(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12N 15/41

(11) 공개번호 10-2004-0007567
(43) 공개일자 2004년01월24일

(21) 출원번호 10-2003-7014871
(22) 출원일자 2003년11월14일
번역문 제출일자 2003년11월14일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2002/002810
(86) 국제출원출원일자 2002년05월23일
(87) 국제공개번호 WO 2002/95023
(87) 국제공개일자 2002년11월28일

(30) 우선권주장 60/292,515 2001년05월23일 미국(US)

(71) 출원인 엥스띠뛰 파스퇴르
프랑스, 75724 빠리 세덱스 15, 뤼 뒤 독뙤르 루 28

(72) 발명자 에스크리우,니꼴라
프랑스공화국,에프-75014빠리,뤼달레지아,201

반데르베르프,실비
프랑스공화국,에프-91190질-쉬르-이베뜨,알레드라뿌엥뜨즈네뜨,112

비그누찌,마르코
프랑스공화국,에프-75001빠리,뤼셍드니,59

제르보,실비
프랑스공화국,에프-94100셍-모르-데-포스,뤼갸리발디,56

(74) 대리인 이창훈

심사청구 : 없음

(54) 양성쇄 RNA 바이러스 게놈으로부터 유도되고이종단백질 생산에 유용한 레플리콘

요약

본 발명은 카디오바이러스 또는 아프토바이러스로부터 유도된 레플리콘 또는 자가-복제 RNA 분자에 관한 것으로, 이는 동물 세포에서 이종단백질을 발현시키는데 사용될 수 있다. 예컨대 네이키드 RNA 형태로 동물 숙주에 주입되면 이 레플리콘은 암호화된 이종단백질이 해독되도록 한다. 만일 이 암호화된 이종단백질이 이물 항원이면 이 레플리콘은 이 암호화된 이종단백질에 대한 면역 반응을 유도한다. 본 발명은 이러한 레플리콘을 구성하기 위해 카디오바이러스 또는 아프토바이러스를 이용한다. 본 발명은, 이러한 레플리콘이 네이키드 RNA 형태로 주입되면 동물 수여체에서 어떤 담체 또는 면역보조제의 도움없이 레플리콘-암호화된 이종단백질에 대한 면역 반응을 유도한다는 것을 보여준다.

대표도

도 1a

색인어

레플리콘, 자가 복제 RNA, 카디오바이러스, 아프토바이러스, 멩고 바이러스, 이종단백질, 면역 반응, 네이키드 RNA

명세서

기술분야

본 발명은, 카디오바이러스 및 아프토바이러스 게놈으로부터 유도한 레플리콘 또는 자가-복제 RNA 분자에 관한 것으로, 이는 동물 세포에서 이종 단백질 발현에 사용할 수 있다. 레플리콘은, 예컨대 네이키드 RNA 형태로 동물 숙주에 주입되면 암호화된 이종 단백질이 해독되도록 한다. 만일 암호화된 이종 단백질이 이물 항원이면, 레플리콘은 이종 단백질에 대한 면역 반응을 유도한다. 본 발명은, 이러한 레플리콘을 만들기 위해 카디오바이러스 및 아프토바이러스 게놈을 사용한다.

배경기술

유전자면역화는 백신 개발의 강력한 대안책이다. 이는, 이물 단백질을 암호화하는 유전자 서열을 갖고 있는 DNA 발현 벡터를 접종하는 것에 근거한다. 예를 들면, 인플루엔자 핵단백질(NP)을 암호화하는 DNA 네이키드 벡터를 접종(면역화)하면 항체 및 세포성 반응을 유도하고 이로써 인플루엔자 A 바이러스 변종(2, 27, 28)에 의한 동형 및 교차쇄 접종 감염으로부터 동물 숙주를 보호한다는 것이 밝혀졌다. DNA 면역화의 장점으로는 백신을 생성, 정제 및 투여하기가 용이하고 그 결과 장기적인 면역을 얻을 수 있다는 점을 들 수 있다.

