr Lys Tyr Lys Ser Ser Pro Glu
 835 840 845
 Lys Trp Ser Thr Ala Ser Asp Pro Tyr Ser Asp Phe Glu Lys Val Thr
 850 855 860

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

Gly Asn Ala Glu Val His Ala Ser Phe Phe Asp Ile Gly Gly Ser Val
 930 935 940
 Ser Ala Gly Phe Ser Asn Ser Asn Ser Ser Thr Val Ala Ile Asp His
 945 950 955 960
 Ser Leu Ser Leu Ala Gly Glu Arg Thr Trp Ala Glu Thr Met Gly Leu
 965 970 975
 Asn Thr Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asn Ala Asn Ile Arg Tyr Val Asn
 980 985 990

Thr Gly Thr Ala Pro Ile Tyr Asn Val Leu Pro Thr Thr Ser Leu Val
 995 1000 1005
 Leu Gly Lys Asn Gln Thr Leu Ala Thr Ile Lys Ala Lys Glu Asn
 1010 1015 1020
 Gln Leu Ser Gln Ile Leu Ala Pro Asn Asn Tyr Tyr Pro Ser Lys
 1025 1030 1035
 Asn Leu Ala Pro Ile Ala Leu Asn Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ser
 1040 1045 1050

Thr Pro	Ile Thr	Met Asn	Tyr Asn	Gln Phe	Leu Glu	Leu Glu	Lys
1055			1060			1065	
Thr Lys	Gln Leu	Arg Leu	Asp Thr	Asp Gln	Val Tyr	Gly Asn	Ile
1070			1075			1080	
Ala Thr	Tyr Asn	Phe Glu	Asn Gly	Arg Val	Arg Val	Asp Thr	Gly
1085			1090			1095	
Ser Asn	Trp Ser	Glu Val	Leu Pro	Gln Ile	Gln Glu	Thr Thr	Ala
1100			1105			1110	
Arg Ile	Ile Phe	Asn Gly	Lys Asp	Leu Asn	Leu Val	Glu Arg	Arg
1115			1120			1125	
Ile Ala	Ala Val	Asn Pro	Ser Asp	Pro Leu	Glu Thr	Thr Lys	Pro
1130			1135			1140	
Asp Met	Thr Leu	Lys Glu	Ala Leu	Lys Ile	Ala Phe	Gly Phe	Asn
1145			1150			1155	
Glu Pro	Asn Gly	Asn Leu	Gln Tyr	Gln Gly	Lys Asp	Ile Thr	Glu
1160			1165			1170	
Phe Asp	Phe Asn	Phe Asp	Gln Gln	Thr Ser	Gln Asn	Ile Lys	Asn
1175			1180			1185	
Gln Leu	Ala Glu	Leu Asn	Ala Thr	Asn Ile	Tyr Thr	Val Leu	Asp
1190			1195			1200	
Lys Ile	Lys Leu	Asn Ala	Lys Met	Asn Ile	Leu Ile	Arg Asp	Lys
1205			1210			1215	
Arg Phe	His Tyr	Asp Arg	Asn Asn	Ile Ala	Val Gly	Ala Asp	Glu
1220			1225			1230	
Ser Val	Val Lys	Glu Ala	His Arg	Glu Val	Ile Asn	Ser Ser	Thr
1235			1240			1245	
Glu Gly	Leu Leu	Leu Asn	Ile Asp	Lys Asp	Ile Arg	Lys Ile	Leu
1250			1255			1260	
Ser Gly	Tyr Ile	Val Glu	Ile Glu	Asp Thr	Glu Gly	Leu Lys	Glu
1265			1270			1275	
Val Ile	Asn Asp	Arg Tyr	Asp Met	Leu Asn	Ile Ser	Ser Leu	Arg

1280	1285	1290	
Gln Asp Gly Lys Thr Phe Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys			
1295	1300	1305	
Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr			
1310	1315	1320	
Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly			
1325	1330	1335	
Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys Ile Leu Ile Phe Ser Lys			
1340	1345	1350	
Lys Gly Tyr Glu Ile Gly			
1355			
<210> 41			
<211> 8122			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220><223> Synthetic construct - pET-14b-E1-PhaC-M1			
<400> 41			
ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctatitttta taggttaatg tcatgataat	60		
aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg	120		
tttatitttc taaatacatt caaatatgia tccgctcatg agacaataac cctgataaat	180		
gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat	240		
tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt	300		
aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag	360		
cggtgaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa	420		
agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tgttgacgcc gggcaagagc aactcggtcg	480		
ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct	540		
tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac	600		
tgcgccaac ttactttcga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca	660		
caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat	720		
accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact	780		
attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc	840		

ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt ttattgctga	900
taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggatatcatt gcagcactgg ggccagatgg	960
taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg	1020
aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca	1080
agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta	1140
ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt ttctgttcca	1200
ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg	1260
cgtaatctgc tgcctgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga	1320
tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa	1380
tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc	1440
tacatacctc gctctgctaa tctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg	1500
tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac	1560
gggggggttcg tgcacacagc ccagcttga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct	1620
acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgt tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc	1680
ggtaaagcgc agggctcgaa caggagagcg cagcagggag cttccagggg gaaacgcctg	1740
gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg	1800
ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct	1860
ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttctgcg ttatcccctg attctgtgga	1920
taaccgtatt accgccttgg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg	1980
cagcagtgca gtgagcgagg aagcgggaaga gcgcctgatg cggtatattc tccttacgca	2040
tctgtgcggt atttcacacc gcatatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc	2100
gcatagttaa gccagtatac actccgctat cgtacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc	2160
gacacccgcc aacacccgct gacgcgcctt gacgggcttg tctgctccc gcatccgctt	2220
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac	2280
cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga	2340
tgtctgcctg ttcacccgcg tccagctcgt tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc	2400
ttctgataaa gcgggcatg ttaaggcggt ttttttctg tttggtcact gatgcctccg	2460
tgtaggggg atttctgttc atgggggtta tgataccgat gaaacgagag aggatgctca	2520
cgatacgggt tactgatgat gaacatgcc ggttactgga acgttgtgag ggtaaacac	2580
tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa aaatcactca gggccaatgc cagcgcttcg	2640
ttaatacaga tglaggtgtt ccacagggtt gccagcagca tctcgcatg cagatccgga	2700

acataatggt gcagggcgct gacttccgctg ttccagact ttacgaaaca cggaaaccga	2760
agaccattca tgttgttgct caggtcgcag acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc	2820
gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac cagtaaggca accccgccag cctagccggg	2880
tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca cccgtggcca ggaccaacg ctgcccgaga	2940
tgcgccgctg gcggctgctg gagatggcgg acgcgatgga tatgttctgc caagggttgg	3000
tttgcgcatt cacagtcttc cgcaagaatt gattggctcc aattcttgga gtggtgaatc	3060
cgttagcgag gtgccgccgg cttccattca ggtcgagggtg gcccggctcc atgcaccgcg	3120
acgcaacgcg gggaggcaga caaggtatag ggcggcgcct acaatccatg ccaaccggtt	3180
ccatgtgctc gccgaggcgg cataaatcgc cgtgacgac agcggtccag tgatcgaagt	3240
taggctggta agagccgcga gcgatccttg aagctgtccc tgatggctgt catctacctg	3300
cctggacagc atggcctgca acgcgggcat cccgatgccg ccggaagcga gaagaatcat	3360
aatggggaag gccatccagc ctgcgctgc gaacgccagc aagacgtagc ccagcgcgtc	3420
ggccgccatg ccggcgataa tggcctgctt ctgccgaaa cgtttggtgg cgggaccagt	3480
gacgaaggct tgagcgaggg cgtgcaagat tccgaatacc gcaagcgaca ggccgatcat	3540
cgtcgcgtc cagcgaaagc ggtcctcgcc gaaaatgacc cagagcgtg cgggcacctg	3600
tcctacgagt tgcatgataa agaagacagt cataagtgcg gcgacgatag tcatgccccg	3660
cgcccaccgg aaggagctga ctgggttgaa ggctctcaag ggcatcggtc gacgctctcc	3720
cttatgcgac tcctgcatta ggaagcagcc cagtagtagg ttgaggccgt tgagcaccgc	3780
cgccgaagg aatggtgcat gcaaggagat ggcgccaac agtccccgg ccacggggcc	3840
tgccaccata cccacgccga aacaagcgt catgagcccg aagtggcgag cccgatcttc	3900
cccatcggtg atgtcgcgca tataggcgcc agcaaccgca cctgtggcgc cggatgatgcc	3960
ggccacgatg cgtccggcgt agaggatcga gatctcgatc ccgcgaaatt aatacgactc	4020
actataggga gaccacaacg gtttcctctc agaatatagg agataccagt atgcgtgcg	4080
tgggcattgg caaccgcgat tttgtggaag gcctgagcgg cgcgacctgg gtggatgtgg	4140
tgctggaaca tggcagctgc gtgaccacca tggcgaaaga taaaccgacc ctggatattg	4200
aactgctgaa aaccgaagtg accaaccggg cggctgctgc caaactgtgc attgaagcga	4260
aaattagcaa caccaccacc gatagccgct gcccgacca gggcgaagcg accctggtgg	4320
aagaacagga taccaacttt gtgtgccgcc gcacctttgt ggatcgcggc tggggcaacg	4380
gctgcggcct gtttggcaaa ggcagcctga ttacctgcgc gaaatttaaa tgcgtgacca	4440

aactggaagg caaaattgtg cagtatgaaa acctgaaata tagcgtgatt gtgaccgtgc 4500

ataccggcga tcagcatcag gtgggcaacg aaaccaccga acatggcacc accgcgacca 4560

ttaccccga ggcgcgcgacc agcgaattc agctgaccga ttatggcgcg ctgaccctgg 4620

attgcagccc gcgcaccggc ctggatttta acgaaatggt gctgctgacc atgaaaaaa 4680

aaagctggct ggtgcataaa cagtggtttc tggatctgcc gctgccgtgg accagcggcg 4740

cgagcaccag ccaggaaacc tggaaccgcc aggatctgct ggtgaccttt aaaaccgcgc 4800

atgcgaaaa acaggaagtg gtggtgctgg gcagccagga aggcgcgatg cataccgcgc 4860

tgaccggcgc gaccgaaatt cagaccagcg gcaccaccac cttttttgcg ggccatctga 4920

aatgccgcct gaaaatggat aaactgattc tgaaaggcat gagctatgtg atgtgcaccg 4980

gcagctttaa actggaaaaa gaagtggcgg aaaccagca tggcaccgtg ctggtgcagg 5040

tgaaatatga aggcaccgat gcgcctgtca aaattccgtt tagcagccag gatgaaaaag 5100

gcgtgaccca gaacggcgcg ctgattaccg cgaaccgat tgtgaccgat aaagaaaaac 5160

cggatgaacat tgaagcgga cgcctgtttg gcgaaagcta tattgtggtg ggcgcgggcg 5220

aaaaagcgt gaaactgagc tggtttaaaa aaggcagcag cattggcaaa atgtttgaag 5280

cgaccgcgcg cggcgcgcgc cgcatggcga ttctgggcga taccgcgtgg gattttggca 5340

gcattggcgg cgtgtttacc agcgtgggca aactgattca tcagattttt ggcaccgcgt 5400

atggcgtgct gtttagcggc gtgagctgga ccatgaaaat tggcattggc attctgctga 5460

cctggctggg cctgaacagc cgcagcacca gcctgagcat gacctgcatt gcggtgggca 5520

tggtgacct gtatctgggc gtgatggtgc aggcgactag tgcgaccggc aaaggcgcgg 5580

cagcttcac gcaggaaggc aagtcccaac cattcaaggt cacgccgggg ccattcgatc 5640

cagccacatg gctggaatgg tcccgccagt ggcagggcac tgaaggcaac ggccacgcgg 5700

ccgcgtccgg cattccgggc ctggatgcgc tggcaggcgt caagatcgcg ccggcgcagc 5760

tgggtgatat ccagcagcg tacatgaagg acttctcagc gctgtggcag gccatggccg 5820

agggcaaggc cgaggccacc ggtccgctgc acgaccggcg cttcgccggc gacgcatggc 5880

gcaccaacct cccatatcgc ttcgctgccg cgttctacct gctcaatgcg cgcgccttga 5940

ccgagctggc cgatgccgtc gaggccgatg ccaagaccg ccagcgcac cgcttcgcga 6000

tctcgcaatg ggtcgatgcg atgtcgcccg ccaacttct tggccaccaat cccgaggcgc 6060

agcgcctgct gatcgatgcg ggcggcgaat cgctgcgtgc cggcgtgcgc aacatgatgg 6120

aagacctgac acgcggcaag atctcgaga ccgacgagag cgcgtttgag gtcggccgca 6180

atgtcgcggt gaccgaaggc gccgtgggtct tcgagaacga gtacttccag ctgttgcagt	6240
acaagccgct gaccgacaag gtgcacgcgc gcccgctgct gatggtgccg ccgtgcatca	6300
acaagtacta catcctggac ctgcagccgg agagctcgct ggtgcgccat gtggtggagc	6360
agggacatac ggigtctctg gtgtcgtggc gcaatccgga cgccagcatg gccggcagca	6420
cctgggacga ctacatcgag cacgcggcca tccgcgccat cgaagtgcgc cgcgacatca	6480
gcggccagga caagatcaac gtgctcggct tctgcgtggg cggcaccatt gtctcgaccg	6540
cgctggcgggt gctggccgcg cgcggcgagc acccggccgc cagcgtcacg ctgctgacca	6600
cgctgctgga ctttgccgac acgggcatcc tcgacgtctt tgtcgacgag ggccatgtgc	6660
agttgcgcga ggccacgctg ggccggcgcg ccggcgcgcc gtgcgcgctg ctgcgcggcc	6720
ttgagctggc caataccttc tcgttcttgc gcccgaaacga cctggtgtgg aactacgtgg	6780
tcgacaacta cctgaagggc aacacgccgg tgcggttcga cctgctgttc tggaaaggcg	6840
acgccaccaa cctgccgggg ccgtgggtact gctgggtacct gcgccacacc tacctgcaga	6900
acgagctcaa ggtaccgggc aagctgaccg tgtgcggcgt gccggtggac ctggccagca	6960
tcgacgtgcc gacctatata tacggctcgc gcgaagacca tatcgtgccg tggaccgcgg	7020
cctatgcctc gaccgcgctg ctggcgaaca agctgcgctt cgtgctgggt gcgtcgggcc	7080
atatcgccgg tgtgatcaac ccgccggcca agaacaagcg cagccactgg actaacgatg	7140
cgctgccgga gtcgccgcag caatggctgg ccggcgccat cgagcatcac ggcagctggt	7200
ggccggactg gaccgatgg ctggccgggc aggccggcg gaaacgcgc gcccccga	7260
actatggcaa tgcgcgctat cgcgcaatcg aaccgcgc tgggcgatac gtcaaagcca	7320
aggcacatat ggtgctggcg gtggcgattg ataaacgcgg aggcggtgga ggcctcgaga	7380
gcgtggcgct ggccgccat gtgggcctgg gcctggaaac ccgcaccgaa acctggatga	7440
gcagcgaagg cgctggaaa cagattcaga aagtggaaac ctggcgctg cgccatccgg	7500
gctttaccgt gattgcgctg tttctggcgc atgcgattgg caccagcatt acccagaaag	7560
gcattatttt tattctgctg atgctggtga ccccgagcat ggcgtaagga tccggtgct	7620
aacaaagccc gaaaggaagc tgagtggct gctgccaccg ctgagcaata actagcataa	7680
ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg ggttttttgc tgaaaggagg aactatatcc	7740
ggatatccac aggacgggtg tggtcgccat gatcgctag tcgatagtgg ctccaagtag	7800
cgaagcgagc aggactgggc ggccggccaaa gcggtcggac agtgcctcga gaacgggtgc	7860
gcatagaaat tgcataacg catatagcgc tagcagcacg ccatagtac tggcgatgct	7920
gtcggaatgg acgatatccc gcaagaggcc cggcagtagc ggcataacca agcctatgcc	7980
tacagcatcc agggtagcgg tgccaggat gacgatgagc gcattgttag atttcataca	8040

cggtgcctga ctgcgttagc aatttaactg tgataaacta ccgcattaaa gcttatcgat 8100
gataagctgt caaacatgag aa 8122

<210> 42
<211> 1178
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> E1-PhaC-M1 fusion polypeptide encoded by pET-14b-E1-PhaC-M1

<400> 42

Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser
1 5 10 15
Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr
20 25 30
Thr Met Ala Lys Asp Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr
35 40 45
Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys
50 55 60

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

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

180	185	190	
Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr Met Lys Lys Lys Ser Trp Leu Val			
195	200	205	
His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala			
210	215	220	
Ser Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn Arg Gln Asp Leu Leu Val Thr Phe			
225	230	235	240
Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln			
245	250	255	
Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr			
260	265	270	
Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys			
275	280	285	
Met Asp Lys Leu Ile Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly			
290	295	300	
Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val			
305	310	315	320
Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro			
325	330	335	
Phe Ser Ser Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile			
340	345	350	
Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu			
355	360	365	
Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu			
370	375	380	
Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys			
385	390	395	400
Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly			
405	410	415	
Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Thr Ser Val			
420	425	430	

Gly Lys Leu Ile His Gln Ile Phe Gly Thr Ala Tyr Gly Val Leu Phe
435 440 445

Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys Ile Gly Ile Gly Ile Leu Leu Thr
450 455 460

Trp Leu Gly Leu Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Met Thr Cys Ile
465 470 475 480

Ala Val Gly Met Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala Thr
485 490 495

Ser Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser
500 505 510

Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu
515 520 525

Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala
530 535 540

Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala
545 550 555 560

Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser
565 570 575

Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro
580 585 590

Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro
595 600 605

Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr
610 615 620

Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile
625 630 635 640

Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe
645 650 655

Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly
660 665 670

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

675 680 685
 Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn
 690 695 700

 Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln
 705 710 715 720
 Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu
 725 730 735
 Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln
 740 745 750
 Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val
 755 760 765

 Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr
 770 775 780
 Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala
 785 790 795 800
 Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val
 805 810 815
 Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly
 820 825 830

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

 Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr
 900 905 910
 Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu
 915 920 925

Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn
930 935 940

Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp
945 950 955 960

Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp
965 970 975

His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala
980 985 990

Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val
995 1000 1005

Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp
1010 1015 1020

Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu
1025 1030 1035

His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala Gly
1040 1045 1050

Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala
1055 1060 1065

Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala
1070 1075 1080

Lys Ala His Met Val Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg Gly Gly
1085 1090 1095

Gly Gly Gly Leu Glu Ser Val Ala Leu Ala Pro His Val Gly Leu
1100 1105 1110

Gly Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala
1115 1120 1125

Trp Lys Gln Ile Gln Lys Val Glu Thr Trp Ala Leu Arg His Pro
1130 1135 1140

Gly Phe Thr Val Ile Ala Leu Phe Leu Ala His Ala Ile Gly Thr
1145 1150 1155

Ser Ile Thr Gln Lys Gly Ile Ile Phe Ile Leu Leu Met Leu Val

1160
Thr Pro Ser Met Ala
1175
<210> 43
<211> 8122
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Synthetic construct - pET-14b-E2-PhaC-M2
<400> 43

ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctatittta taggttaatg tcatgataat 60
aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg 120

tttatttttc taaatacatt caaatatgia tccgctcatg agacaataac cctgataaat 180
gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gattattcaa catttccgtg tcgcccttat 240
tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt 300
aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag 360
cggtaagatc cttgagagtt ttgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa 420
agttctgcta tgtggcgcggt tattatcccg tgttgacgcc gggcaagagc aactcggtcg 480
ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct 540

tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataaac 600
tgcggccaac ttactttctg caacgatcgg aggaccgaag gagtaaccg cttttttgca 660
caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat 720
accaaagac gagcgtgaca ccacgatgcc tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact 780
attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc 840
ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgtc ggcccttcg gctggctggt ttattgctga 900
taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cgtatcatt gcagcactgg ggccagatgg 960

taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg 1020
aaatagacag atcgtctaga taggtgcctc actgattaag catttgtaac tgtcagacca 1080
agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta 1140
ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca 1200
ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg 1260
cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga 1320

tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa	1380
tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc	1440
tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg	1500
tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggc cgggctgaac	1560
gggggggttcg tgcacacagc ccagcttga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct	1620
acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggatcc	1680
ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cagcaggag cttccagggg gaaacgcctg	1740
gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg	1800
ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct	1860
ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttctgcg ttatcccctg attctgtgga	1920
taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctgc gcgagccgaa cgaccgagcg	1980
cagcagtgca gtgagcagg aagcggaga gcgcctgatg cggatatttc tccttacgca	2040
tctgtcgggt atttcacacc gcatatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc	2100
gcatagttaa gccagtatac actccgctat cgtacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc	2160
gacacccgcc aacacccgct gacgcgcct gacgggcttg tctgctccc gcatccgctt	2220
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac	2280
cgaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga	2340
tgtctgcctg ttcatccgcg tccagctcgt tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc	2400
ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg ttttttctg tttggctact gatgcctccg	2460
tgttaaggggg atttctgttc atgggggtaa tgataccgat gaaacgagag aggatgtcga	2520
cgatacgggt tactgatgat gaacatgcc ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac	2580
tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa aaatcactca gggccaatgc cagcgttcg	2640
ttaatacaga ttaggtgtt ccacagggtg gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga	2700
acataatggt gcagggcgct gacttccgcg ttccagact ttacgaaaca cggaaaccga	2760
agaccattca tgttgttgct caggctgcag acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc	2820
gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac cagtaaggca accccgccag cctagccggg	2880
tcctcaacga caggagcagc atcatgcgca cccgtggcca ggacccaacg ctgcccgaga	2940
tgcgcccggt gcggctgctg gagatggcgg acgcgatgga tatgttctgc caagggttgg	3000
tttgcgcatt cacagttctc cgcaagaatt gattggctcc aattcttgga gtggtgaatc	3060

cgtttagcgag gtgccgccgg cttccattca ggtcgagggtg gcccggctcc atgcaccgcg	3120
acgcaacgcg gggaggcaga caaggtatag ggcggcgcct acaatccatg ccaaccctt	3180
ccatgtgctc gccgaggcgg cataaatcgc cgtgacgac agcggtccag tgatcgaagt	3240
taggctggta agagccgcga gcgatccttg aagctgtccc tgatggctcgt catctacctg	3300
cctggacagc atggcctgca acgcgggcat cccgatgccg ccggaagcga gaagaatcat	3360
aatggggaag gccatccagc ctgcgctgc gaacgccagc aagacgtagc ccagcgcgtc	3420
ggccgccatg ccggcgataa tggcctgctt ctgcgcgaaa cgtttggtgg cgggaccagt	3480
gacgaaggct tgagcgaggg cgtgcaagat tccgaatacc gcaagcgaca ggccgatcat	3540
cgtcgcgctc cagcgaaagc ggtcctcgcc gaaaatgacc cagagcgctg ccggcacctg	3600
tcctacgagt tgcatgataa agaagacagt cataagtgcg gcgacgatag tcatgccccg	3660
cgcccaccgg aaggagctga ctgggttgaa ggctctcaag ggcatcgctc gacgctctcc	3720
cttatgcgac tcctgcatta ggaagcagcc cagtagtagg ttgaggccgt tgagcaccgc	3780
cgccgcaagg aatggtgcat gcaaggagat ggcgccaac agtccccgg ccacggggcc	3840
tgccaccata ccacgccga aacaagcgt catgagcccg aagtggcgag cccgatcttc	3900
cccatcggtg atgtcgcgga tataggcgcc agcaaccgca cctgtggcgc cggatgatgcc	3960
ggccacgatg cgtccggcgt agaggatcga gatctcgatc ccgcgaaatt aatacgactc	4020
actatagggg gaccacaacg gtttcctct agaatatagg agataccagt atgcgctgca	4080
ttggcatgag caaccgcat tttgtggaag gcgtgagcgg cggcagctgg gtggatattg	4140
tgctggaaca tggcagctgc gtgaccacca tggcgaaaaa caaaccgacc ctggattttg	4200
aactgattaa aaccgaagcg aaacagccgg cgaccctgcg caaatattgc attgaagcga	4260
aactgaccaa caccaccacc gaaagccgt gcccgacca gggcgaaccg agcctgaacg	4320
aagaacagga taaacgttt gtgtgcaaac atagcatggt ggatcgcggc tggggcaacg	4380
gctgcggcct gtttggcaaa ggcggcattg tgacctgcgc gatgtttcgc tgcaaaaaa	4440
acatggaagg caaagtgtg cagccgga aaactggaata taccattgtg attacccgc	4500
atagcggcga agaacatgcg gtgggcaacg ataccggcaa acatggcaaa gaaattaaaa	4560
ttaccccgca gagcagcatt accgaagcgg aactgaccgg ctatggcacc gtgacatgg	4620
aatgcagccc gcgcaccggc ctggatttta acgaaatggt gctgctgcag atggaaaaca	4680
aagcgtggct ggtgcatgc cagtggtttc tggatctgcc gctgccgtgg ctgccggcg	4740
cggataccca gggcagcaac tggattcaga aagaaacct ggtgaccttt aaaaaccgc	4800
atgcgaaaa acaggatgtg gtggtgctgg gcagccagga aggcgcgatg cataccgcgc	4860
tgaccggcgc gaccgaaatt cagatgagca gcggcaacct gctgtttacc ggccatctga	4920

aatgccgcct gcgcatggat aaactgcagc tgaaggcat gagctatagc atgtgcaccg 4980
gcaaatttaa agtgggtgaa gaaattgcgg aaaccagca tggcaccatt gtgattcgcg 5040
tgcatatga aggcgatggc agcccgtagc aaattccgtt tgaattatg gatctggaaa 5100
aacgccatgt gctgggcccgc ctgattaccg tgaaccgat tgtgaccgaa aaagatagcc 5160

cggtgaacat tgaagcgga cgcggctttg gcgatagcta tattattatt ggcgtggaac 5220
cgggccagct gaaactgaac tggtttaaaa aaggcagcag cattggccag atgtttgaaa 5280
ccaccatgcg cggcgcgaaa cgcatggcga ttctgggcga taccgcgtgg gattttggca 5340
gcctgggccc cgtgtttacc agcattggca aagcgtgca tcagggtgtt ggcgcgattt 5400
atggcgcggc gtttagcggc gtgagctgga ccatgaaaat tctgattggc gtgattatta 5460
cctggattgg catgaacagc cgcagcacca gcctgagcgt gaccctggtg ctggtgggca 5520
ttgtgaccct gtatctgggc gtgatgggtgc aggcgactag tgcgaccggc aaaggcgcgg 5580

cagcttccac gcaggaaggc aagtcccaac cattcaaggt cacgccgggg ccattcgatc 5640
cagccacatg gctggaatgg tcccgccagt ggcagggcac tgaaggcaac ggccacgcgg 5700
ccgctgccgg cattccgggc ctggatgccc tggcaggcgt caagatcgcg ccggcgcagc 5760
tgggtgatat ccagcagcgc tacatgaagg acttctcagc gctgtggcag gccatggccg 5820
agggaaggc cgaggccacc ggtccgctgc acgaccggcg cttcgccggc gacgcatggc 5880
gcaccaacct ccatatcgc ttgctgccc cgtttacct gctcaatgcg cgcgccttga 5940
ccgagctggc cgatgccgtc gaggccgat ccaagaccg ccagcgcatc cgcttcgca 6000

tctcgcaatg ggtcgatgcg atgtcgccc ccaacttct tgcaccaat cccgaggcgc 6060
agcgcctgct gatcgatcg ggcggcgaat cgtgctgtgc cggcgtgccc aacatgatgg 6120
aagacctgac acgcggaag atctcgaga ccgacgagag cgcgtttgag gtcggccgca 6180
atgtcgcggt gaccgaaggc gccgtggtct tcgagaacga gtacttccag ctgttcagct 6240
acaagccgct gaccgacaag gtgcacgcgc gcccgctgct gatggtgccg ccgtgcatca 6300
acaagtacta catcctggac ctgcagccgg agagctcgct ggtgcgccat gtggtggagc 6360
aggacatac ggtgtttctg gtgtcgtggc gcaatccgga cgccagcatg gccggcagca 6420

cctgggacga ctacatcgag cacgcggcca tccgcgccat cgaagtgcg cgcgacatca 6480
gcggccagga caagatcaac gtgctcggt tctgctggg cggcaccatt gtctcgaccg 6540
cgctggcggg gctggccgag cgcggcgagc acccgccgc cagcgtcacg ctgctgacca 6600
cgctgctgga ctttgccgac acgggcatcc tcgacgtctt tgtcgacgag ggccatgtgc 6660
agttgcgcga ggccacgctg ggcggcgagg ccggcgcgcc gtgcgcgctg ctgcgcggcc 6720
ttgagctggc caataccttc tcgttcttgc gcccgaaacga cctggtgtgg aactacgtgg 6780

tcgacaacta cctgaagggc aacacgccgg tgccgttcga cctgctgttc tggaacggcg 6840

acgccaccaa cctgccgggg ccgtggtact gctggtacct gcgccacacc tacctgcaga 6900

acgagctcaa ggtaccgggc aagctgaccg tgtgccggcg gccggtggac ctggccagca 6960

tcgacgtgcc gacctatata tacggctcgc gcgaagacca tatcgtgccg tggaccgcgg 7020

cctatgcctc gaccgcgtg ctggcgaaca agctgcgctt cgtgctgggt gcgtcgggcc 7080

atatcgccgg tigtatcaac ccgccggcca agaacaagcg cagccactgg actaacgatg 7140

cgctgccgga gtcgccgag caatggctgg ccggcgccat cgagcatcac ggcagctggt 7200

ggccggactg gaccgatgg ctggccgggc aggccggcgc gaaacgcgcc gcgcccgcca 7260

actatggcaa tgcgcgctat cgcgcaatcg aaccgcgcc tgggcgatac gtcaaagcca 7320

aggcacatat ggtgctggcg gtggcgattg ataaacgcgg aggcggtgga ggcctcgaga 7380

gcgtggcgct ggtgccgat gtgggcatgg gcttgaaac ccgcaccgaa acctggatga 7440

gcagcgaagg cgcgtggaac catgtgcagc gcattgaaac ctggattctg cgccatccgg 7500

gctttacat gatggcgcg attctggcgt ataccattgg caccacccat tttcagcgcg 7560

cgctgatatt tttctgtg accgcggtga ccccgagcat gacctaagga tccggtgct 7620

aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct gctgccaccg ctgagcaata actagcataa 7680

ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg ggttttttgc tgaaaggagg aactatatcc 7740

ggatatccac aggacgggtg tggtcgcat gatcgctag tcgatagtgg ctccaagtag 7800

cgaagcgagc aggactgggc ggccgcaaaa gcggtcggac agtgcctcga gaacgggtgc 7860

gcatagaaat tgcataacg catatagcgc tagcagcacg ccatagtac tggcgatgct 7920

gtcggaatgg acgatatccc gcaagaggcc cggcagtacc ggcataacca agcctatgcc 7980

tacagcatcc aggtgacgg tgccgaggat gacgatgagc gcattgttag atttcataca 8040

cggtgcctga ctgcgttagc aatttaactg tgataaacta ccgcattaaa gcttatcgat 8100

gataagctgt caaacatgag aa 8122

<210> 44

<211> 1178

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> E2-PhaC-M2 fusion polypeptide encoded by pET-14B-E2-PhaC-M2

<400> 44

Met Arg Cys Ile Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser

1

5

10

15

Gly Gly Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr
 20 25 30
 Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr
 35 40 45
 Glu Ala Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys
 50 55 60
 Leu Thr Asn Thr Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met
 85 90 95
 Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly
 100 105 110
 Ile Val Thr Cys Ala Met Phe Arg Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys
 115 120 125
 Val Val Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Ile Val Ile Thr Pro His
 130 135 140
 Ser Gly Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys
 145 150 155 160
 Glu Ile Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr
 165 170 175
 Gly Tyr Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp
 180 185 190
 Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Gln Met Glu Asn Lys Ala Trp Leu Val
 195 200 205
 His Arg Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala
 210 215 220
 Asp Thr Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe
 225 230 235 240
 Lys Asn Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln
 245 250 255
 Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met

260 265 270
Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg

275 280 285
Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly

290 295 300
Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile

305 310 315 320
Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro

325 330 335
Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile

340 345 350
Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu

355 360 365
Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro

370 375 380
Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln

385 390 395 400
Met Phe Glu Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly

405 410 415
Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly Val Phe Thr Ser Ile

420 425 430
Gly Lys Ala Leu His Gln Val Phe Gly Ala Ile Tyr Gly Ala Ala Phe

435 440 445
Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys Ile Leu Ile Gly Val Ile Ile Thr

450 455 460
Trp Ile Gly Met Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Val Thr Leu Val

465 470 475 480
Leu Val Gly Ile Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala Thr

485 490 495
Ser Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser

500 505 510

Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu
515 520 525

Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala
530 535 540

Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala

545 550 555 560

Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser
565 570 575

Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro
580 585 590

Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro
595 600 605

Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr

610 615 620

Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile
625 630 635 640

Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe
645 650 655

Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly
660 665 670

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

675 680 685

Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn
690 695 700

Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln
705 710 715 720

Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu
725 730 735

Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln

740 745 750

Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val

755 760 765
 Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr
 770 775 780
 Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala
 785 790 795 800
 Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val

 805 810 815
 Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly
 820 825 830
 Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe
 835 840 845
 Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln
 850 855 860
 Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu

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

 930 935 940
 Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp
 945 950 955 960
 Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp
 965 970 975
 His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala
 980 985 990
 Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val

 995 1000 1005

Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp
 1010 1015 1020
 Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu
 1025 1030 1035
 His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala Gly
 1040 1045 1050
 Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala

1055 1060 1065
 Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala
 1070 1075 1080
 Lys Ala His Met Val Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg Gly Gly
 1085 1090 1095
 Gly Gly Gly Leu Glu Ser Val Ala Leu Val Pro His Val Gly Met
 1100 1105 1110
 Gly Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala

1115 1120 1125
 Trp Lys His Val Gln Arg Ile Glu Thr Trp Ile Leu Arg His Pro
 1130 1135 1140
 Gly Phe Thr Met Met Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile Gly Thr
 1145 1150 1155
 Thr His Phe Gln Arg Ala Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala Val
 1160 1165 1170
 Thr Pro Ser Met Thr
 1175