DNA 면역화와 관련된 장기 면역은, 주입된 DNA의 장기 지속 및 장기 발현과 관련된 것으로 보인다. 사실, 주입된 DNA는 마우스 모델에서 1년 이상 지속되는 것으로 관찰되었다(31). 그러나, 바로 이러한 이유때문에, 임상적 견지에서 보면 DNA 서열이 숙주 게놈으로 합체되는 잠재적인 위험성에 관한 몇가지 의문이 남는다. 물론, 동물에서 실시한 예비 연구에서는 게놈 합체가 발생되는 것을 증명하지는 못했지만(19), 이러한 합체로 인해 삽입 돌연변이, 원발암유전자의 활성화 또는 염색체 불안정화가 유발될 수 있고 이로써 암과 같은 질병을 가져올 수 있다(35).

이러한 잠재적인 문제를 피하기 위해, 본 발명자들은 양성쇄 RNA 바이러스 게놈으로부터 유도된 자가-복제 네이키드 RNA 분자 또는 레플리콘을 만들었다. RNA는 유전 면역화에서 이미 DNA의 대안으로 제안되어 왔으나, 이러한 시도를 전개함에 있어서, RNA의 짧은 세포내 반감기와 곳곳에 존재하는 RNA 분해효소에 의한 RNA가 분해로 인해 제기되는 새로운 문제에 직면하였다. 초기 시도로는 면역 반응을 유도하기 위해 mRNA를 사용하였고, 투여 중 RNA를 보호하기 위해(17) 이를 금 입자-코팅된 유전자 건 운반(25) 또는 리포좀-포획 주사에 의해 근육내 투여하였다(5). 이 분자들의 운반을 더욱 증진시키고 암호화된 이종 단백질의 발현을 더욱 증진시키고자, 양성쇄 RNA 바이러스 게놈으로부터 유도된 캡시드화 자가-복제 RNA 또는 레플리콘을 개발하여 이종 서열을 세포내로 운반하였다. 이 레플리콘에서, 게놈성 구조 유전자는 이종 서열로 치환되는 한편, 비구조 유전자는 1회 복제 된다. 이러한 분자설계로 이물 단백질을 발현시킬 수 있다.

이물 단백질 발현을 위해, 알파 바이러스, 셈릴키 포레스트 바이러스(SFV), 신드비스 바이러스 및 베네수엘라 말 뇌염 바이러스의 게놈이 이런 방식으로 조작되었다(11, 24). RNA-근거한 레플리콘 단백질 패키징은 이들을 안정화시키고, 그 결과 생기는 바이러스-유사 입자를 주입하게 함으로써 이종 단백질에 대한 일련의 면역 반응을 유도한다. 마찬가지로, 이물 단백질 발현을 위해 폴리오바이러스의 양성 감각 RNA는 그 캡시드를 없앴으며(3, 21) 바이러스-유사 입자로 패키징되면, 폴리오바이러스 리포터에 대해 유전자변이된 마우스에 주사하는 경우 면역 반응을 유도한다(18, 23).

패키지 RNA 분자를 이용한 연구와는 반대로, 본 발명자들은, 이들은 그 복제 성으로 인해 RNA 대량 투입의 필요성을 경감시키기 때문에 이 벡터들을 패키징할 필요가 없다고 주장하면서, 네이키드 RNA 레플리콘의 면역 반응 유도 능력을 연구하였다. 헤마글루티닌(HA) 및 인플루엔자 A 바이러스의 NP 분자를 암호화하는 SFV 재조합 벡터의 경우, 네이키드 RNA를 주입하면 특이적 항체를 유도하는 사실이 발견되었다(6, 34). 최근에는, SFV에서 유도된 재조합 레플리콘이 인플루엔자 A, 호흡기세포융합 및 루핑 III 바이러스에 대한 방어 항체를 유도할 수 있고(10) 또 항원 모델로 사용된 lacZ에 대한 세포독성 T 림프구(CTLs)를 유도할 수 있다는 보고가 발표되었다.