<210> 45

<211> 8116

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct - pET-14b-E3-PhaC-M3

<400> 45

ttcttgaaga cgaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat 60
 aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa ccctatttg 120

tttatTTTT taaatacatt caaatatgia tccgctcatg agacaataac cctgataaat	180
gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gattattcaa ctttccgtg tcgcccttat	240
tccctTTTT gcggcatttt gccttctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt	300
aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag	360
cggttaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa	420
agttctgcta tgtggcgagg tattatcccg tgttgacgcc gggcaagagc aactcggtcg	480
ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct	540
tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataaac	600
tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg ctttttgca	660
caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat	720
accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact	780
attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc	840
ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgtc ggcccttccg gctggctggt ttattgctga	900
taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cgttatcatt gcagcactgg ggccagatgg	960
taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg	1020
aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag catttgtaac tgtcagacca	1080
agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta	1140
ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca	1200
ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg	1260
cgtaatctgc tgcctgcaaa caaaaaaac accgctacca gcggtgggtt gtttgccgga	1320
tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa	1380
tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc	1440
tacatacctc gctctgctaa tctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg	1500
tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggc cgggctgaac	1560
ggggggttcg tgcacacagc ccagcttga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct	1620
acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgt tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc	1680
ggtaagcggc agggctcgaa caggagagcg cagagggag cttccagggg gaaacgcctg	1740
gtatctttat agtctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtatg	1800
ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt	1860
ggccttttgc tggccttttg ctacatggt ctttctgcg ttatccctg attctgtgga	1920
taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctgc gcgagccgaa cgaccgagcg	1980

cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga ggcctgatg cggatatttc tccttacgca	2040
tctgtgcggt atttcacacc gcatatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc	2100
gcatagttaa gccagtatac actccgctat cgtctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc	2160
gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt	2220
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac	2280
cgaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga	2340
tgtctgcctg ttcatccgcg tccagctcgt tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc	2400
ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg ttttttctg tttggtcact gatgcctccg	2460
tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa tgataccgat gaaacgagag aggatgctca	2520
cgatacgggt tactgatgat gaacatgcc ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac	2580
tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa aaatcactca gggtcaatgc cagcgcttcg	2640
ttaatacaga tgiagggttt ccacagggtta gccagcagca tccgtcgatg cagatccgga	2700
acataatggt gcagggcgct gacttccgcg ttccagact ttacgaaaca cggaaaccga	2760
agaccattca tgttgttgct caggtcgcag acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc	2820
gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac cagtaaggca accccgccag cctagccggg	2880
tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca cccgtggcca ggaccaacg ctgcccgaga	2940
tgcgcccggt gcggctgctg gagatggcgg acgcgatgga tatgttctgc caagggttgg	3000
tttgcgatt cacagtctc cgcaagaatt gattggctcc aattcttgga tgggtgaatc	3060
cgttagcgag gtgccgccg cttccattca ggtcgagggt gcccggtcc atgcaccgcg	3120
acgcaacgcg gggaggcaga caaggtatag ggcgggcctt acaatccatg ccaaccggtt	3180
ccatgtgctc gccgaggcgg cataaatcgc cgtgacgac agcggtccag tgatcgaagt	3240
taggttggtta agagccgcga gcgatccttg aagctgtccc tgatggctgt catctacctg	3300
cctggacagc atggcctgca acgcgggcat cccgatgccg ccggaagcga gaagaatcat	3360
aatggggaag gccatccagc ctgcgctgc gaacgccagc aagacgtagc ccagcgctc	3420
ggccgccatg ccggcgataa tggcctgctt ctgcgcgaaa cgtttggtgg cgggaccagt	3480
gacgaaggct tgagcgaggg cgtgcaagat tccgaatacc gcaagcgaca ggccgatcat	3540
cgtcgcgctc cagcgaaagc ggtctctgcc gaaaaagacc cagagcgtg ccggcacctg	3600
tcctacgagt tgcatgataa agaagacagt cataagtgcg gcgacgatag tcatgccccg	3660
cggccaccgg aaggagctga ctgggttgaa ggctctcaag ggcatcggtc gacgctctcc	3720

cttatgcgac tcttgcat ta ggaagcagcc cagtagtagg ttgaggccgt tgagcaccgc	3780
cgccgcaagg aatgggtgat gcaaggagat ggcgcccaac agtccccgg ccacggggcc	3840
tgccaccata cccacgccga aacaagcgct catgagcccg aagtggcgag cccgatcttc	3900
cccatcgggtg atgtcggcga tataggcgcc agcaaccgca cctgtggcgc cggatgatgc	3960
ggccacgatg cgtccggcgt agaggatcga gatctcgatc ccgcgaaatt aatacgactc	4020
actataggga gaccacaacg gtttccctct agaatatagg agataccagt atgcgtgcg	4080
tgggcgtggg caaccgcgat tttgtggaag gcctgagcgg cgcgacctgg gtggatgtgg	4140
tgctggaaca tggcggctgc gtgaccacca tggcgaaaaa caaacgacc ctggatattg	4200
aactgcagaa aaccgaagcg acccagctgg cgaccctgcg caaactgtgc attgaaggca	4260
aaattaccaa cattaccacc gatagccgct gcccgaacca gggcgaagcg gtgctgccgg	4320
aagaacagga tcagaactat gtgtgcaaac atacctatgt ggatcgcggc tggggcaacg	4380
gtgctggcct gtttggcaaa ggcagcctgg tgacctgcgc gaaatttcag tgcctggaac	4440
cgattgaagg caaagtgggtg cagtatgaaa acctgaaata taccgtgatt attaccgtgc	4500
ataccggcga tcagcatcag gtgggcaacg aaaccaggcg cgtgaccgcg gaaattacc	4560
cgcaggcgag caccaccgaa gcgattctgc cggaatatgg caccctgggc ctggaatgca	4620
gcccgcgcac cgccctggat tttaacgaaa tgattctgct gaccatgaaa aacaaagcgt	4680
ggatggtgca tcgccagttg tttttgatc tgccgctgcc gtggcgagc ggcgcgacca	4740
ccgaaacccc gacctggaac cgcaagaac tgctggtgac ctttaaaaac gcgcatcgca	4800
aaaaacagga agtgggtgggtg ctgggcagcc aggaaggcgc gatgcatacc gcgctgaccg	4860
gcgcgaccga aattcagaac agcggcggca ccagcatctt tgccggccat ctgaaatgcc	4920
gcctgaaaat ggataaactg gaactgaaag gcatgagcta tgcgatgtgc accaacacct	4980
ttgtgctgaa aaaagaagtg agcgaaaccc agcatggcac cattctgatt aaagtggaat	5040
ataaaggcga agatgcgccg tgcaaaattc cgttttagcac cgaagatggc cagggcaaag	5100
cgcataacgg ccgcctgatt accgcgaacc cgggtggtgac caaaaaagaa gaaccggtga	5160
acattgaagc ggaaccgccc tttggcgaaa gcaacattgt gattggcatt ggcgataacg	5220
cgctgaaaat taactggtat aaaaaaggca gcagcattgg caaaatgttt gaagcgaccg	5280
aacgcggcgc gcgccgatg gcgattctgg gcgataccgc gtgggatttt ggcagcgtgg	5340
gcgcgctgct gaacagcctg ggcaaaatgg tgcatacagat ttttggcagc gcgtataccg	5400
cgctgtttag cgccgtgagc tgggtgatga aaattggcat tggcgtgctg ctgacctgga	5460
ttggcctgaa cagcaaaaaac accagcatga gcttttagctg cattgcgatt ggcattatta	5520
ccctgtatct gggcgcggtg gtgcaggcga ctagtgcgac cggcaaaggc gcggcagctt	5580

ccacgcagga aggcaagtc caaccattca aggtcacgcc ggggccattc gatccagcca 5640
catggctgga atggtcccgc cagtggcagg gcaactgaagg caacggccac gcggccgcgt 5700
ccggcattcc gggcctggat gcgctggcag gcgtcaagat cgcgccggcg cagctgggtg 5760
atatccagca gcgtacatg aaggacttct cagcgtgtg gcaggccatg gccgagggca 5820

aggccgaggc caccggtccg ctgcacgacc ggcgcttcgc cggcgacgca tggcgacca 5880
acctccata tcgttcgct gccgcgttct acctgctcaa tgcgcgcc ttgaccgagc 5940
tggccgatgc cgtcgaggcc gatccaaga cccgccagcg catccgttc gcgatctgc 6000
aatgggtcga tgcgatgctg cccccaact tccttgccac caatcccag gcgcagcgcc 6060
tgctgatcga gtcggcgccg gaatcgctgc gtgccggcgt gcgaacatg atggaagacc 6120
tgacacgcgg caagatctcg cagaccgacg agagcgctt tgaggtcggc cgcaatgtcg 6180
cgggtaccga aggcgccgtg gtcttcgaga acgagtactt ccagctgttg cagtacaagc 6240

cgctgaccga caaggtgcac gcgcgccgc tgctgatggt gccgccgtgc atcaacaagt 6300
actacatcct ggacctgcag ccggagagct cgctggtgcg ccatgtggtg gagcaggac 6360
atacgtgtt tctggtgctg tggcgcaatc cggacgccag catggccggc agcacctggg 6420
acgactacat cgagcacgcg gccatccgcg ccatcgaagt cgcgcgcgac atcagcgcc 6480
aggacaagat caacgtgctc ggcttctgcg tggcgccac cattgtctcg accgcgtgg 6540
cgggtgctggc cgcgcgcggc gagcacccgg ccgccagcgt cacgtgctg accacgtgc 6600
tggactttgc cgacacgggc atcctcgacg tctttgtcga cgagggccat gtgcagttgc 6660

gcgagggccac gctggcgccg ggccggcg cgccgtgcgc gctgctgcgc ggccttgagc 6720
tggccaatac ctctcgttc ttgcgccga acgacctggt gtggaactac gtggtcgaca 6780
actacctgaa gggcaacacg ccggtgccgt tcgacctgct gttctggaac ggcgacgcca 6840
ccaacctgcc ggggcctggg tactgctggt acctgcgcca cactacctg cagaacgagc 6900
tcaaggtacc gggcaagctg accgtgtgcg gcgtgccggt ggacctggcc agcatcgacg 6960
tgccgacctg tatctacggc tcgcgcgaag accatatcgt gccgtggacc gcggcctatg 7020
cctcgaccgc gctgctggcg aacaagctgc gcttcgtgct ggggtgcgtcg ggccatatcg 7080

ccggtgtgat caaccgcgcg gccagaaca agcgcagcca ctggactaac gatgcgtgc 7140
cggagtgcgc gcagcaatgg ctggccggcg ccatcgagca tcacggcagc tgggtggccg 7200
actggaccgc atggctggcc gggcaggccg gcgcgaaac gcgccgccc gccactatg 7260
gcaatgcgcg ctatcgcgca atcgaaccg cgctggcg atactcaaa gccaaaggc 7320
atatggtgct ggcggtggcg attgataaac gcggaggcgg tggaggcctc gagagcgtgg 7380
cgctggcgcc gcatgtggcg atgggcctgg ataccgcac ccagacctgg atgagcgcg 7440

aaggcgcgtg gcgccaggtg gaaaaagtgg aaacctgggc gctgcgcat cgggcttta 7500

ccattctggc gctgtttctg gcgcattata ttggcaccag cctgaccag aaagtggga 7560

tttttattct gctgatctg gtgacccga gcatgaccta aggatccggc tgctaacaaa 7620

gcccgaagg aagctgagtt ggctgctgcc accgctgagc aataactagc ataaccctt 7680

ggggcctcta aacgggtctt gaggggtttt ttgctgaaag gaggaactat atccgatat 7740

ccacaggacg ggtgtggcgc ccatgatcgc gtagtcgata gtggctcaa gtagcgaagc 7800

gagcaggact gggcggcggc caaagcggc ggacagtgc cggagaacgg gtgcgcatag 7860

aaattgcatc aacgcatata gcgctagcag cagccatag tgactggcga tgctgtcgga 7920

atggacgata tcccgaaga ggcccggcag taccggcata accaagccta tgcctacagc 7980

atccagggtg acggtgccga ggatgacgat gagcgattg ttagatttca tacacggtgc 8040

ctgactgcgt tagcaattta actgtgataa actaccgcat taaagcttat cgatgataag 8100

ctgtcaaaca tgagaa 8116

<210> 46

<211> 1176

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> E3-PhaC-M3 fusion polypeptide encoded by pET-14B-E3-PhaC-M3

<400> 46

Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser

1 5 10 15

Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr

20 25 30

Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Gln Lys Thr

35 40 45

Glu Ala Thr Gln Leu Ala Thr Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Gly Lys

50 55 60

Ile Thr Asn Ile Thr Thr Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala

65 70 75 80

Val Leu Pro Glu Glu Gln Asp Gln Asn Tyr Val Cys Lys His Thr Tyr

85 90 95

Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser

100	105	110	
Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Gln Cys Leu Glu Pro Ile Glu Gly Lys			
115	120	125	
Val Val Gln Tyr Glu Asn Leu Lys Tyr Thr Val Ile Ile Thr Val His			
130	135	140	
Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu Thr Gln Gly Val Thr Ala			
145	150	155	160
Glu Ile Thr Pro Gln Ala Ser Thr Thr Glu Ala Ile Leu Pro Glu Tyr			
165	170	175	
Gly Thr Leu Gly Leu Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn			
180	185	190	
Glu Met Ile Leu Leu Thr Met Lys Asn Lys Ala Trp Met Val His Arg			
195	200	205	
Gln Trp Phe Phe Asp Leu Pro Leu Pro Trp Ala Ser Gly Ala Thr Thr			
210	215	220	
Glu Thr Pro Thr Trp Asn Arg Lys Glu Leu Leu Val Thr Phe Lys Asn			
225	230	235	240
Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly			
245	250	255	
Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Asn Ser Gly			
260	265	270	
Gly Thr Ser Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp			
275	280	285	
Lys Leu Glu Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ala Met Cys Thr Asn Thr Phe			
290	295	300	
Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Leu Ile			
305	310	315	320
Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser			
325	330	335	
Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala			
340	345	350	

Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu
 355 360 365
 Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Asn Ala
 370 375 380
 Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe

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

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

 515 520 525
 Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala Ala Ser
 530 535 540
 Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala Pro Ala
 545 550 555 560
 Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 565 570 575
 Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro Leu His

 580 585 590
 Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro Tyr Arg

595 600 605
 Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr Glu Leu
 610 615 620
 Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile Arg Phe
 625 630 635 640
 Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe Leu Ala

 645 650 655
 Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly Glu Ser
 660 665 670
 Leu Arg Ala Gly Val Arg Asn Met Met Glu Asp Leu Thr Arg Gly Lys
 675 680 685
 Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn Val Ala
 690 695 700
 Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln Leu Leu

 705 710 715 720
 Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu Leu Met
 725 730 735
 Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln Pro Glu
 740 745 750
 Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val Phe Leu
 755 760 765
 Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr Trp Asp

 770 775 780
 Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala Arg Asp
 785 790 795 800
 Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val Gly Gly
 805 810 815
 Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly Glu His
 820 825 830
 Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ala Asp

 835 840 845

Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln Leu Arg
 850 855 860
 Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu Leu Arg
 865 870 875 880
 Gly Leu Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu
 885 890 895
 Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val
 900 905 910
 Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly
 915 920 925
 Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu
 930 935 940
 Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp Leu Ala
 945 950 955 960
 Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His Ile
 965 970 975
 Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala Asn Lys
 980 985 990
 Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val Ile Asn
 995 1000 1005
 Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp Ala Leu
 1010 1015 1020
 Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu His His
 1025 1030 1035
 Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala Gly Gln Ala
 1040 1045 1050
 Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr
 1055 1060 1065
 Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala
 1070 1075 1080
 His Met Val Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg Gly Gly Gly Gly

1085	1090	1095	
Gly Leu	Glu Ser Val Ala Leu	Ala Pro His Val Gly	Met Gly Leu
1100	1105	1110	
Asp Thr	Arg Thr Gln Thr Trp	Met Ser Ala Glu Gly	Ala Trp Arg
1115	1120	1125	
Gln Val	Glu Lys Val Glu Thr	Trp Ala Leu Arg His	Pro Gly Phe
1130	1135	1140	
Thr Ile	Leu Ala Leu Phe Leu	Ala His Tyr Ile Gly	Thr Ser Leu
1145	1150	1155	
Thr Gln	Lys Val Val Ile Phe	Ile Leu Leu Met Leu	Val Thr Pro
1160	1165	1170	
Ser Met	Thr		
1175			
<210>	47		
<211>	8119		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223>	Synthetic construct - pET-14b-E4-PhaC-M4		
<400>	47		
ttctcatgtt tgacagctta tcatcgataa gctttaatgc ggtagtttat cacagttaaa		60	
ttgctaacgc agtcaggcac cgtgtatgaa atctaacaat gcgctcatcg tcatcctcgg		120	
caccgtcacc ctggatgctg taggcatagg cttggttatg ccggtactgc cgggcctctt		180	
gcgggatatc gtccattccg acagcatcgc cagtcactat ggctgtctgc tagcgctata		240	
tgcgttgatg caattttctat gcgcacccgt tctcggagca ctgtccgacc gctttggccg		300	
ccgccagtc ctgctcgtt cgctacttgg agccactatc gactacgca tcatggcgac		360	
cacacccgtc ctgtggatat ccggatatag ttctctctt cagcaaaaaa cccctcaaga		420	
cccgtttaga ggcccaagg ggttatgcta gttattgctc agcggaggca gcagccaact		480	
cagcttctt tcgggcttgg ttagcagccg gatccttaat agtcggcgc caccagcatc		540	
atcagcaca aaaacacggt gcgctgaatg ccggtctggc caatcatata cgccataaag		600	
ccgccagca gcgcaaagcc cgggttgccg agaatccagc tttccacgcg ctgcgcatgt		660	
ttccacgcgc cticgtgct catccagggt tccgcgcggg tttccaggcc catgccgcta		720	
tgcggggtca gcgccagct ctgaggcct ccaccgctc cgcgtttatc aatcgccacc		780	

gccagcacca taatgacatt ggctttgacg tatcgcccag gcgcgggttc gattgacgca 840
tagcgcgcat tgccatagtt ggcggggcgcg gcgcgtttcg cgccggcctg cccggccagc 900
catgcggtec agtccggcca ccagctgccg tgatgctcga tggcgccggc cagccattgc 960
tgcggcgact ccggcagcgc atcggttagtc cagtggctgc gcttgttctt ggccggcggg 1020

ttgatcacac cgcgatatg gcccagcga cccagcacga agcgagctt gttcgccagc 1080
agcgcggtcg aggcataagg cgcggtccac ggcacgatat ggtcttcgcg cgagccgtag 1140
atataggtcg gcacgtcgat gctggccagg tccaccggca cgccgcacac ggtcagcttg 1200
cccggtaact tgagctcgtt ctgcaggttag gtgtggcgca ggtaccagca gtaccacggc 1260
cccggcaggt tggtagcgct gccgttccag aacagcaggt cgaacggcac cggcgtgttg 1320
cccttcaggt agttgtcgac cacgtagttc cacaccaggt cgttcgggcg caagaacgag 1380
aaggtattgg ccagctcaag gccgcgcagc agcgcgacg gcgcgccggc gccgccgcc 1440