본 발명자들은 최근에, 내부 인플루엔자 A NP 단백질(rSFV-NP)을 암호화하는 재조합 SFV 레플리콘은, RNA를 네이키드 형태로 주입하면, 플라스미드 DNA에 의해 유도된 면역 반응에 필적하는 반응으로, 인플루엔자 A 바이러스에 대한 체액성 및 세포성 면역 반응을 유도한다는 사실을 발표하였다. 더욱이, 본 발명자들은 rSFV- NP 레플리콘을 네이키드 형태로 주사하면 인플루엔자 NP의 면역우세 에피토프에 특이적인 CTL 반응을 유도할 수 있고 마우스-적합화된 인플루엔자 바이러스로 접종한 마우스에서 폐 바이러스 로드를, 더 낫다고 기재된 DNA 면역 기술과 같은 정도

로, 감소시킬 수 있다는 것을 증명하였다.

또한, 본 발명자들은, 내부 인플루엔자 A NP 단백질(r△P1-E-NP)를 암호화하는 폴리오바이러스 레플리콘은 네이키드 형태의 RNA를 마우스에 주입하면 셈릴키 rSFV-NP 레플리콘보다 훨씬 약한 체액성 면역 반응을 유발한다는 사실을 발표하였다. 더욱이, r△P1-E-NP 레플리콘 RNA(30)을 주입한 마우스에서는 인플루엔자 NP에 대한 CTL 면역 반응이 전혀 검출되지 않았다. 따라서, 본 발명자들은, 예컨대 네이키드 형태의 RNA를 주입한 후 동물 세포 및 동물 수여체에서 이종 단백질을 발현시키는 새로운 레플리콘을 구성하기 위해, 피코나비리다(Piconaviridae) 과의 다른 바이러스 게놈의 유용성을 조사하기로 결정하였다. 이러한 목적을 위해, 동일한 유전 조직체를 갖는 아프토바이러스 및 카디오바이러스 속의 바이러스들을 이용할 수 있었다. 실시예에서, 본 발명자들은 카디오바이러스의 표본으로서 멩고 바이러스를 사용하였다.

멩고 바이러스 게놈에 기초한 레플리콘을 구성하기 위해, 본 발명자들은 어떤 게놈 서열이 분자 복제에 영향을 미치지 않으면서 제거될 수 있는가를 결정하였다. 이 목적을 위해, 멩고 바이러스 게놈내에서, L-P1-2A 전구체 단백질의 전체 또는 일부 코딩영역을 포함하는 일련의 프레임내 제거 조작을 하였다. 상응하는 서브게놈 RNA 분자의 복제 특성을 분석하였다. 본 발명자들은, 짧은 누클레오티드 서열의 VP2 코딩 영역을 제외하고는, L-P1-2A 전구체의 전체 코딩 영역이 멩고 바이러스의 복제능에 영향을 미치지 않으면서 제거될 수 있다는 사실을 증명하였다. 정말로, 본 발명자들은, 멩고 바이러스 게놈의 누클레오티드 1137 내지 1267 (번호매김은 vMC24 약독화쇄에 대한 것이다)을 포함하는 영역은, 서브게놈성 멩고 바이러스 RNA 분자가 트랜스펙션된 세포에서 복제되는데 절대적으로 필요한 것인 시스-작용 복제 인자(Cis-acting Replication Element, CRE)를 포함한다는 사실을 증명하였다(15).

이 상황은 폴리오바이러스 게놈과 아프토바이러스 게놈에서 관찰된 것과는 파격적으로 다른 것인데, 왜냐면 캡시드 단백질 전구체(P1)의 전체가 그 상응하는 서브게놈 RNA 분자에 영향미치지 않으면서 제거될 수 있기 때문이다(1, 12).

멩고 바이러스-유도된 레플리콘을 구성한 후에, 본 발명자들은, 서브게놈 멩고 바이러스 레플리콘이 이종 서열을 발현시킬 수 있다는 것을 증명하였다. 레플리콘의 면역원성은 다양한 방법으로 개선될 수 있다. 예를 들어, 본 발명자들은 멩고 바이러스 레플리콘은 캡시드 단백질의 P1 전구체를 발현시키는 세포내로 트랜스펙션될 때 단백질막으로 둘러싸일 수 있다(*in trans)* 는 것을 증명하였다. 레플리콘 RNA는 또한 호르(Horr) 등이 기술한 바와 같이(37) 다양이온성 펩티드 프로타민으로 농축될 수 있다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 카디오바이러스 속 바이러스 게놈으로부터 구성된 레플리콘의 구 성 및 용도를 기재한다. 아프토바이러스 역시 피코나비리다 과에 속하고 카디오바이러스와 동일한 유전자 조직을 함유하므로 아프토바이러스 속의 바이러스 게놈으로부터도 유사한 레플리콘이 구성될 수 있다.

본 명세서에 사용된 용어 '레플리콘(replicon)'은 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자를 포함하나 이에 국한되는 것은 아니다.

본 명세서에 사용된 용어 '양성쇄(positive strand)'는 직접 단백질을 암호화하는 RNA 쇄(가닥)을 포함하나 이에 국한되는 것은 아니다.

본 명세서에 사용된 용어 '발현하다' 또는 이의 어떠한 변형어는 단백질 또는 그 일부를 생성시키거나 그 생성을 암호화하는 것을 포함하나 이에 국한되는 것은 아니다.

본 발명은, RNA 바이러스(레플리콘)의 바이러스 게놈의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자를 제공하는데, 여기서 RNA 분자는 하기 (a) 내지 (c)를 포함한다:

(a) RNA 바이러스의 비-구조 단백질을 암호화하는 RNA 서열;

(b) 바이러스 복제에 필요한 비-암호화 바이러스 RNA 서열;

(c) 이종 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 RNA 서열.

상기 레플리콘의 유리한 양태에 따르면, 상기 (a) 비-구조 단백질을 암호화하는 RNA 서열 및/또는 (b)의 바이러스 복제에 필요한 바이러스성 비-암호화 RNA 서열은 돌연변이형 또는 절단(truncated)형이다.

레플리콘의 다른 유리한 양태에 따르면, RNA 바이러스는 카디오바이러스 또는 아프토바이러스 속 바이러스로, 바람직하게는 멩고 바이러스이고, 가장 바람직 하게는 상기 레플리콘이 멩고 바이러스 또는 테일러 바이러스 VP2 유전자의 시스-작용 복제 인자(Cis-actiong Replication Element, CRE)를 더 포함한다.

레플리콘의 다른 유리한 양태에 따르면, 상기 (c)에 정의된 이종 단백질은 생물학적 활성 단백질, 리포터 단백질, 세포독성 단백질, 병원균 단백질 또는 종양 단백질 중에서 선택되고, 바람직하게는, 상기 리포터 단백질은 녹색 형광 단백질이고, 병원성 단백질은 인플루엔자 핵단백질 또는 인플루엔자 헤마글루티닌이다.

레플리콘의 다른 유리한 양태에 따르면, 상기 (c)에 정의된 이종 단백질 단편은 상기 이종 단백질의 항원 또는 에피토프이다.

레플리콘은 복제에 필요한 암호 및 비-암호 서열은 모두 남겨둔 채 캡시드 암호화 서열 전체 또는 일부를 제거하여 구성할 수 있다. 게놈 복제 서열을 남기면 적합한 세포내에서 바이러스성 및 이종성 유전자 산물을 발현시킬 수 있다. 예를 들어, 멩고 바이러스 VP2 유전자에서 발견되는 CRE는 복제에 필수적이다.

몇가지 방법으로 레플리콘을 제조할 수 있다. 그 한가지 방법에서, 박테리오파지 T7, T3 또는 SP6과 같은 DNA-의존성 RNA 폴리머라아제를 이용하여 시험관내에서 적합한 DNA 서열을 전사한다. 다른 방법으로, 적합한 DNA 서열을 함유하는 플라스미드로 동물 세포를 트랜스펙션시킨 후 이 세포로부터 레플리콘 RNA를 분리한다. 예를 들어, 레플리콘을 암호호하는 상보성 DNA(cDNA)를, 전사 제어하에 폴리머라아제 I 프로모토의 다운스트림에, 그리고 간염 δ리보자임 cDNA의 업스트림에 둘 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 '트랜스펙션'은 엘렉트로포레이션, DEAE-덱스트린 처리, 인산칼슘 침전, 리포좀(예, 리포펙션), 단백질 패키징(예, 슈 도-바이러스 입자내로), 프로타민 농축 또는 기타 다른 DNA 또는 RNA를 세포내로 도입시키는 방법에 의해 세포로 DNA 또는 RNA를 도입시키는 것을 포함하나 이에 국한되는 것은 아니다.