agcgtggcct cgcgcaactg cacatggccc tcgtcgaca agacgtcgag gatgcccggtg 1500
tcggcaaagt ccagcagcgt ggtcagcagc gtgacgttgg cggccgggtg ctgcgccgc 1560
gcggccagca ccgccagcg ggtcgagaca atggtgccgc ccacgcagaa gccgagcacg 1620
ttgatcttgt cctggccgct gatgtcgcg gcgacttcga tggcgccgat ggcccggtgc 1680
tcgatgtagt cgtcccaggt gctgccggcc atgctggcgt ccgatttgcg ccacgacacc 1740
agaaacaccg taatgacctg ctccaccaca tggcgacca gcgagcttc cggctgcagg 1800
tccaggatgt agtacttgt gatgcacggc ggcacatca gcagcgggcg cgcgtgcacc 1860

ttgtcggtea gcggcttgta ctgcaacagc tggaagtact cgttctcgaa gaccacggcg 1920
ccttcggtca ccgcgacatt gcggccgacc tcaaacgcgc tctcgtcggt ctgcgagatc 1980
ttgccgctg tcaggtcttc catcatgttg cgcacgccgg cacgcagcga ttgccgccc 2040
gactcgatca gcaggcgtg cgcctcggga ttggtggcaa ggaagtggc gggcgacatc 2100
gcatcgacc attgcgagat cgcaagcgg atgcgtggc gggcttggc atcggcctcg 2160
acggcatcgg ccagctcgtt caaggcgcg gcatttagca ggtagaacgc ggcagcgaag 2220
cgatatggga ggttgggtcg ccatgcgtcg ccggcgaagc gccggtcgtg cagcggaccg 2280

gtggcctcgg ccttgccctc ggccatggc tgccacagcg ctgagaagtc cttcatgtag 2340
cgctgctgga tatcaccag ctgcgccggc gcgacttga cgctgccag cgcattcagg 2400
cccgaatgc cggacgcggc cgcgtggccg ttgccttcag tgccctgcca ctggcgggac 2460
cattccagcc atgtggctgg atcgaatggc cccggcgtga ccttgaatgg ttgggacttg 2520
ccttcctcgc tggaagctgc cgccctttg ccggtcgac tagtcgctg cacggtaaaag 2580
cccagaaaca gggtaatgcc gcccaccgca atgcaggtca tcgcatgct ggtgttcggg 2640

ctgttgggtgc caatccacag caccagaaaag ccaatcagaa tgcgaatcat ccagctcacg	2700
ccgccaaaca tgggtgggtata cacgttgcca aacacctgat gcaccgcttt gccaggtg	2760
gtaaacaggc cgcccacgct gccaaaatcc cagcggttt cgcccagaat cgccatgcgt	2820
ttcgcgccgc gatagggtgt ttcaaacatt ttgccaatgc tgcctccttt gcgaaacaa	2880
tgcagggtca gcgcgtgtt gccacgcca atcacaatat agctatcgcc aaacggcgt	2940
tccagttcaa tgttgggtcac gctgttgggt ttttcgcca gcggggtgt gctaataatg	3000
cggcccacca ctttttcttt gttcacatcg cgaatttcaa tcggcacttt gcacggcgcg	3060
cccgcgcctt catatttcac ttccaccacg gtggtgcat gctgggtttc cgccatttct	3120
ttatcaatgc taaatttgc gctgcacatg gtatagctca tgcctttaat gcgcagtttt	3180
tccatgcga ctttgcattt cagatggccc gaaacatat ggttgccatc gccgtatcc	3240
acttcggtgc cgcccgccag cgcgtatgc atcgccctt cctggctgcc cagcacggtc	3300
acatcctggc gtttcgcatg cggcacttta aaggtcacca tgcgttcttt atagtccaa	3360
tgcacttcgc tggatccgc gcccgcggtc cacggcagcg gcagatccag aaaccactgt	3420
ttatgcacca gccaggtttt ttttttcatt ttcatcagaa tcatttcgtt aaaatcaatg	3480
ccgctgcgcg gttcgcaatc cagggtcagt tcgccataat ccggcagttt cacttcacg	3540
ctcgggtgc gcggggtaat catcgcggtc acgcatggt tgcgtgtatc gttgccacc	3600
gcatgggtat cgccgttatg cacgttcacc accacgtat attccaggtt ttcaatctgc	3660
accaggttgc cggtaatttt gccgtgcag ctaaatttcg cgcaggtcac cagccgcct	3720
ttgccaaaca ggccgcagcc gttgccccag ccgcatcca ccacatcgcg gcggcaaata	3780
tactgtgat cctgttcttc ttccagatac ggttcgccct gggtcgggca gcgggtcgcg	3840
gtggtaatgt tgctaagtct gccttcaatg caatagggtc gcagcagcgc cacttctttc	3900
gcggtggttt tggtcagttc aaaatccagg gtcggtttgc cctgcgcat ggtggtcacg	3960
cagccgcat gttccagcac cagatccacc cacgcgcgc cgctcacgc ttccacaaaa	4020
tcgcggttgc ccacgccac gcagcgcata ctggtatctc ctatattcta gagggaaacc	4080
gttgtgtct cctatagtg agtcgtatta atttcgctgg atcgagatct cgatcctcta	4140
cgccggacgc atcgtggcgc gcatcaccgg cgccacaggt gcggttgctg gcgcctatat	4200
cgccgacatc accgatgggg aagatgggc tcgccacttc gggtcatga gcgcttgttt	4260
cggcgtgggt atggtggcag gcccgtggc cgggggactg ttgggcgcca tctccttgca	4320
tgcaccattc cttgcggcgc cgtgtctcaa cgccctcaac ctactactgg gctgttctct	4380

aatgcaggag tcgcataagg gagagcgtcg accgatgccc ttgagagcct tcaaccagct	4440
cagctccttc cggtagggcg ggggcatgac tatcgtcgcc gcacttatga ctgtcttctt	4500
tatcatgcaa ctcgtaggac aggtgccggc agcgtctctgg gtcattttcg gcgaggaccg	4560
ctttcgtctgg agcgcgacga tgatcggcct gtcgcttgcg gtattcggaa tcttgcacgc	4620
cctcgtcaaa gccttcgtca ctgggtccgc caccaaacgt ttcggcgaga agcaggccat	4680
tatcgccggc atggcggccg acgcgtctgg ctacgtcttg ctggcggttcg cgacgcgagg	4740
ctggatggcc ttccccatta tgattcttct cgcttcggc ggcatcgga tgcccgctt	4800
gcaggccatg ctgtccaggc aggtagatga cgaccatcag ggacagcttc aaggatcgct	4860
cgcggctctt accagcctaa cttcgatcac tggaccgctg atcgtcacgg cgatttatgc	4920
cgctcggcg agcacatgga acgggttggc atggattgta ggccgccc tataccttgt	4980
ctgcctccc gcgttcgctc gcggtgcatg gagccgggcc acctcgacct gaatggaagc	5040
cggcggcacc tcgctaacgg attcaccact ccaagaattg gagccaatca attcttcgg	5100
agaactgtga atgcgcaaac caaccttgg cagaacatat ccatcgctc cgccatctcc	5160
agcagccga cgcgcgcat ctcgggcagc gttgggtcct ggccacgggt gcgcatgac	5220
gtgctcctgt cgttaggac ccggctaggc tggcggggtt gccttactgg ttagcagaat	5280
gaatcaccga tacgcgagcg aacgtgaagc gactgctgct gcaaacgtc tgcgacctga	5340
gcaacaacat gaatggtctt cggtttccgt gtttcgtaaa gtctggaaac gcggaagtca	5400
gcgcctgca ccattatgtt ccggatctgc atcgaggat gctgctggct accctgtgga	5460
acacctacat ctgtattaac gaagcgttg cattgacct gagtgatttt tctctgttcc	5520
cgccgcatcc ataccgccag ttgtttacc tcacaacgtt ccagtaaccg ggcatgttca	5580
tcatcagtaa ccgtatcgt gagcatctc tctcgtttca tcggtatcat taccctcatg	5640
aacagaaatc ccccttacac ggaggcatca gtgaccaaac aggaaaaaac cgcccttaac	5700
atggcccgtt ttatcagaag ccagacatta acgcttctgg agaaactcaa cgagctggac	5760
gcggatgaac aggcagacat ctgtgaatcg ctacacgacc acgtgatga gctttaccgc	5820
agctgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccgag	5880
acggtcacag ctgtctgta agcggtgcc gggagcagac aagcccgta gggcgctca	5940
gcgggtgttg gcgggtgtcg gggcgagcc atgaccagc cacgtagcga tagcgagtg	6000
tatactggct taactatcg gcacagagc agattgtact gagagtgcac catatatgcg	6060
gtgtgaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct cttccgttc	6120
ctcgtcact gactcgtcg gctcggctgt tcggctcgg cgagcggtat cagctcactc	6180
aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc	6240

aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt tttccatag	6300
gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgtca agtcagaggt ggcgaaaccc	6360
gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccttggaagc tccctcgtgc gctctcctgt	6420
tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgt	6480
ttctcatagc tcacgtgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgt ccaagctggg	6540
ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccgta actatcgtct	6600
tgagtccaac ccgtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat	6660
tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtcttg aagtgggtgc ctaactacgg	6720
ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgtctcgtg aagccagtta ccttcggaaa	6780
aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgt ggtagcgggtg gttttttgt	6840
ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatctttc	6900
tacggggtct gacgtcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt	6960
atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta	7020
aagtatatat gagttaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat	7080
ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg ttagataac	7140
tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg	7200
ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag	7260
tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt	7320
aagtagttcg ccagttaata gtttcgcaa cgttgttgcc attgtgcag gcatcgtggt	7380
gtcacgtcgc tcgtttgta ttggttcatt cagctccggt tccaacgat caaggcgagt	7440
tacatgatcc ccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtctc cgatcgttgt	7500
cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct	7560
tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt	7620
ctgagaatag tgatgcggc gaccgagttg ctcttgccc gcgtcaacac gggataatac	7680
cgcgccacat agcagaactt taaaagtgt catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa	7740
actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcaccaa	7800
ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca	7860
aatgccgca aaaaagggaa taaggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct	7920
ttttcaatat tattgaagca ttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatattga	7980
atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc	8040
tgacgtctaa gaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag	8100

gccctttcgt cttaagaa

8119

<210> 48

<211> 1177

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> E4-PhaC-M4 fusion polypeptide encoded by pET-14b-E4-PhaC-M4

<400> 48

Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser

1 5 10 15

Gly Gly Ala Trp Val Asp Leu Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr

20 25 30

Thr Met Ala Gln Gly Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Thr Lys Thr

35 40 45

Thr Ala Lys Glu Val Ala Leu Leu Arg Thr Tyr Cys Ile Glu Ala Ser

50 55 60

Ile Ser Asn Ile Thr Thr Ala Thr Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro

65 70 75 80

Tyr Leu Lys Glu Glu Gln Asp Gln Gln Tyr Ile Cys Arg Arg Asp Val

85 90 95

Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly

100 105 110

Val Val Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Ser Gly Lys Ile Thr Gly Asn

115 120 125

Leu Val Gln Ile Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Val Val Val Thr Val His

130 135 140

Asn Gly Asp Thr His Ala Val Gly Asn Asp Thr Ser Asn His Gly Val

145 150 155 160

Thr Ala Met Ile Thr Pro Arg Ser Pro Ser Val Glu Val Lys Leu Pro

165 170 175

Asp Tyr Gly Glu Leu Thr Leu Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Ile Asp

180 185 190

Phe Asn Glu Met Ile Leu Met Lys Met Lys Lys Lys Thr Trp Leu Val
 195 200 205
 His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ala Gly Ala
 210 215 220
 Asp Thr Ser Glu Val His Trp Asn Tyr Lys Glu Arg Met Val Thr Phe
 225 230 235 240

 Lys Val Pro His Ala Lys Arg Gln Asp Val Thr Val Leu Gly Ser Gln
 245 250 255
 Glu Gly Ala Met His Ser Ala Leu Ala Gly Ala Thr Glu Val Asp Ser
 260 265 270
 Gly Asp Gly Asn His Met Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Lys Val Arg
 275 280 285
 Met Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly
 290 295 300

 Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr
 305 310 315 320
 Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro
 325 330 335
 Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile
 340 345 350
 Ser Ser Thr Pro Leu Ala Glu Asn Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu
 355 360 365

 Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asn
 370 375 380
 Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys
 385 390 395 400
 Met Phe Glu Ser Thr Tyr Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly
 405 410 415
 Glu Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Leu Phe Thr Ser Leu
 420 425 430

 Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly Ser Val Tyr Thr Thr Met Phe

435 440 445
 Gly Gly Val Ser Trp Met Ile Arg Ile Leu Ile Gly Phe Leu Val Leu
 450 455 460
 Trp Ile Gly Thr Asn Ser Arg Asn Thr Ser Met Ala Met Thr Cys Ile
 465 470 475 480
 Ala Val Gly Gly Ile Thr Leu Phe Leu Gly Phe Thr Val Gln Ala Thr
 485 490 495

 Ser Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser
 500 505 510
 Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu
 515 520 525
 Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala
 530 535 540
 Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala
 545 550 555 560

 Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser
 565 570 575
 Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro
 580 585 590
 Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro
 595 600 605
 Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr
 610 615 620

 Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile
 625 630 635 640
 Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe
 645 650 655
 Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly
 660 665 670
 Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val Arg Asn Met Met Glu Asp Leu Thr Arg
 675 680 685

Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn
 690 695 700
 Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln
 705 710 715 720
 Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu
 725 730 735
 Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln
 740 745 750

 Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val
 755 760 765
 Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr
 770 775 780
 Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala
 785 790 795 800
 Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val
 805 810 815

 Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly
 820 825 830
 Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe
 835 840 845
 Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln
 850 855 860
 Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu
 865 870 875 880

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

930	935	940
Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp		
945	950	955 960
Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp		
	965	970 975
His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala		
	980	985 990
Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val		
995	1000	1005
Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp		
1010	1015	1020
Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu		
1025	1030	1035
His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala Gly		
1040	1045	1050
Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala		
1055	1060	1065
Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala		
1070	1075	1080
Lys Ala His Met Val Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg Gly Gly		
1085	1090	1095
Gly Gly Gly Leu Glu Ser Val Ala Leu Thr Pro His Ser Gly Met		
1100	1105	1110
Gly Leu Glu Thr Arg Ala Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala		
1115	1120	1125
Trp Lys His Ala Gln Arg Val Glu Ser Trp Ile Leu Arg Asn Pro		
1130	1135	1140
Gly Phe Ala Leu Leu Ala Gly Phe Met Ala Tyr Met Ile Gly Gln		
1145	1150	1155
Thr Gly Ile Gln Arg Thr Val Phe Phe Val Leu Met Met Leu Val		
1160	1165	1170

Ala Pro Ser Tyr

1175

<210> 49

<211> 10468

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct - pET-14b-SEBOVGP-PhaC-ZEBOVGP

<400> 49

ttctcatgtt tgacagctta tcatcgataa gctttaatgc ggtagtttat cacagttaaa	60
ttgctaacgc agtcaggcac cgtgtatgaa atctaacaat gcgctcatcg tcatcctcgg	120
caccgtcacc ctggatgctg taggcatagg ctgtgttatg ccggtactgc cgggcctctt	180
gcgggatatc gtccattccg acagcatcgc cagtcactat ggctgtctgc tagcgtata	240
tgcgttgatg caatttctat gcgcacccgt tctcggagca ctgtccgacc gctttggccg	300
ccgccagtc ctgctcgctt cgctacttgg agccactatc gactacgca tcatggcgac	360
cacacccgtc ctgtggatat ccggatatag ttctctcttt cagcaaaaaa cccctcaaga	420
cccgtttaga ggccccaagg ggttatgcta gttattgctc agcggtagga gcagccaact	480
cagcttcctt tcgggctttg tttagagccg gatccttagc acagcagttt gcacacgcac	540
agcagcgcaa taatcgcaat aataatgccg gtaatgcaa tgcccgcgg aatccactgg	600
cgccagccgg tccaccagtt atcatcgta tcctggttcg gcagcgggtt atcaataaaa	660
tcatgaataa tctggttaat ttatcggta atgtttttgg tccaatcatg cggttcaatg	720
cagcaatccg ggcccagaat gcggcagggt ccgccccagc ggcgagcag aaaatcaatc	780
gctttgcggt tcagaatggt ataggtgcgc agttcggtag tcgcgcgcag aaacagctgc	840
agcgcctggg tggtttcgtt cgccagctgg cgcaggccgc acaccagcgc gttctggtta	900
tgcacagcg cttcggtata aatgccttc gcgccgggc caaaatacgg aatccacgca	960
atgccgcgg cgttatgctg ttctgcgcg gtccaataat gcaggttcgg gttgcatttg	1020
ccggtcgctt tgggtgttgt ctggcggcgg ctgcgtttgc gcaggccag gctgcccaga	1080
atgccgtca cgggtgctgt aatcaggccg ttgctggtgc ttctctgcgg cagcacggtt	1140
ttcacgcgg tggtaatgtt ttccgggtg gtcagggtcg gcgttcggt ggtcgggccc	1200
gggtgctgc ccggcgggtt ggtcggttct tcggtcgcca tcacgtcgg gccgctggtta	1260
tggtgtgtcg ggtctgcgc ttccgggtc ggcgcggtgg tcgggtgct gctcggaatc	1320
tggtgctgc tcgggcgaat gccaatggtg ctaatctgca tatggttgcc gttggtgcca	1380