또한, 본 발명은 본 발명에 따른 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자 생산에 유용한 하기 DNA 분자를 제공한다:

- 본 발명에 따른 RNA 바이러스 게놈의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자를 암호화하는 DNA 분자. 바람직한 양태에서, 상기 DNA 분자는 적절한 클로닝 벡터를 더 포함한다.

- 서열번호 26 및 서열번호 27 (기탁번호 I-2668 및 2669로 2001년 5월 21일에 프랑스 파리 소재 CNCM 파스퇴르 연구소(CNCM Institut pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France)에 기탁된 플라스미드) 또는 이의 단편에서 선택된 서열 및 발현가능 형태의 이종 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 분자; 바람직하게는 상기 DNA 분자는 서열번호 28 (기탁번호 I-2879로 2001년 5월 16일에 프랑스 파리 소재 상기 CNCM 파스퇴르 연구소에 기탁된 플라스미드)을 포함한다.

- 돌연변이 또는 절단형(truncated)의 서열번호 26 및 서열번호 27 (기탁번호 I-2668 및 2669로 2001년 5월 21일에 프랑스 파리 소재 상기 CNCM 파스퇴르 연구소에 기탁된 플라스미드) 또는 이의 단편에서 선택된 서열 및 발현가능 형태의 이종 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 분자.

상기 DNA 분자의 바람직한 양태에 따르면, 이종 단백질은 생물학적 활성 단 백질, 리포터 단백질, 세포독성 단백질, 병원체 단백질, 종양 단백질으로부터 선택되고, 바람직하게는, 상기 리포터 단백질은 녹색 형광 단백질이고, 상기 병원체 단백질은 인플루엔자 핵단백질, 인플루엔자 헤마글루티닌 또는 림프구 맥락수막염 바이러스 핵단백질이며, 상기 이종 단백질 단편은 이종 단백질의 항원 또는 에피토프로, 바람직하게는 림프구 맥락수막염 바이러스 핵단백질의 NP 118-126 에피토프이다.

본 발명의 레플리콘은 몇가지 잠재적 용도를 갖는다. 제1 양태에서, 레플리콘은 동물 세포 또는 동물 숙주에서 이종 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 삽입시켜 이종 단백질을 발현시키는데 사용된다. 일 양태로, 상기 동물 숙주는 개, 고양이, 돼지, 소, 닭, 마우스 또는 말이다. 바람직한 양태에서, 동물 숙주는 사람이다. 몇가지 방법에 의해 레플리콘을 숙주내로 도입할 수 있는데, 근육내 주사, 금 입자-코팅 유전자 건 운반, 단백질-패키징 주사 (예, 슈도-바이러스 입자에 패키징됨), 프로타민 농축 주사 또는 리포좀-포획 주사가 포함된다. 예를 들어, 멩고 바이러스-유도 레플리콘은 주사 부위 근처 또는 그 부위에서 일시적으로 치료 단백질을 발현시키거나, 직접 주사에 의해 고형 종양에서 세포독성 단백질 또는 프로아폽토 단백질을 발현시키며, 이로써 일종의 항-종양 유전자요법을 제공한다. 또한, 편리하게 검출된 리포터 단백질을 발현시키기 위해 재조합 레플리콘을 생체내 또는 시험관내에서 사용할 수 있다. 이 레플리콘은 RNA 복제 및 RNA 운반을 모니터하기 위해 사용되며, 이로써 동물 세포 트랜스펙션 또는 동물 숙주로의 RNA 운반을 최적화할 수 있다. 결국, 레플리콘은 예컨대 단백질 특성화, 단백질 생산 또는 단백질 위치결정에 대한 심도 있는 연구에 필요한 모든 관심 있는 단백질을 발현시키기 위해 사용될 수 있다.

다른 양태에서, 레플리콘은 이종 단백질을 투여받은 동물 수여체에서 암호화된 이종 단백질에 대한 면역 반응을 유도

하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 레플리콘은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 백신을 구성할 수 있다. 약제학적 담체로는 물, 석유유, 동물유, 식률유, 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름과 같은 오일, 식염수, 수용성 덱스트로즈, 글리세롤 용액과 같은 멸균액, 다가양이온 입자, 단백질 입자, 프로타민 입자, 리포좀, 금 입자, 또는 기타 RNA를 농축시킬 수 있는 다른 단백질 또는 분자가 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 레플리콘은, 예를 들어, '네이키드' RNA 또는 '캡시드화(encapsidated)' RNA 형태로 주입될 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 '네이키드'는 어떤 단백질과도 연관되지 않은 RNA를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다.

제1 실시예로, 레플리콘은 박테리아, 효모, 바이러스 또는 기생충을 포함하는 모든 병원체의 항원 결정체를 발현시킬 수 있다. 또한 레플리콘은 종양 항원 또는 종양 항원과 병원체 항원의 복합체를 발현시킬 수 있다. 이러한 레플리콘은 병원체 또는 종양에 대한 면역 반응을 유도할 수 있고 따라서 상응하는 질환에 대한 백신에 포함될 수 있다. 이 점에서, 멩고 바이러스-유도된 레플리콘의 강력한 세포성 면역 반응 유도 능력은 유리한 특성이다.

제2 실시예로, 레플리콘은 이미 질병에 걸린 환자를 치료하기 위한 면역치료제로 사용될 수 있다. 구체적으로, 레플리콘은 기존 면역 반응을 강화시키거나 이 미 개인에 존재하는 병원체 또는 종양 항원에 대한 새로운 면역 반응을 유도할 수 있고, 따라서, 상응하는 질환에 대한 치료에 포함될 수 있다. 예로, B형 간염은, B형 간염 바이러스 표면 항원을 발현시키는 레플리콘을 투여함으로써 이런 방식으로 치료될 수 있다.

제3 실시예로, 레플리콘은, 동일 또는 상이한 항원에서 유도하는 일련의 T 세포 에피토프로 구성되는 합성 폴리펩티드를 발현시킬 목적으로 구성될 수 있다. 이러한 에피토프는 CD4+ T 세포 (헬퍼 T 세포) 또는 CD8+ T 세포(CTLs)를 특이적으로 자극할 수 있다. 이러한 레플리콘은 (1) HLA 변화성을 고려하면서 다중특이적 면역 반응을 유도할 수 있고 (2) 병원체 또는 종양 세포가 항원 탈출을 통해 면역 반응을 회피하는 것을 제한할 수 있다.

제4 실시예로, 어떠한 생물학적 활성 단백질도 레플리콘에 의해 발현될 수 있다. 일 양태에서, 생물학적 활성 단백질은 시토킨 또는 케모킨과 같은 면역조절 단백질로 이들은 숙주의 면역 반응을 조절한다. 이물 항원을 발현시키는 레플리콘으로 동시에 그리고 동일 위치에 주입되면, 시토킨 레플리콘은 이물 항원에 대해 유도된 면역 반응을 조절할 수 있다. 이런 레플리콘은 모든 병원체 항원 또는 암 항원에 대한 면역 반응을 조절하기 위해 단독으로 사용될 수 있다. 이 레플리콘은 또한 적절히 투여되면 자가면역 병리도 조절할 수 있다.

이렇게, 본 발명은 본 발명에 따른 적어도 하나의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자와 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신을 제공한다.

상기 백신의 유리한 양태에서, 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자는 네이키 드 RNA이다.

상기 백신의 다른 유리한 양태에서, 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자는 캡시드화된 것이다.

본 발명은 또한 숙주에서 방어 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다:

(a) 약제학적으로 허용되는 담체중에 존재하는 본 발명에 따른 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자 및 DNA 분자중에서 선택된 적어도 하나의 분자를 제조하고;

(b) 상기 (a) 제제로 숙주를 면역화 시킨다.

상기 방법의 유리한 일 양태에서, (a)의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자는와 DNA 분자는 네이키드 형태이다.