ataatggtcg ccgcggtttc ggtaatggtt tcctgggtgt tcacgcccac gcggcggcct	1440
tcggtgctgt tctggctcgg cagggtggtt tcgccttcg gaatatgcag cggcaccatg	1500
cccgggctgt ttttcggcac cagatcgcta tatttcggg tcgcgcgac gctaatacg	1560
ccitttgtaa tgcggctgct cgccgcatca tcacttcgg tttcgttcag gtcagcgct	1620
tcaaagctca gttcttcgcc gcgcagctgt tcgctcaggt ttttttgtt ttcccaaac	1680
gcccattcgc caatatccgc gttaatgttc gcatccaggg tccaaatcag gcggccggtg	1740
gtgttgctca gctgctgatg cagatgaatg gtatcgttca gctgaaacag aaactgcggg	1800
gtatgcgggc gatccaggcg cacaagggtg ttgttatcaa ttttaaacag ggtggtgcta	1860
tgctgcgcgc caaagttttc aatttcatat tccagatagc tggtcgcata atagctgctg	1920
gtgttttcgg tatagttcac cgcttcgcga atcggcgggc tctgcagaaa ggtttctttc	1980
ggtttcgcca gaatcagaaa cgcaatcacg ccttcgcaa agttcacgcc gcgataaatc	2040
acggtgctcg ccaggcgatc atacagaaaa aacgcgcat ctttatgaaa cgcataatcg	2100
cccgggcacg ggccggtgcc ctgcgcttta tgcacatagc ggacgcgcg aaagccgcgc	2160
acgccatccg gcggcgccgg caggcattcg ctgccatccg gttttttaat ttccaggtta	2220
tagcagtttt ccgccattc gcccgcttca tagctacca ctttcggcgg caccgcgctg	2280
cgaagcccc agcgtttggt cgcgctcgga atatcggtgc tcacgccgt gccttcagg	2340
ttcaggccca cgcttttcag ctgatcggtg ctgccagat gatctttgca caccagctga	2400
tcaatttcgg tcaattccag ggtgctgttg gtcaccacgc ccagcggcat gctaaacgt	2460
ttctgaaaca gaataatcac ccacacaaaa aagctgcttt tgcgaaattt atcgcgcggc	2520
agctgcagca ggctcaggcc gcccatctcg aggcctccac cgcctccgcg ttatcaatc	2580
gccaccgcca gcaccatat tgccttggct ttgacgtatc gccaggcgc gggttcgatt	2640
gcgcgatagc gcgcattgcc atagtggcg ggcgcgcggc gtttcgcgcc ggcttccccg	2700
gccagccatg cggtcagtc cgccaccag ctgccgtgat gctcgatggc gccggccagc	2760
cattgtcgcg gcgactccgg cagcgcatcg ttagtcaggt ggctgcgctt gttcttgcc	2820
ggcgggttga tcacaccggc gatatggccc gacgcacca gcacgaagcg cagcttgttc	2880
gccagcagcg cggtcgagcg ataggccgcg gtccacggca cgatatggtc ttcgcgcgag	2940
ccgtagatat aggtcggcac gtcgatgctg gccagggtcca ccggcacgcc gcacacggtc	3000
agcttccccg gtaccttgag ctcgttctgc aggtaggtgt ggcgaggta ccagcagtac	3060
cacggccccg gcaggttggt ggctgcgcg ttccagaaca gcaggtcgaa cggcaccggc	3120
gtgttgccct tcaggtagtt gtcgaccag tagttccaca ccaggctgtt cgggcgcaag	3180
aacgagaagg tattggccag ctcaaggccg gcgcagcagc gcacggcgcc gccggcgccc	3240

ccgccagcg tggcctcgcg caactgcaca tggccctcgt cgacaaagac gtcgaggatg 3300
cccgtgtcgg caaagtccag cagcgtggtc agcagcgtga cgctggcggc cgggtgctcg 3360

ccgcgcgagg ccagcacgcg cagcgcggtc gagacaatgg tgccgcccac gcagaagccg 3420
agcacgttga tcttgtcctg gccgtgatg tcgcgcgca cttcgatggc gcggatggcc 3480
gcgtgtcga ttagtcgtc ccaggtgctg ccggccatgc tggcgtccgg attgcgccac 3540
gacaccagaa acaccgtatg tccctgctcc accacatggc gcaccagcga gctctccggc 3600
tgcaggtcca ggatgtagta cttgttgatg cacggcggca ccatcagcag cgggcgcgcg 3660
tgcacctgt cggtcagcgg cttgtactgc aacagctgga agtactcgtt ctcgaagacc 3720
acggcgctt cggtcaccgc gacattgcgg ccgacctcaa acgcgctctc gtcggctctg 3780

gagatcttgc cgcgtgtcag gtcttccatc atgttgcgca cgccggcacg cagcgattcg 3840
ccgccgact cgatcagcag gcgctgcgcc tcgggattgg tggcaaggaa gttggcgggc 3900
gacatcgcat cgaccattg cgagatcgcg aagcggatgc gctggcgggt cttggcatcg 3960
gcctcgacgg catcggccag ctccgtcaag gcgcgcgcat tgagcaggtga gaacgcggca 4020
gcgaagcgt atgggaggtt ggtgcgccat gcgtgcggcg cgaagcgccg gtcgtgcagc 4080
ggaccggtgg cctcggcctt gccctcggcc atggcctgcc acagcgtga gaagtcctt 4140
atgtagcgt gctggatgc acccagctgc gccggcgca tcttgacgc tgccagcgca 4200

tccaggcccc gaatgccgga cgcggccgcg tggccgttgc cttcagtgcc ctgccactgg 4260
cgggaccatt ccagccatgt ggctggatcg aatggccccg gcgtgacctt gaatggttgg 4320
gacttgcctt cctgcgtgga agctgccgcg cctttgccgg tcgcactagt aaacacaaat 4380
ttgcaaatgc aaaacagcgc aatcaccgca ataatacgc cggtcacgcc aatgcccgcc 4440
ggaatccact ggcgccagcc ggtccaccag ttatcgttat cgccctgac cggcagggtt 4500
ttatccacaa aatcatgaat aatctgatca atttatcgg taatgtttt ggtccaatca 4560
tgcggttcaa tgcagcaatc cgggcccaga atatggcagg tgccgcccc gcgctgcagc 4620

agaaaaatcaa tcgcttttgc gttcagaatg ctaaaggatg gcagttcggg ggtcgcgcgc 4680
agaaacagct gcagcgctg ggtggtttcg ttcgccagct ggcgaggcc gcaaatcagg 4740
ccatcctgt tatgcatcag gccttcaata taaatgcctt ccgccgccgg gccaaaatac 4800
ggaatccacg ccaggccaat gcgcgcct tcactctggg tggccaata atgcaggttc 4860
gggttgcatc tcggctgcgc gttcacaatc gcttcgcggc gggcgcggc gccgccgta 4920
atcaggcccc ccacgccgc aatggtgttg gtaatcaggc ccagtttgcc gctgctcgcg 4980

ctttcttcgc cggtatcctg atgatgggtg ttgttgttgc ccgcggttc gctatggttc	5040
tgccggctgg tgggtgtcgc cggatccaga aaatcggtgc ttttctggt gttggtgttt	5100
tccgctttcg ggggccccgc cgcggtggtc gcgctcgggg tatcgctcgc ggtgctatcg	5160
ttatcggtgc ggcgatgatg ctgttccacc tgggtcgctt cgctaatac cagtttatac	5220
accggggtgt tatgggtgct gttatccggg cccggtttgg tggtcaggct ctgcgggctg	5280
gtgctaattg tcgccagggt ggtcagatgg ctaccgccg cttcgcgcc ctggctatgc	5340
acctgcacca tcgcgtgct gttttcgtc gccataattt tatgatcttc ggtgggtggtg	5400
ttggtgcccc gatcgctgct ggtgcgcgcc gggctctggc cgctaattt tttcgcgccg	5460
ttgctacca cggtaaagct cagtcttcg ctgcgaattt tgcgggtcag gtttttttg	5520
gtttccaaa acgcccattc gccaatggtg gtatcaattt ccgggttcac tttccaaac	5580
agtttgccgg tgggtgttgc gcgtttgccg ctggtataaa tggtttcgtt cagctgcagc	5640
agaaactcgc gggtaaagcg gctttccagc tgcacatagg tcaggttatc cacttcaaac	5700
agatattcgg tttcgttggg gccaaagccg gtcgcctgat agcgaatggt ggtgctataa	5760
tagccgtgc tcggatcttc ggtcgcgttc accggttcgc gcagcggatg gctgctaaaa	5820
aaatcttttt tcgcctgcgg cagaatcaga aacgccacca cgccttcgc aaagtggtg	5880
ccgcgataaa tcacggtgct cgccaggcga tcatacagaa aaaacgcgcc ttctttatga	5940
aacgcaaat cgcgcgcga cgggccggtg ccgctcactt tatgcacata gcggcagcgc	6000
ggaaagccgc gaatgccatc cggcgcgcc ggcaggcatt cgctgccatc cggtttttta	6060
atttccaggt tatagcagtt ttccgcccac tcgcccgtt catagtac cactttcggc	6120
ggcacgccgc tgcgaaagcc ccagcgtttg gtcgcgctcg gcacatcggt cgccacgccg	6180
ttgccttcca ggttcaggcc cacgtcgcgc agctggttgg tgctgctcag tttatcgcg	6240
cacaccagtt tatccacatc gtcacctgc aggtgctgt tatgaatcac gccacagcga	6300
atgctaaagg tgcgtgaaa cagaataatc acccacagaa aaaagctggt gcgtttaaag	6360
cgatcgcgcg gcagctgcag aatgccggtc acgccatac tagaatctcc tatattctag	6420
agggaaaccg ttgtggtctc cctatagtga gtcgtattaa tttcgcgga tcgagatctc	6480
gacctctac gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc gccacaggtg cggttgctgg	6540
cgcctatata gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag	6600
cgcttgtttc ggcgtgggta tgggtgcagg ccccggtggc gggggactgt tgggcgcat	6660
ctccttgcat gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac ggcctcaacc tactactggg	6720

ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga ccgatgccct tgagagcctt	6780
caaccagtc agtccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg cacttatgac	6840
tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg tcattttcgg	6900
cgaggaccgc tticgctgga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgccg tattcggaat	6960
cttgcaagcc ctgctcaag ccttcgtcac tggccccgcc accaaacgtt tcggcgagaa	7020
gcaggccatt atcgccggca tggcggccga cgcgctgggc tacgtcttgc tggcgttcgc	7080
gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttcggcg gcatcgggat	7140
gccccgcttg caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca	7200
aggatcgctc gcggctctta ccagcctaac ttcgatcact ggaccgctga tcgtcacggc	7260
gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cgggttgga tggattgtag gcgccccct	7320
ataccttgtc tgcctccccg cgttcgctcg cgttgcatgg agccgggcca cctcgacctg	7380
aatggaagcc ggcggcacct cgtaacgga ttcaccactc caagaattgg agccaatcaa	7440
ttcttgcgga gaactgtgaa tgcgcaaacc aaccttggc agaacatata catcgctcc	7500
gccatctcca gcagccgcac gcggcgcatc tcgggcagcg ttgggtcctg gccacgggtg	7560
cgcatgatcg tgctcctgtc gttgaggacc cggctaggct ggcggggttg cttactggt	7620
tagcagaatg aatcacgat acgcgagcga acgtgaagcg actgctgctg caaacgtct	7680
gcgacctgag caacaacatg aatggtcttc ggtttccgtg tttcgtaaag tctggaaacg	7740
cggaagttag cgcctgcac cattatgttc cggatctgca tcgcaggatg ctgctggcta	7800
ccctgtggaa cacctacatc tgtattaacg aagcgtggc attgacctg agtgatttt	7860
ctctgggtccc gccgcatcca taccgccagt tgtttaccct cacaacgttc cagtaaccgg	7920
gcattgtcat catcagtaac ccgtatctg agcatcctct ctggtttcat cggatcatt	7980
acccccatga acagaaatcc cccttacacg gaggcacag tgaccaaaca ggaaaaaac	8040
gcccttaaca tggcccgtt tatcagaagc cagacattaa cgcttctgga gaaactaac	8100
gagctggacg cggtatgaaca ggcagacatc tgtgaatgc ttcacgacca cgctgatgag	8160
ctttaccgca gctgcctgc gcgtttcggg gatgacggg aaaacctctg acacatgcag	8220
ctcccgaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca agcccgtag	8280
ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggcgcagcca tgaccagtc acgtagcgat	8340
agcggagtgt atactggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc	8400
atatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc	8460
ttccgcttcc tcgtcactg actcgtcgcg ctcggtcgtt cggtcgcggc gagcggtatc	8520
agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa	8580

catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt	8640
tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg	8700
gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg	8760
ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag	8820
cgtaggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc	8880
caagctgggc tgtgtgcacg aacccccctg tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa	8940
ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg	9000
taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gatttcttga agtggtggcc	9060
taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatctgc gctctgctga agccagttac	9120
cttcggaaaa agagtggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg	9180
ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt	9240
gatcttttct acggggtctg acgctcagt gaacgaaaac tcacgttaag ggattttgtt	9300
catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatccttta aattaaaaat gaagtttta	9360
atcaatctaa agtatatatg agtaaaactg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga	9420
ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattcata gttgcctgac tccccgtct	9480
gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg	9540
agaccacgc tcaccggctc cagatttacc agcaataaac cagccagccg gaagggccga	9600
gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga	9660
agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctgcagg	9720
catcgtgggt tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgac	9780
aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc	9840
gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca	9900
taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggt agtactcaac	9960
caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttccccgg cgtcaacacg	10020
ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcatggaa aacgttcttc	10080
ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg	10140
tgacccaac tgatcttcag catcttttac tttaccagc gtttctgggt gagcaaaaac	10200
aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt gaatactcat	10260
actcttctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata	10320
catatttgaa tgtattttag aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa	10380
agtgccacct gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg	10440

tatcacgagg ccctttcgtc ttcaagaa

10468

<210> 50

<211> 1960

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> ZEBOVGP-PhaC-SEBOVGP fusion polypeptide encoded by
pET-14b-ZEBOVGP-PhaC-SEBOVGP

<400> 50

Met Gly Val Thr Gly Ile Leu Gln Leu Pro Arg Asp Arg Phe Lys Arg

1 5 10 15

Thr Ser Phe Phe Leu Trp Val Ile Ile Leu Phe Gln Arg Thr Phe Ser

20 25 30

Ile Pro Leu Gly Val Ile His Asn Ser Thr Leu Gln Val Ser Asp Val

35 40 45

Asp Lys Leu Val Cys Arg Asp Lys Leu Ser Ser Thr Asn Gln Leu Arg

50 55 60

Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Asn Gly Val Ala Thr Asp Val Pro

65 70 75 80

Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val

85 90 95

Val Asn Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu

100 105 110

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

115 120 125

Ile Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Val Ser Gly Thr

130 135 140

Gly Pro Cys Ala Gly Asp Phe Ala Phe His Lys Glu Gly Ala Phe Phe

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Glu Gly Val Val Ala Phe Leu Ile Leu Pro Gln Ala Lys Lys Asp

180	185	190	
Phe Phe Ser Ser His Pro Leu Arg Glu Pro Val Asn Ala Thr Glu Asp			
195	200	205	
Pro Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Ile Arg Tyr Gln Ala Thr Gly			
210	215	220	
Phe Gly Thr Asn Glu Thr Glu Tyr Leu Phe Glu Val Asp Asn Leu Thr			
225	230	235	240
Tyr Val Gln Leu Glu Ser Arg Phe Thr Pro Gln Phe Leu Leu Gln Leu			
245	250	255	
Asn Glu Thr Ile Tyr Thr Ser Gly Lys Arg Ser Asn Thr Thr Gly Lys			
260	265	270	
Leu Ile Trp Lys Val Asn Pro Glu Ile Asp Thr Thr Ile Gly Glu Trp			
275	280	285	
Ala Phe Trp Glu Thr Lys Lys Asn Leu Thr Arg Lys Ile Arg Ser Glu			
290	295	300	
Glu Leu Ser Phe Thr Val Val Ser Asn Gly Ala Lys Asn Ile Ser Gly			
305	310	315	320
Gln Ser Pro Ala Arg Thr Ser Ser Asp Pro Gly Thr Asn Thr Thr Thr			
325	330	335	
Glu Asp His Lys Ile Met Ala Ser Glu Asn Ser Ser Ala Met Val Gln			
340	345	350	
Val His Ser Gln Gly Arg Glu Ala Ala Val Ser His Leu Thr Thr Leu			
355	360	365	
Ala Thr Ile Ser Thr Ser Pro Gln Ser Leu Thr Thr Lys Pro Gly Pro			
370	375	380	
Asp Asn Ser Thr His Asn Thr Pro Val Tyr Lys Leu Asp Ile Ser Glu			
385	390	395	400
Ala Thr Gln Val Glu Gln His His Arg Arg Thr Asp Asn Asp Ser Thr			
405	410	415	
Ala Ser Asp Thr Pro Ser Ala Thr Thr Ala Ala Gly Pro Pro Lys Ala			
420	425	430	

Glu Asn Thr Asn Thr Ser Lys Ser Thr Asp Phe Leu Asp Pro Ala Thr
 435 440 445
 Thr Thr Ser Pro Gln Asn His Ser Glu Thr Ala Gly Asn Asn Asn Thr
 450 455 460
 His His Gln Asp Thr Gly Glu Glu Ser Ala Ser Ser Gly Lys Leu Gly
 465 470 475 480
 Leu Ile Thr Asn Thr Ile Ala Gly Val Ala Gly Leu Ile Thr Gly Gly
 485 490 495