상기 방법의 유리한 일 양태에서, (a)의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자는와 DNA 분자는 캡시드화 형태이다.

본 발명은 또한 허용되는 매질중에 존재하는 본 발명에 따른 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자 또는 DNA 분자중에서 선택된 적어도 하나의 분자를 포함하는, 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명은 또한 허용되는 매질중에 존재하는 본 발명에 따른 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자 또는 DNA 분자중에서 선택된 적어도 하나의 분자를 포함하는 치료용 키트를 제공한다.

본 발명은 또한 하기 단계를 포함하는, 숙주내에서 면역 반응을 조정하는 방법을 제공한다:

(a) 약제학적으로 허용되는 담체중에 존재하는 본 발명에 따른 자가-복제 재 조합 양성쇄 RNA 분자 및 DNA 분자중에서 선택된 적어도 하나의 분자를 제조하고;

(b) 상기 (a) 제제로 숙주를 면역화 시킨다.

상기 방법의 유리한 일 양태에서, 약제학적 담체는 물, 석유유, 동물유, 식물유, 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름과 같은 오일, 식염수, 수용성 덱스트로즈, 글리세롤 용액과 같은 멸균액, 다가양이온 입자, 단백질 입자, 프로타민 입자, 리포좀, 금 입자를 포함한다.

상기 방법의 다른 유리한 일 양태에서, 숙주는 사람, 돼지, 개, 고양이, 소, 닭, 마우스 또는 말 중에서 선택된다.

또한 본 발명은, 하기 (a) 내지 (c)를 포함하는, RNA 바이러스 게놈의 캡시드화 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자를 생산함으로써 RNA 바이러스 게놈의 캡시드화 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자의 면역성을 개선시키는 방법을 제공한다:

(a) 본 발명에 따른 RNA 바이러스 게놈의 캡시드화 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자 또는 DNA를, 캡시드 단백질의 P1 전구체를 발현하는 세포내로 트랜스펙션 시키는 단계;

(b) 상기 트랜스펙션된 세포로부터 RNA 바이러스 게놈의 캡시드화 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자를 제조하는 단계;

(c) 상기 (b) 단계에서 제조된 제제로 숙주를 면역화시키는 단계.

또한 본 발명은 하기 단계를 포함하는, NA 바이러스 게놈의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자를 생산함으로써 RNA 바이러스 게놈의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자의 면역성을 개선시키는 방법을 제공한다:

(a) 본 발명에 따른 RNA 바이러스 게놈의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자를 농축하는;

(b) 상기 (a) 단계의 제제로 숙주를 면역화시키는 단계.

본 발명은 레플리콘이 멩고 바이러스 게놈으로부터 유전자 기술처리되는 하기 실시예 및 도면에 의해서도 증명되나, 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로만 이해되고 본 발명이 실시예로만 제한되는 것으로 이해되어서는 안된다.

도면의 간단한 설명

도 1a는, 멩고 바이러스 게놈으로부터 유도된 서브게놈성 재조합 레플리콘을 암호화하는 플라스미드에 대한 도식도이다. 녹색 형광 단백질(GFP), HA 및 NP 유전자가 가는빗금 네모칸으로 표시된다. CRE는 짧은 선의 작은 네모칸으로 표시된다. HA 단백질 신호 펩티드(SP) 및 HA 막통과 영역(TM)은 흑색띠로 표시된다.

도 1b는 도 1a에 계속된 도면이다.(이하, 도 1은 도 1a와 도 1b를 함께 지칭하는 것으로 한다.)

도 2는, 토끼 그물망세포 용해물에 있어서 재조합 멩고 바이러스 다단백질의 시험관내 해독 및 프로세싱을 보여주는 SDS-PAGE 분석이다. 분자량 마커의 위치는 우측에 표시된다. 멩고 바이러스 단백질 전구체 뿐 아니라 그 주요 절단물은 좌측에 표시된다. 재조합 레플리콘에 의해 암호화되는 GFP-NP 및 GFP 폴리펩티드는 실선화살표로 표시된다.

도 3은, 멩고 바이러스-유도된 세브게놈 레플리콘의 슬롯 블랏이다. 트랜스 펙션 후 정해진 시간에서 세포질 RNA를 수획하여 분석하였다.