 Arg Arg Thr Arg Arg Glu Ala Ile Val Asn Ala Gln Pro Lys Cys Asn
 500 505 510
 Pro Asn Leu His Tyr Trp Thr Thr Gln Asp Glu Gly Ala Ala Ile Gly
 515 520 525
 Leu Ala Trp Ile Pro Tyr Phe Gly Pro Ala Ala Glu Gly Ile Tyr Ile
 530 535 540
 Glu Gly Leu Met His Asn Gln Asp Gly Leu Ile Cys Gly Leu Arg Gln
 545 550 555 560

 Leu Ala Asn Glu Thr Thr Gln Ala Leu Gln Leu Phe Leu Arg Ala Thr
 565 570 575
 Thr Glu Leu Arg Thr Phe Ser Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe
 580 585 590
 Leu Leu Gln Arg Trp Gly Gly Thr Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys
 595 600 605
 Cys Ile Glu Pro His Asp Trp Thr Lys Asn Ile Thr Asp Lys Ile Asp
 610 615 620

 Gln Ile Ile His Asp Phe Val Asp Lys Thr Leu Pro Asp Gln Gly Asp
 625 630 635 640
 Asn Asp Asn Trp Trp Thr Gly Trp Arg Gln Trp Ile Pro Ala Gly Ile
 645 650 655
 Gly Val Thr Gly Val Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu Phe Cys Ile Cys
 660 665 670
 Lys Phe Val Phe Thr Ser Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr

675 680 685
 Gln Glu Gly Lys Ser Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp
 690 695 700
 Pro Ala Thr Trp Leu Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly
 705 710 715 720
 Asn Gly His Ala Ala Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala
 725 730 735
 Gly Val Lys Ile Ala Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr
 740 745 750

 Met Lys Asp Phe Ser Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala
 755 760 765
 Glu Ala Thr Gly Pro Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp
 770 775 780
 Arg Thr Asn Leu Pro Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn
 785 790 795 800
 Ala Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys
 805 810 815

 Thr Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met
 820 825 830
 Ser Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu
 835 840 845
 Ile Glu Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val Arg Asn Met Met
 850 855 860
 Glu Asp Leu Thr Arg Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe
 865 870 875 880

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

Ile Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu
930 935 940

Gln Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser
945 950 955 960

Met Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg
965 970 975

Ala Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val
980 985 990

Leu Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val
995 1000 1005

Leu Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu
1010 1015 1020

Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe
1025 1030 1035

Val Asp Glu Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly
1040 1045 1050

Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala
1055 1060 1065

Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr
1070 1075 1080

Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp
1085 1090 1095

Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp
1100 1105 1110

Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys
1115 1120 1125

Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp Leu Ala
1130 1135 1140

Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His
1145 1150 1155

Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala

1160	1165	1170
Asn Lys Leu Arg Phe Val	Leu Gly Ala Ser Gly His	Ile Ala Gly
1175	1180	1185
Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys	Asn Lys Arg Ser His	Trp Thr Asn
1190	1195	1200
Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro	Gln Gln Trp Leu Ala	Gly Ala Ile
1205	1210	1215
Glu His His Gly Ser Trp Trp	Pro Asp Trp Thr Ala	Trp Leu Ala
1220	1225	1230
Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg	Ala Ala Pro Ala Asn	Tyr Gly Asn
1235	1240	1245
Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu	Pro Ala Pro Gly Arg	Tyr Val Lys
1250	1255	1260
Ala Lys Ala His Met Val Leu	Ala Val Ala Ile Asp	Lys Arg Gly
1265	1270	1275
Gly Gly Gly Gly Leu Glu Met	Gly Gly Leu Ser Leu	Leu Gln Leu
1280	1285	1290
Pro Arg Asp Lys Phe Arg Lys	Ser Ser Phe Phe Val	Trp Val Ile
1295	1300	1305
Ile Leu Phe Gln Lys Ala Phe	Ser Met Pro Leu Gly	Val Val Thr
1310	1315	1320
Asn Ser Thr Leu Glu Val Thr	Glu Ile Asp Gln Leu	Val Cys Lys
1325	1330	1335
Asp His Leu Ala Ser Thr Asp	Gln Leu Lys Ser Val	Gly Leu Asn
1340	1345	1350
Leu Glu Gly Ser Gly Val Ser	Thr Asp Ile Pro Ser	Ala Thr Lys
1355	1360	1365
Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly	Val Pro Pro Lys Val	Val Ser Tyr
1370	1375	1380
Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu	Asn Cys Tyr Asn Leu	Glu Ile Lys
1385	1390	1395

Lys Pro	Asp Gly Ser Glu Cys	Leu Pro Pro Pro Pro	Asp Gly Val
1400	1405	1410	
Arg Gly	Phe Pro Arg Cys Arg	Tyr Val His Lys Ala	Gln Gly Thr
1415	1420	1425	
Gly Pro	Cys Pro Gly Asp Tyr	Ala Phe His Lys Asp	Gly Ala Phe
1430	1435	1440	
Phe Leu	Tyr Asp Arg Leu Ala	Ser Thr Val Ile Tyr	Arg Gly Val
1445	1450	1455	
Asn Phe	Ala Glu Gly Val Ile	Ala Phe Leu Ile Leu	Ala Lys Pro
1460	1465	1470	
Lys Glu	Thr Phe Leu Gln Ser	Pro Pro Ile Arg Glu	Ala Val Asn
1475	1480	1485	
Tyr Thr	Glu Asn Thr Ser Ser	Tyr Tyr Ala Thr Ser	Tyr Leu Glu
1490	1495	1500	
Tyr Glu	Ile Glu Asn Phe Gly	Ala Gln His Ser Thr	Thr Leu Phe
1505	1510	1515	
Lys Ile	Asp Asn Asn Thr Phe	Val Arg Leu Asp Arg	Pro His Thr
1520	1525	1530	
Pro Gln	Phe Leu Phe Gln Leu	Asn Asp Thr Ile His	Leu His Gln
1535	1540	1545	
Gln Leu	Ser Asn Thr Thr Gly	Arg Leu Ile Trp Thr	Leu Asp Ala
1550	1555	1560	
Asn Ile	Asn Ala Asp Ile Gly	Glu Trp Ala Phe Trp	Glu Asn Lys
1565	1570	1575	
Lys Asn	Leu Ser Glu Gln Leu	Arg Gly Glu Glu Leu	Ser Phe Glu
1580	1585	1590	
Ala Leu	Ser Leu Asn Glu Thr	Glu Asp Asp Asp Ala	Ala Ser Ser
1595	1600	1605	
Arg Ile	Thr Lys Gly Arg Ile	Ser Asp Arg Ala Thr	Arg Lys Tyr
1610	1615	1620	
Ser Asp	Leu Val Pro Lys Asn	Ser Pro Gly Met Val	Pro Leu His

1625	1630	1635
Ile Pro Glu Gly Glu Thr Thr	Leu Pro Ser Gln Asn	Ser Thr Glu
1640	1645	1650
Gly Arg Arg Val Gly Val Asn	Thr Gln Glu Thr	Ile Thr Glu Thr
1655	1660	1665
Ala Ala Thr Ile Ile Gly Thr	Asn Gly Asn His Met	Gln Ile Ser
1670	1675	1680
Thr Ile Gly Ile Arg Pro Ser	Ser Ser Gln Ile Pro	Ser Ser Ser
1685	1690	1695
Pro Thr Thr Ala Pro Ser Pro	Glu Ala Gln Thr Pro	Thr Thr His
1700	1705	1710
Thr Ser Gly Pro Ser Val Met	Ala Thr Glu Glu Pro	Thr Thr Pro
1715	1720	1725
Pro Gly Ser Ser Pro Gly Pro	Thr Thr Glu Ala Pro	Thr Leu Thr
1730	1735	1740
Thr Pro Glu Asn Ile Thr Thr	Ala Val Lys Thr Val	Leu Pro Gln
1745	1750	1755
Glu Ser Thr Ser Asn Gly Leu	Ile Thr Ser Thr Val	Thr Gly Ile
1760	1765	1770
Leu Gly Ser Leu Gly Leu Arg	Lys Arg Ser Arg Arg	Gln Thr Asn
1775	1780	1785
Thr Lys Ala Thr Gly Lys Cys	Asn Pro Asn Leu His	Tyr Trp Thr
1790	1795	1800
Ala Gln Glu Gln His Asn Ala	Ala Gly Ile Ala Trp	Ile Pro Tyr
1805	1810	1815
Phe Gly Pro Gly Ala Glu Gly	Ile Tyr Thr Glu Gly	Leu Met His
1820	1825	1830
Asn Gln Asn Ala Leu Val Cys	Gly Leu Arg Gln Leu	Ala Asn Glu
1835	1840	1845
Thr Thr Gln Ala Leu Gln Leu	Phe Leu Arg Ala Thr	Thr Glu Leu
1850	1855	1860

Arg Thr Tyr Thr Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe Leu Leu
 1865 1870 1875
 Arg Arg Trp Gly Gly Thr Cys Arg Ile Leu Gly Pro Asp Cys Cys
 1880 1885 1890
 Ile Glu Pro His Asp Trp Thr Lys Asn Ile Thr Asp Lys Ile Asn
 1895 1900 1905

Gln Ile Ile His Asp Phe Ile Asp Asn Pro Leu Pro Asn Gln Asp
 1910 1915 1920
 Asn Asp Asp Asn Trp Trp Thr Gly Trp Arg Gln Trp Ile Pro Ala
 1925 1930 1935
 Gly Ile Gly Ile Thr Gly Ile Ile Ile Ala Ile Ile Ala Leu Leu
 1940 1945 1950
 Cys Val Cys Lys Leu Leu Cys
 1955 1960

<210> 51
 <211> 10468
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220><223> Synthetic construct - pET-SEBOVGP-PhaC-ZEBOVGP

<400> 51
 ttctcatgtt tgacagctta tcatcgataa gctttaatgc ggtagtttat cacagttaaa 60
 ttgctaacgc agtcaggcac cgtgtatgaa atctaacaat gcgctcatcg tcatcctcgg 120
 caccgtcacc ctggatgctg taggcataagg ctgggttatg ccggtactgc cgggcctctt 180
 gcgggatatc gtccattccg acagcatcgc cagtcactat ggctgtgtgc tagcgtata 240
 tgcgttgatg caatttctat gcgcacccgt tctcggagca ctgtccgacc gctttggccg 300
 ccgcccagtc ctgctcgctt cgctacttgg agccactatc gactacgcga tcatggcgac 360
 cacaccgtc ctgtggatat ccggatatag ttctcctttt cagcaaaaaa cccctcaaga 420
 cccgtttaga ggccccaagg gggttatgcta gttattgctc agcgggtggca gcagccaact 480
 cagcttcctt tcgggctttg ttagcagccg gatccttaaa acacaaattt gcaaatgcaa 540
 aacacgcgaa tcaccgcaat aatcacgccg gtcacgccaa tgcccgccgg aatccactgg 600
 cgccagccgg tccaccagtt atcgttatcg cctgatccg gcagggtttt atccacaaaa 660
 tcatgaataa tctgatcaat tttatcggtat atgttttttg tccaatcatg cggttcaatg 720

cagcaatccg ggcccagaat atggcagggtg ccgccccagc gctgcagcag aaaatcaatc 780

gctttgcggt tcagaatgct aaagggtgcgc agttcgggtgg tcgcgcgcag aaacagctgc 840

agcgcttggg tggtttcggt cgccagctgg cgcaggccgc aaatcaggcc atcctgggta 900

tgcacagcgc cttaaatata aatgccttcc gccgccgggc caaaatacgg aatccacgcc 960

aggccaatcg ccgcgccttc atcctgggtg gtccaataat gcaggttcgg gttgcatttc 1020

ggctgcgcgt tcacaatcgc ttccgcggcg gtgcggcggc cgcgggtaat caggcccgcc 1080

acgcccgcaa tgggtgttgt aatcaggccc agtttgccgc tgctcgcgt ttcttcgccg 1140

gtatcctgat gatgggtgtt gttgttgccc gcggtttcgc tatggttctg cgggctggtg 1200

gtggtgcgcg gatccagaaa atcgggtgctt ttgctggtgt tgggttttc cgcttcggc 1260

gggcccgcgc cgggtgtgc gctcgggta tcgctcgcgg tgctatcgtt atcgggtcgg 1320

cgatgatgct gttccacctg ggtcgttctg ctaatatcca gtttatacac cggggtgta 1380

tgggtgctgt tatccggccc cggtttggtg gtcaggctct gcgggctggt gctaattggtc 1440

gccagggtgg tcagatggct caccgccgt tcgcggccct ggctatgcac ctgcaccatc 1500

gcgtgctgt ttctcgtcgc cataatttta tgatcttcgg tgggtgtgtt ggtgcccgga 1560

tcgtgctgg tcgcgcgcgc gctctggccg ctaatgtttt tcgcgccgtt gtcaccacg 1620

gtaaagctca gttcttcgt gcgaattttg cgggtcagggt ttttttgggt ttcccaaac 1680

gcccattcgc caatggttgt atcaatttcc gggttcactt tccaaatcag ttgcccgtg 1740

gtgttgctgc gtttgccgt ggtataaatg gtttcgttca gctgcagcag aaactgcggg 1800

gtaaagcggc ttccagctg cacataggtc aggttatcca cttcaaacag atattcggtt 1860

tcgttggtgc caaagccgt cgcctgatag cgaatggtgg tgctataata gccgtgctc 1920

ggatcttcgg tcgcttcac cggttcgcgc agcggatggc tgctaaaaaa atcttttttc 1980

gcctgcggca gaatcagaaa cgccaccacg ccttcgcaa aggtggtgcc gcgataaatc 2040

acggtgctcg ccaggcgatc atacagaaaa aacgcgcctt ctttatgaaa cgcaaatcg 2100

cccgcgcacg ggccggtgcc gtcacttta tgcacatagc ggcagcgcgg aaagccgga 2160

atgccatccg gcgccgccg caggcattcg ctgccatccg gttttttaat ttccaggta 2220

tagcagtttt ccgccattc gcccgcttca tagttacca ctttcggcgg cagccgctg 2280

cgaaagcccc agcgttttgt cgcgtcggc acatcggtcg ccacgccgtt gccttcagg 2340

ttcaggccca cgctgcgcag ctggttggtg ctgctcagtt tatcgcgca caccagtta 2400

tccacatcgc tcacctgcag ggtgctgtta tgaatcacgc ccagcgaat gctaaagggtg 2460

cgctgaaca gaataatcac ccacagaaaa aagctggtgc gtttaaagcg atcgcgcggc 2520

agctgcagaa tgccggtcac gcccatctcg aggctccac cgcctccgcg ttatcaatc 2580

gccaccgcca gcacatatg tgccttggct ttgacgtatc gccaggcgcg gggttcgatt 2640

gcgcgatagc gcgcattgcc atagtggcg ggcgcgcgcg gtttcgcgcc ggctgccc 2700

gccagccatg cggtcagtc cggccaccag ctgccgtgat gctcgatggc gccggccagc 2760

cattgtcgcg gcgactccgg cagcgcatcg ttagtcagtg ggctgcgctt gtctttggcc 2820

ggcgggttga tcacaccggc gatatggccc gacgcacca gcacgaagcg cagcttgttc 2880

gccagcagcg cggtcgaggc ataggccgcg gtccacggca cgatatggtc ttcgcgcgag 2940

ccgtagatat aggtcggcac gtcgatgctg gccaggcca ccggcacgcc gcacacggtc 3000

agcttgcccc gtaccttagc ctctgtctgc aggtaggtgt ggcgaggta ccagcagtac 3060

cacggccccg gcaggttggt ggctgcgcg ttccagaaca gcaggtcgaa cggcaccggc 3120

gtgttgccct tcaggtagtt gtgcaccacg tagttccaca ccaggtcgtt cggcgcaag 3180

aacgagaagg tattggccag ctcaaggccg cgcagcagcg cgcacggcg gccggcgccg 3240

ccgccagcg tggcctcgcg caactgcaca tggcctcgt cgacaaagac gtcgaggatg 3300

cccgtgtcgg caaagtcag cagcgtggtc agcagcgtga cgctggcgcg cgggtgctcg 3360

ccgcgcgcgg ccagcaccgc cagcgcggtc gagacaatgg tgccgccac gcagaagccg 3420

agcacgttga tctgtcctg gccgtgatg tcgcgcgca cttcgatggc gcgcatggcc 3480

gcgtgtcga ttagtcgtc ccaggtgtc cggccatgc tggcgtccg attgcgccac 3540

gacaccagaa acaccgtatg tcctgtctc accacatggc gcaccagcga gctctccggc 3600

tgcaggtcca ggatgtagta cttgttgatg cagggcgga ccatcagcag cggcgcgcg 3660

tgcacctgt cggtcagcgg cttgtactgc aacagctgga agtactcgt ctcgaagacc 3720

acggcgctt cggtcaccgc gacattgcgg ccgacctcaa acgcgtctc gtcggtctgc 3780

gagatcttgc cgcgtgtcag gtcttccatc atgttgcga cgcggcacg cagcattcg 3840

ccgccgact cgatcagcag gcgtgcgcc tcgggattgg tggcaaggaa gttggcgggc 3900

gacatcgcat cgaccattg cgagatcgcg aagcggatgc gctggcgggt cttggcatcg 3960

gcctcgacgg catcgccag ctcggtcaag gcgcgcgat tgagcaggtga gaacgcggca 4020

gcgaagcgat atgggaggtt ggtgcgcat gcgtcgccg cgaagcgccg gtcgtgcagc 4080

ggaccggtgg cctcgccctt gccctcgcc atggcctgcc acagcgtga gaagtccttc 4140

atgtagcgt gctggatgc accagctgc gccggcgca tcttgacgcc tgccagcgca 4200

tccaggcccc gaatgccga cgcggccgcg tggcgttgc cttcagtgcc ctgccactgg 4260

cgggaccatt ccagccatgt ggctggatcg aatggccccg gcgtgacctt gaatggttgg 4320

gacttgcctt cctgcgtgga agctgccgcg cctttgccgg tcgcactagt gcacagcagt 4380
 ttgcacacgc acagcagcgc aataatcgca ataataatgc cggtaatgcc aatgcccgc 4440
 ggaatccact ggcgccagcc ggtccaccag ttatcatcgt tatcctggtt cggcagcggg 4500
 ttatcaataa aatcatgaat aatctgggtta attttatcgg taatgttttt ggtccaatca 4560

tgcggttcaa tgcagcaatc cgggcccaga atgcggcagg tgccgcccc a gcggcgcagc 4620
 agaaaatcaa tcgctttgcg gttcagaatg gtataggtgc gcagttcggg ggtcgcgcgc 4680
 agaaacagct gcagcgcctg ggtgggtttcg ttgccagct ggcgccaggcc gcacaccagc 4740
 gcgttctggt tatgcatcag gccttcggta taaatgcctt ccgcgcccgg gccaaaatac 4800
 ggaatccacg caatgccgcg cgcgttatgc tgttctgcg cggccaata atgcaggttc 4860
 gggttgcatt tgccggtcgc tttggtgttg gtctggcggc ggctgcgttt gcgcaggccc 4920
 aggctgcccc gaatgccggt caggtgtctg gtaatcaggc cgttgctggt gctttcctgc 4980

ggcagcacgg ttttcaccgc ggtggtaatg ttttcggggg tggtcagggt cggcgcttcg 5040
 gtggtcgggc ccgggctgct gcccggcggg gtggtcgggt cttcggtcgc catcacgctc 5100
 gggccgctgg tatgggtggt cggggtctgc gcttcgggc tcggcgcggt ggtcgggctg 5160
 ctgctcgga tctgggtgct gctcgggcga atgccaatgg tgctaactcg catatggttg 5220
 ccgttggtgc caataatggt cgcgcgggtt tcggtaatgg tttcctgggt gttcacgcc 5280
 acgcggcggc cttcgggtgct gttctggctc ggccagggtgg tttcgcttc cggaatatgc 5340
 agcggcacca tgcccgggct gtttttcggc accagatcgc tataatttcg ggtcgcgcga 5400

tcgctaatgc ggcctttggt aatgcggctg ctgcgccat catcatcttc ggtttcgttc 5460
 aggctcagcg cttaaaagct cagttcttcg ccgcgcagct gttcgtcag gtttttttg 5520
 ttttccaaa acgcccattc gccaatatcc gcgttaatgt tcgcatccag ggtccaaatc 5580
 aggccgcccg tggtgttgct cagctgctga tgcagatgaa tggatatggt cagctgaaac 5640
 agaaactgcg ggglatgcgg gcgatccagg gcacaaaagg tgttgttatc aattttaaac 5700
 aggttggtgc tatgctgcgc gccaaagttt tcaatttcac attccagata gctggtcgca 5760
 taatagctgc tgggtgtttc ggtatagttc accgcttcgc gaatcggcgg gctctgcaga 5820

aaggtttctt tcggtttcgc cagaatcaga aacgcaatca cgccttcgc aaagttcacg 5880
 ccgcgataaa tcacggtgct gccagggcga tcatacagaa aaaacgcgcc atctttatga 5940
 aacgcataat cgcggggca cgggcccgtg ccctgcgctt tatgcacata gcggcagcgc 6000
 ggaaagccgc gcacgccatc cggcggcggc ggcaggcatt cgctgccatc cggtttttta 6060
 atttcagggt tatagcagtt ttccgcccac tcgcccgtt catagctcac cactttcggc 6120
 ggcacgccgc tgcgaaagcc ccagcgtttg gtgcgcgtcg gaatatcggg gctcacgccg 6180

ctgccttcca gggtcaggcc cacgcttttc agctgatcgg tgctcgccag atgatctttg 6240

cacaccagct gatcaatttc ggtcacttcc aggggtgctgt tggtcaccac gcccagcggc 6300

atgctaaacg ctttctgaaa cagaataatc acccacacaa aaaagctgct tttgcgaaat 6360

ttatcgcgcg gcagctgcag caggctcagg ccgcccatc tagaatctcc tatattctag 6420

agggaaacgc ttgtggtctc cctatagtga gtcgtattaa tttcgcggga tcgagatctc 6480

gacctctac gccggacgca tcgtggccgg catcacgggc gccacaggtg cggttgctgg 6540

cgcctatcgc gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag 6600

cgttcttttc ggctgaggta tggtagcagg cccctggcc gggggactgt tgggcgcat 6660

ctccttgcat gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac ggcctcaacc tactactggg 6720

ctgcttcta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga ccgatgccct tgagagcctt 6780

caaccacgct agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg cacttatgac 6840

tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg tcattttcgg 6900

cgaggaccgc tttcgttga gcgcgacgat gatcgccctg tcgcttgcgg tattcggaat 6960

cttgacgccc ctgctcaag ccttcgtcac tggccccgc accaaacgtt tcggcgagaa 7020

gcaggccatt atcgccggca tggcggccga cgcgctgggc tacgtcttgc tggcgctcgc 7080

gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttcggcg gcacgggat 7140

gcccgcgttg caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca 7200

aggatcgctc gggctctta ccagcctaac ttcgatcact ggaccgctga tcgtcacggc 7260

gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cgggttggca tggattgtag gcgccgccct 7320

ataccttgct tgctccccg cgttgcgtcg cgttgcatgg agccgggcca cctcgacctg 7380

aatggaagcc ggcggcacct cgctaacgga ttcaccactc caagaattgg agccaatcaa 7440

ttcttgcgga gaactgtgaa tgcgcaaacc aacccttggc agaacatc catcgctcc 7500

gccatctcca gcagccgcac gcggcgcatc tcgggcagcg ttgggtcctg gccacgggtg 7560

cgcatgatcg tgctcctgct gttgaggacc cgctaggct ggcggggttg cttactggt 7620

tagcagaatg aatcacgat acgcgagcga acgtgaagcg actgctgctg caaacgtct 7680

gcgacctgag caacaacatg aatggtcttc ggtttccgtg tttcgtaaag tctgaaacg 7740

cggaagttag cgcctgcac cattatgttc cggatctgca tcgcaggatg ctgctggcta 7800

cccttggaac cacctacatc tgtattaacg aagcgtggc attgaccctg agtgatcttt 7860

ctctggctcc gccgatcca taccgccagt tgtttacct cacaacgttc cagtaaccgg 7920

gcatgttcat catcagtaac ccgtatcgtg agcatcctct ctcgtttcat cggatcatt	7980
acccccatga acagaaatcc cccttacacg gaggcacag tgaccaaaca ggaaaaaacc	8040
gcccttaaca tggcccgtt tatcagaagc cagacattaa cgcttctgga gaaactcaac	8100
gagctggacg cggatgaaca ggcagacatc tgtgaatcgc ttcacgacca cgctgatgag	8160
ctttaccgca gctgcctcgc gcgtttcgtt gatgacggtg aaaacctctg acacatgcag	8220
ctcccgaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca agcccgtag	8280
ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggcgcagcca tgaccagtc acgtagcgat	8340
agcggagtgt atactggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc	8400
atataatgcgg tgtgaaatc cgacacagatg cgttaaggaga aaataccgca tcaggcgctc	8460
ttccgcttcc tcgtcactg actcgtcgc ctcggctcgtt cggctgcggc gagcggatc	8520
agctcactca aaggcggtaa tacggttatt cacagaatca ggggataacg caggaaagaa	8580
catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgctg tgctggcgtt	8640
tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa gtcagagggtg	8700
gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg	8760
ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag	8820
cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc	8880
caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa	8940
ctatcgtctt gactccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg	9000
taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgtgtctaca gatttcttga agtggtggcc	9060
taactacggc tactagtaa ggacagtatt tggatatcgc gctctgctga agccagttac	9120
cttcggaaaa agagtggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcggtagg	9180
tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt	9240
gatcttttct acggggtctg acgctcagt gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt	9300
catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttaa	9360
atcaatctaa agtatatatg agtaaaactg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga	9420
ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattcata gttgcctgac tccccgtcgt	9480
gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtctgcaa tgataccgcg	9540
agaccacgc tcaccggctc cagatttatt agcaataaac cagccagccg gaagggccga	9600
gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga	9660
agctagagta agtagttcgc cagttaatag ttgacgcaac gttgttgcca ttgctgcagg	9720
catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agtccgggtt cccaacgac	9780

aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc 9840
gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca 9900
taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg agtactcaac 9960
caagtcattc tgagaatagt gtatgctggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaacacg 10020

ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc 10080
ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg 10140
tgcaccaac tgatcttcag catcttttac ttccaccagc gtttctgggt gagcaaaaac 10200
aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt gaatactcat 10260
actcttctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata 10320
catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa 10380
agtgccacct gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg 10440

tatcacgagg ccctttcgtc ttcaagaa 10468

<210> 52

<211> 1960

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> SEBOVGP-PhaC-ZEBOVGO fusion polypeptide encoded by
pET-14b-SEBOVGP-PhaC-ZEBOVGO

<400> 52

Met Gly Gly Leu Ser Leu Leu Gln Leu Pro Arg Asp Lys Phe Arg Lys

1 5 10 15

Ser Ser Phe Phe Val Trp Val Ile Ile Leu Phe Gln Lys Ala Phe Ser

20 25 30

Met Pro Leu Gly Val Val Thr Asn Ser Thr Leu Glu Val Thr Glu Ile

35 40 45

Asp Gln Leu Val Cys Lys Asp His Leu Ala Ser Thr Asp Gln Leu Lys

50 55 60

Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Ser Gly Val Ser Thr Asp Ile Pro

65 70 75 80

Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val

85 90 95

Val Ser Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu
100 105 110

Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Pro Pro Pro Asp Gly
115 120 125

Val Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Ala Gln Gly Thr
130 135 140

Gly Pro Cys Pro Gly Asp Tyr Ala Phe His Lys Asp Gly Ala Phe Phe
145 150 155 160

Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr Arg Gly Val Asn Phe
165 170 175

Ala Glu Gly Val Ile Ala Phe Leu Ile Leu Ala Lys Pro Lys Glu Thr
180 185 190

Phe Leu Gln Ser Pro Pro Ile Arg Glu Ala Val Asn Tyr Thr Glu Asn
195 200 205

Thr Ser Ser Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Leu Glu Tyr Glu Ile Glu Asn
210 215 220

Phe Gly Ala Gln His Ser Thr Thr Leu Phe Lys Ile Asp Asn Asn Thr
225 230 235 240

Phe Val Arg Leu Asp Arg Pro His Thr Pro Gln Phe Leu Phe Gln Leu
245 250 255

Asn Asp Thr Ile His Leu His Gln Gln Leu Ser Asn Thr Thr Gly Arg
260 265 270

Leu Ile Trp Thr Leu Asp Ala Asn Ile Asn Ala Asp Ile Gly Glu Trp
275 280 285

Ala Phe Trp Glu Asn Lys Lys Asn Leu Ser Glu Gln Leu Arg Gly Glu
290 295 300

Glu Leu Ser Phe Glu Ala Leu Ser Leu Asn Glu Thr Glu Asp Asp Asp
305 310 315 320

Ala Ala Ser Ser Arg Ile Thr Lys Gly Arg Ile Ser Asp Arg Ala Thr
325 330 335

Arg Lys Tyr Ser Asp Leu Val Pro Lys Asn Ser Pro Gly Met Val Pro

				340						345					350				
Leu	His	Ile	Pro	Glu	Gly	Glu	Thr	Thr	Leu	Pro	Ser	Gln	Asn	Ser	Thr				
		355						360					365						
Glu	Gly	Arg	Arg	Val	Gly	Val	Asn	Thr	Gln	Glu	Thr	Ile	Thr	Glu	Thr				
		370					375					380							
Ala	Ala	Thr	Ile	Ile	Gly	Thr	Asn	Gly	Asn	His	Met	Gln	Ile	Ser	Thr				
385					390					395								400	
Ile	Gly	Ile	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Gln	Ile	Pro	Ser	Ser	Ser	Pro	Thr				
				405					410						415				
Thr	Ala	Pro	Ser	Pro	Glu	Ala	Gln	Thr	Pro	Thr	Thr	His	Thr	Ser	Gly				
			420					425					430						
Pro	Ser	Val	Met	Ala	Thr	Glu	Glu	Pro	Thr	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Ser				
		435						440				445							
Pro	Gly	Pro	Thr	Thr	Glu	Ala	Pro	Thr	Leu	Thr	Thr	Pro	Glu	Asn	Ile				
		450					455				460								
Thr	Thr	Ala	Val	Lys	Thr	Val	Leu	Pro	Gln	Glu	Ser	Thr	Ser	Asn	Gly				
465					470					475					480				
Leu	Ile	Thr	Ser	Thr	Val	Thr	Gly	Ile	Leu	Gly	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg				
				485					490					495					
Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Gln	Thr	Asn	Thr	Lys	Ala	Thr	Gly	Lys	Cys	Asn				
			500						505					510					
Pro	Asn	Leu	His	Tyr	Trp	Thr	Ala	Gln	Glu	Gln	His	Asn	Ala	Ala	Gly				
		515						520				525							
Ile	Ala	Trp	Ile	Pro	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Ala	Glu	Gly	Ile	Tyr	Thr				
		530					535					540							
Glu	Gly	Leu	Met	His	Asn	Gln	Asn	Ala	Leu	Val	Cys	Gly	Leu	Arg	Gln				
545					550					555					560				
Leu	Ala	Asn	Glu	Thr	Thr	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe	Leu	Arg	Ala	Thr				
				565					570				575						
Thr	Glu	Leu	Arg	Thr	Tyr	Thr	Ile	Leu	Asn	Arg	Lys	Ala	Ile	Asp	Phe				
				580					585				590						

Leu Leu Arg Arg Trp Gly Gly Thr Cys Arg Ile Leu Gly Pro Asp Cys
 595 600 605

 Cys Ile Glu Pro His Asp Trp Thr Lys Asn Ile Thr Asp Lys Ile Asn
 610 615 620
 Gln Ile Ile His Asp Phe Ile Asp Asn Pro Leu Pro Asn Gln Asp Asn
 625 630 635 640
 Asp Asp Asn Trp Trp Thr Gly Trp Arg Gln Trp Ile Pro Ala Gly Ile
 645 650 655
 Gly Ile Thr Gly Ile Ile Ile Ala Ile Ile Ala Leu Leu Cys Val Cys
 660 665 670

 Lys Leu Leu Cys Thr Ser Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr
 675 680 685
 Gln Glu Gly Lys Ser Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp
 690 695 700
 Pro Ala Thr Trp Leu Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly
 705 710 715 720
 Asn Gly His Ala Ala Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala
 725 730 735

 Gly Val Lys Ile Ala Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr
 740 745 750
 Met Lys Asp Phe Ser Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala
 755 760 765
 Glu Ala Thr Gly Pro Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp
 770 775 780
 Arg Thr Asn Leu Pro Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn
 785 790 795 800

 Ala Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys
 805 810 815
 Thr Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met
 820 825 830
 Ser Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu

835	840	845
Ile Glu Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val Arg Asn Met Met		
850	855	860
Glu Asp Leu Thr Arg Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe		
865	870	875
Glu Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu		
885	890	895
Asn Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val		
900	905	910
His Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr		
915	920	925
Ile Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu		
930	935	940
Gln Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser		
945	950	955
Met Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg		
965	970	975
Ala Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val		
980	985	990
Leu Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val		
995	1000	1005
Leu Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu		
1010	1015	1020
Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe		
1025	1030	1035
Val Asp Glu Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly		
1040	1045	1050
Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala		
1055	1060	1065
Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr		
1070	1075	1080

Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp		
1085	1090	1095
Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp		
1100	1105	1110
Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys		
1115	1120	1125
Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp Leu Ala		
1130	1135	1140
Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His		
1145	1150	1155
Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala		
1160	1165	1170
Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly		
1175	1180	1185
Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr Asn		
1190	1195	1200
Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile		
1205	1210	1215
Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala		
1220	1225	1230
Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn		
1235	1240	1245
Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys		
1250	1255	1260
Ala Lys Ala His Met Val Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg Gly		
1265	1270	1275
Gly Gly Gly Gly Leu Glu Met Gly Val Thr Gly Ile Leu Gln Leu		
1280	1285	1290
Pro Arg Asp Arg Phe Lys Arg Thr Ser Phe Phe Leu Trp Val Ile		
1295	1300	1305
Ile Leu Phe Gln Arg Thr Phe Ser Ile Pro Leu Gly Val Ile His		

1310	1315	1320
Asn Ser Thr Leu Gln Val Ser Asp Val Asp Lys Leu Val Cys Arg		
1325	1330	1335
Asp Lys Leu Ser Ser Thr Asn Gln Leu Arg Ser Val Gly Leu Asn		
1340	1345	1350
Leu Glu Gly Asn Gly Val Ala Thr Asp Val Pro Ser Ala Thr Lys		
1355	1360	1365
Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val Val Asn Tyr		
1370	1375	1380
Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu Ile Lys		
1385	1390	1395
Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Ala Ala Pro Asp Gly Ile		
1400	1405	1410
Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Val Ser Gly Thr		
1415	1420	1425
Gly Pro Cys Ala Gly Asp Phe Ala Phe His Lys Glu Gly Ala Phe		
1430	1435	1440
Phe Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr Arg Gly Thr		
1445	1450	1455
Thr Phe Ala Glu Gly Val Val Ala Phe Leu Ile Leu Pro Gln Ala		
1460	1465	1470
Lys Lys Asp Phe Phe Ser Ser His Pro Leu Arg Glu Pro Val Asn		
1475	1480	1485
Ala Thr Glu Asp Pro Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Ile Arg		
1490	1495	1500
Tyr Gln Ala Thr Gly Phe Gly Thr Asn Glu Thr Glu Tyr Leu Phe		
1505	1510	1515
Glu Val Asp Asn Leu Thr Tyr Val Gln Leu Glu Ser Arg Phe Thr		
1520	1525	1530
Pro Gln Phe Leu Leu Gln Leu Asn Glu Thr Ile Tyr Thr Ser Gly		
1535	1540	1545

Lys Arg Ser Asn Thr Thr Gly	Lys Leu Ile Trp Lys	Val Asn Pro
1550	1555	1560
Glu Ile Asp Thr Thr Ile Gly	Glu Trp Ala Phe Trp	Glu Thr Lys
1565	1570	1575
Lys Asn Leu Thr Arg Lys Ile	Arg Ser Glu Glu Leu	Ser Phe Thr
1580	1585	1590
Val Val Ser Asn Gly Ala Lys	Asn Ile Ser Gly Gln	Ser Pro Ala
1595	1600	1605
Arg Thr Ser Ser Asp Pro Gly	Thr Asn Thr Thr Thr	Glu Asp His
1610	1615	1620
Lys Ile Met Ala Ser Glu Asn	Ser Ser Ala Met Val	Gln Val His
1625	1630	1635
Ser Gln Gly Arg Glu Ala Ala	Val Ser His Leu Thr	Thr Leu Ala
1640	1645	1650
Thr Ile Ser Thr Ser Pro Gln	Ser Leu Thr Thr Lys	Pro Gly Pro
1655	1660	1665
Asp Asn Ser Thr His Asn Thr	Pro Val Tyr Lys Leu	Asp Ile Ser
1670	1675	1680
Glu Ala Thr Gln Val Glu Gln	His His Arg Arg Thr	Asp Asn Asp
1685	1690	1695
Ser Thr Ala Ser Asp Thr Pro	Ser Ala Thr Thr Ala	Ala Gly Pro
1700	1705	1710
Pro Lys Ala Glu Asn Thr Asn	Thr Ser Lys Ser Thr	Asp Phe Leu
1715	1720	1725
Asp Pro Ala Thr Thr Thr Ser	Pro Gln Asn His Ser	Glu Thr Ala
1730	1735	1740
Gly Asn Asn Asn Thr His His	Gln Asp Thr Gly Glu	Glu Ser Ala
1745	1750	1755
Ser Ser Gly Lys Leu Gly Leu	Ile Thr Asn Thr Ile	Ala Gly Val
1760	1765	1770
Ala Gly Leu Ile Thr Gly Gly	Arg Arg Thr Arg Arg	Glu Ala Ile

1775 1780 1785
Val Asn Ala Gln Pro Lys Cys Asn Pro Asn Leu His Tyr Trp Thr
1790 1795 1800
Thr Gln Asp Glu Gly Ala Ala Ile Gly Leu Ala Trp Ile Pro Tyr
1805 1810 1815
Phe Gly Pro Ala Ala Glu Gly Ile Tyr Ile Glu Gly Leu Met His
1820 1825 1830

Asn Gln Asp Gly Leu Ile Cys Gly Leu Arg Gln Leu Ala Asn Glu
1835 1840 1845
Thr Thr Gln Ala Leu Gln Leu Phe Leu Arg Ala Thr Thr Glu Leu
1850 1855 1860
Arg Thr Phe Ser Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe Leu Leu
1865 1870 1875
Gln Arg Trp Gly Gly Thr Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys Cys
1880 1885 1890

Ile Glu Pro His Asp Trp Thr Lys Asn Ile Thr Asp Lys Ile Asp
1895 1900 1905
Gln Ile Ile His Asp Phe Val Asp Lys Thr Leu Pro Asp Gln Gly
1910 1915 1920
Asp Asn Asp Asn Trp Trp Thr Gly Trp Arg Gln Trp Ile Pro Ala
1925 1930 1935
Gly Ile Gly Val Thr Gly Val Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu Phe
1940 1945 1950

Cys Ile Cys Lys Phe Val Phe
1955 1960

<210> 53

<211> 7912

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct - pET-14b-PhaC-WNVE

<400> 53

ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat

60

aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg 120

tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat 180

gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttcctg tgcaccttat 240

tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt 300

aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag 360

cggtaagatc cttgagagtt ttcccccga agaactgttt ccaatgatga gcacttttaa 420

agtctctgcta tgtggcgagg tattatcccg tgttgacgcc gggcaagagc aactcggtcg 480

ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct 540

tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac 600

tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca 660

caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat 720

accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact 780

attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc 840

ggataaaagt gcaggaccac ttctgcgtc ggcccttcg gctggctggg ttattgtctga 900

taaatctgga gccgggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg 960

taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg 1020

aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca 1080

agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta 1140

ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taactgtagt ttctgttcca 1200

ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg 1260

cgtaatctgc tgcctgcaaa caaaaaaacc accgtacca gcggtgggtt gtttgccgga 1320

tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agatacaaaa 1380

tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc 1440

tacatacctc gctctgctaa tctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg 1500

tcttaccggg ttggactcaa gacgatagt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac 1560

gggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct 1620

acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgt tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc 1680

ggtaaagcggc aggttcggaa caggagagcg cagcaggag cttccagggg gaaacgcctg 1740

gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg 1800

ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct 1860

ggccttttgc tggccttttg ctacatgtt ctttctcgcg ttatcccctg attctgtgga 1920

taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg	1980
cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga ggcctgatg cggtattttc tccttacgca	2040
tctgtcgggt atttcacacc gcatatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc	2100
gcatagttaa gccagtatac actccgctat cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc	2160
gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt	2220
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac	2280
cgaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga	2340
tgtctgcctg ttcacccgcg tccagctcgt tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc	2400
ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg ttttttctg tttggtcact gatgcctccg	2460
tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa tgataccgat gaaacgagag aggatgctca	2520
cgatacgggt tactgatgat gaacatgcc ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac	2580
tggcggtatg gatcggcgg gaccagagaa aaatcactca gggicaatgc cagcgcttcg	2640
ttaatacaga tgtaggtgtt ccacagggtg gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga	2700
acataatggt gcagggcgct gacttccgcg tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga	2760
agaccattca tgttgttgct caggtcgcag acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc	2820
gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac cagtaaggca accccgccag cctagccggg	2880
tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca cccgtggcca ggaccaacg ctgcccgaga	2940
tgcgcccgct gcggtctgtg gagatggcgg acgcgatgga tatgttctgc caagggttg	3000
tttgcgatt cacagtctc cgcaagaatt gatggctcc aattcttgga gtggtgaatc	3060
cgttagcgag gtgccgccgg ctccattca ggtcgagggt gcccggtcc atgcaccgcg	3120
acgcaacgcg gggaggcaga caaggtatag ggcggcgcct acaatccatg ccaaccgtt	3180
ccatgtgctc gccgaggcgg cataaatcgc cgtgacgatc agcggtccag tgatcgaagt	3240
taggctggta agagccgca gcgatccttg aagctgtccc tgatggctgt catctacctg	3300
cctggacagc atggcctgca acgcgggcat cccgatgccg ccggaagcga gaagaatcat	3360
aatggggaag gccatccagc ctgcgtcgc gaacgccagc aagacgtagc ccagcgcgtc	3420
ggccgccatg ccggcgataa tggcctgctt ctgcgcgaaa cgtttgttg cgggaccagt	3480
gacgaaggct tgagcgaggg cgtgcaagat tccgaatacc gcaagcgaca ggccgatcat	3540
cgtcgcgctc cagcgaaagc ggtcctcgcc gaaaatgacc cagagcgtg ccggcacctg	3600
tcctacgagt tgcatgataa agaagacagt cataagtgcg gcgacgatag tcatgccccg	3660

cgcccaccgg aaggagctga ctgggttgaa ggctctcaag ggcatcggtc gacgctctcc	3720
cttatgcgac tcttgcatga ggaagcagcc cagtagtagg ttgaggccgt tgagcaccgc	3780
cgccgcaagg aatggtgcat gcaaggagat ggcgcccaac agtccccgg ccacggggcc	3840
tgccaccata cccacgccga aacaagcgct catgagcccg aagtggcgag cccgatcttc	3900
cccatcggtg atgtcgcgca tataggcgcc agcaaccgca cctgtggcg cggatgatgc	3960
ggccacgatg cgtccggcgt agaggatcga gatctcgatc ccgcgaaatt aatacgactc	4020
actataggga gaccacaacg gtttcctctt agaaataagg agatactagt atggcgaccg	4080
gcaaaggcgc ggcagcttcc acgcaggaag gcaagtccca accattcaag gtcacgccgg	4140
ggccattcga tccagccaca tggctggaat ggtcccgcga gtggcagggc actgaaggca	4200
acggccacgc ggccgcgtcc ggcattccgg gcctggatgc gctggcaggc gtcaagatcg	4260
cgccggcgca gctgggtgat atccagcagc gctacatgaa ggactttctca gcgtgtggc	4320
aggccatggc cgagggcaag gccgaggcca ccggtccgct gcacgaccgg cgcttcgccg	4380
gcgacgatg gcgcaccaac ctcccatatc gcttcgctgc cgcgtttctac ctgctcaatg	4440
cgcgcgctt gaccgagctg gccgatgccg tcgaggccga tgccaagacc cgccagcgca	4500
tccgcttcgc gatctcgaa tgggtcgatg cgatgtcgcc cgccaacttc ctgcccacca	4560
atcccagggc gcagcgctg ctgatcgagt cgggcggcga atcgctcgt gccggcgtgc	4620
gcaacatgat ggaagacctg acacggcgca agatctcgca gaccgacgag agcgcgtttg	4680
aggctggccg caatgtcgcg gtgaccgaag gcgccgtggt cttcgagaac gactacttcc	4740
agctgttgca gtacaagccg ctgaccgaca aggtgcacgc gcgcccgtg ctgatggtgc	4800
cgccgtgcat caacaagtac tacatcctgg acctgcagcc ggagagctcg ctggtgcgcc	4860
atgtggtgga gcagggacat acggtgttcc tgggtgtcgtg gcgcaatccg gacgccagca	4920
tggccggcag cacctgggac gactacatcg agcacgcggc catccgcgcc atcgaagtcg	4980
cgcgcgacat cagcggccag gacaagatca acgtgctcgg cttctgcgtg ggccggcacca	5040
ttgtctcgac cgcgctggcg gtgctggccg cgcgcgcgga gcaccggcc gccagcgta	5100
cgctgtgac cagctgtctg gactttgccg acacgggcat cctcgacgtc tttgtcgacg	5160
agggccatgt gcagttgcgc gaggccacgc tgggcggcgg cgccggcgcg ccgtgcgcgc	5220
tgctgcgcgg ccttgagctg gccaatacct tctcgttctt gcgcccgaac gacctggtgt	5280
ggaactacgt ggtcgacaac tacctgaagg gcaacacgcc ggtgccgttc gacctgtgt	5340
tctggaacgg cgacgccacc aacctgccgg ggccgtggta ctgctggtac ctgcgccaca	5400
cctacctgca gaacgagctc aaggtaccgg gcaagctgac cgtgtgcggc gtgccggtgg	5460
acctggccag catcgacgtg ccgacctata tctacggctc gcgcgaagac catatcgtgc	5520

cgtggaccgc ggccatagcc tcgaccgcgc tgcctggcgaa caagctgcgc ttcgtgctgg 5580
 gtgcgtcggg ccatatgcc ggtgtgatca acccgccggc caagaacaag cgcagccact 5640
 ggactaacga tgcgtgccg gagtcgccgc agcaatggct ggccggcgcc atcgagcatc 5700
 acggcagctg gtggccggac tggaccgcat ggctggccgg gcaggccggc gcgaaacgcg 5760

 ccgcgcccgc caactatggc aatgcgcgct atcgcgcaat cgaacccgcg cctgggcgat 5820
 acgtcaaagc caaggcacat atggtgctgg cgtggcgat tgataaacgc ggaggcgggtg 5880
 gaggcctcga gttaactgc ctgggcatga gcaaccgca ttttctggaa ggcgtgagcg 5940
 gcgcgacctg ggtggatctg gtgctggaag gcgatatctg cgtgaccatt atgagcaaag 6000
 ataaaccgac cattgatgtg aaaatgatga acatggaagc ggcgaaactg gcggaagtgc 6060
 gcagctattg ctatctggcg accgtgagcg atctgagcac caaagcggcg tgcccaccca 6120
 tgggcgaagc gcataacgat aaacgcgcgg atccggcggt tgtgtgccgc cagggcgtgg 6180

 tggatcgagg ctggggcaac ggctcggcc tgtttggcaa aggcagcatt gataacctgcg 6240
 cgaaatttgc gtgcagcacc aaagcgattg gccgcacat tctgaaagaa aacattaaat 6300
 atgaagtggc gatttttctg catggcccga ccaccgtgga aagccatggc aactatagca 6360
 cccaggtggg cgcgaccgag gcgggcccgc tgagcattac cccggcgggc cgagctata 6420
 ccctgaaact gggcgaatat ggcgaaagtga ccgtggattg cgaaccgcgc agcggcattg 6480
 ataccaacgc gtattatgtg atgaccgtgg gcacaaaaac ctttctgggtg catcgcaat 6540
 ggtttatgga tctgaacctg ccgtggagca gcgcgggcag caccgtgtgg cgcaaccgcg 6600

 aaacctgat ggaatttgaa gaaccgatg cgaccaaaca gagcgtgatt gcgctgggca 6660
 gccaggaagg cgcgctgcat caggcgctgg cgggcgcgat tccggtggaa tttagcagca 6720
 acaccgtgaa actgaccagc ggccatctga aatgccgct gaaaaatggaa aaactgcagc 6780
 tgaaaggcac cacctatggc gtgtgcagca aagcgtttaa atttctgggc acccggcg 6840
 ataccggcca tggcaccgtg gtgctggaac tgcagtatac cggcaccgat ggcccgctga 6900
 aagtgccgat tagcagcgtg gcgagcctga acgatctgac cccgtgggc gcctggtga 6960
 ccgtgaacct gtttctgagc gtggcgaccg cgaacgcgaa agtctgatt gaactggaac 7020

 cgccgtttgg cgatagctat atttgtgtgg gccgcggcga acagcagatt aaccatcatt 7080
 ggcataaaag cggcagcagc attggcaaag cgtttaccac caccctgaaa ggcgcgagc 7140
 gcctggcggc gctggcgat accgcgtggg attttgagc cgtgggcggc gtgtttacca 7200
 gcgtgggcaa agcgggtgcat cagggttttg gcggcgcggt tcgcagcctg tttggcgga 7260
 tgagctggat taccagggc ctgctggcg cgctgctgct gtggatgggc attaacgcgc 7320
 gcgatcgag cattgcgctg acctttctgg cgtgggcgg cgtgctgctg tttctgagcg 7380

tgaacgtgca tgcgtgagga tccggctgct aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct 7440

gctgccaccg ctgagcaata actagcataa ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg 7500

ggttttttgc tgaaggagg aactatatcc ggatatccac aggacgggtg tggtcgcat 7560

gatcgctag tcgatatgg ctccaagtag cgaagcgagc aggactgggc ggcggccaaa 7620

gcggtcggac agtgctccga gaacgggtgc gcatagaaat tgcatacaac catatagcgc 7680

tagcagcacg ccatagtac tggcgatgct gtcggaatgg acgatatccc gcaagaggcc 7740

cggcagtacc ggcataacca agcctatgcc tacagcatcc aggtgacgg tgccgaggat 7800

gacgatgagc gcattgttag atttcataca cgtgcctga ctgcgttagc aatttaactg 7860

tgataaacta ccgcattaaa gcttatcgat gataagctgt caaacatgag aa 7912

<210> 54

<211> 1108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> PhaC-WNVE fusion polypeptide encoded by pET-14b-PhaC-WNVE

<400> 54

Met Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser

1 5 10 15

Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu

20 25 30

Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala

35 40 45

Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala

50 55 60

Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser

65 70 75 80

Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro

85 90 95

Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro

100 105 110

Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr

115 120 125

Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile
 130 135 140
 Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe
 145 150 155 160
 Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly
 165 170 175
 Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val Arg Asn Met Met Glu Asp Leu Thr Arg
 180 185 190
 Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn
 195 200 205
 Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln
 210 215 220
 Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu
 225 230 235 240
 Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln
 245 250 255
 Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val
 260 265 270
 Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr
 275 280 285
 Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala
 290 295 300
 Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val
 305 310 315 320
 Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly
 325 330 335
 Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe
 340 345 350
 Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln
 355 360 365
 Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu

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

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

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

 545 550 555 560
 Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala
 565 570 575
 Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala His Met Val
 580 585 590
 Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg Gly Gly Gly Gly Gly Leu Glu Phe
 595 600 605
 Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly Val Ser Gly

 610 615 620

Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Val Thr Ile
625 630 635 640
Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met Asn Met Glu
645 650 655
Ala Ala Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr Val
660 665 670
Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala His
675 680 685
Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln Gly Val Val
690 695 700
Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile
705 710 715 720
Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg Thr
725 730 735
Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val His Gly
740 745 750
Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln Val Gly Ala
755 760 765
Thr Gln Ala Gly Arg Leu Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser Tyr Thr
770 775 780
Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu Pro Arg
785 790 795 800
Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly Thr Lys
805 810 815
Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu Pro Trp
820 825 830
Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu Met Glu
835 840 845
Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu Gly Ser
850 855 860
Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro Val Glu

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

 930 935 940
 Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val Gly
 945 950 955 960
 Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala
 965 970 975
 Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val
 980 985 990
 Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ser Gly

 995 1000 1005
 Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln
 1010 1015 1020
 Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val
 1025 1030 1035
 Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe
 1040 1045 1050
 Gly Gly Ala Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr

 1055 1060 1065
 Gln Gly Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala
 1070 1075 1080
 Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val Gly Gly Val
 1085 1090 1095
 Leu Leu Phe Leu Ser Val Asn Val His Ala
 1100 1105
 <210> 55

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer - synthesised in laboratory

<400> 55

cgccctttgcc ggtcgacaaa caacaacaac aacacatact agtatctcct tatttctaga 60

ggga 64

<210> 56

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer - synthesised in laboratory

<400> 56

gatacgtcaa agccaaggca tgtagggatc cggctgctaa caaag 45