도 4는, 재조합 레플리콘 rM△BB, rM△BB-GFP 또는 rM△BB-GFP로 트랜스펙션된 HeLa 세포의 GFP 발현에 대한 형광세포측정기 기록이다.

도 5는, 재조합 레플리콘 rM△BB-NP로 트랜스펙션되고 [^{35} S]-메티오닌 표지된 HeLa 세포에서 발현된 면역침강 인플루엔자 NP 단백질에 대한 SDS-PAGE 분석이다. 로딩된 샘플은 가짜(mock) 트랙스펙션 HaLa 세포 (제1레인); 레플리콘 rM△BB로 트랜스펙션된 HaLa 세포 (제2레인); rM△BB-NP (제3레인) 또는 rM△BB-GFP-NP (제4레인)이고, 트랜스펙션 후 10시간째에 가짜 감염 HaLa 세포 (제5레인) 및 A/PR/8/34 바이러스로 감염된 HeLa 세포 (제6레인)를 수확하였고, 감염 후 20시간째에도 수확하였다. 바이러스 HA 단백질, 바이러스 NP 단백질 및 바이러스 M1 단백질은 우측에 표시된다.

도 6은, rM△BB-NP로 면역화된 C57BL/6 마우스에서 NP-특이적 CTL 활성의 유도를 보여주는 CTL 분석이다. C57BL/6 마우스 네 그룹을 하기 백신 프로토콜로 삼주 간격으로 면역화하였다: 1. pCI(○) 또는 pCI-NP(●) DNA 50 ㎍ 주사; 2. rM△BB(□) 또는 rM△BB-NP (■) RNA 25㎍ 주사. 최종 주사 후 3주째에 비장 세포를 수확하여, 시험관내 자극시킨 후, NP366 펩티드 (a) 또는 (b)를 로딩한 동종(syngenic) EL4 타겟 세포에 대한 크로뮴 방출 분석에

서 세포용해 활성을 검사하였다. 다양한 이펙토:타겟 비율에서의 특이적 분해(lysis)율을 나타내었다. 데이타는 두 실험중 하나에서 나온 것이다. 최종 주사후 3주째, 재료 및 방법에 기 재한 바와 같이 면역우세 NP366 펩티드 (c) 존재하에 IFNγ ELISPOT 분석으로 인플루엔자 바이러스-특이적 CD8+ T 세포 빈도를 측정하였다. 데이타는 10^{5} 비장세포에 대한 SFC수로 나타낸다.

도 7은, 도 6에서 기재한 바와 동일한 프로토콜에 따라 rM△BB-NP로 면역시킨 C57BL/6 마우스에서 NP-특이적 항체의 유도를 보여주는 ELISA이다. 역가는, 주어진 다섯 또는 여섯 마우스 그룹에 대해 최고 희석 혈청의 역수로 나타내며, 450nm 에서 항원으로서 정제 스플릿 A/PR/8/34 비리온을 이용한 직접적 ELISA 시험에서 배경 농도의 두배에 상응하는 광학 밀도값을 나타낸다.

도 8은, rM△BB-NP로 면역화한 후 인플루엔자 바이러스로 접종한 마우스에서 폐 바이러스 로드에 대한 그래프이다. 빈 동그라미는 각 그룹의 평균치를 나타내고, 막대는 표준편차를 나타낸다. 데이타는 두 실험중 하나로부터 얻은 것이다.

도 9A는, 토끼 그물망세포 용해물에서 HA 원형의 시험관내 해독을 보여주는 SDS-PAGE 분석이다. rM△FM-HA 재조합 레플리콘에 의해 암호화된 인플루엔자 HA 폴리펩티드는 색칠된 실선 화살표로 나타내고 비-절단 전구체는 빈칸 화살표로 나타낸다.

도 9B는, 모노시스트로닉 멩고 바이러스 레플리콘이 트랜스펙션된 진핵세포에서 이물 당단백질을 발현할 수 없다는 것을 보여주는 슬롯 블랏이다. 트랜스펙션 후 정해진 시간에서, 세포질 RNA를 수확하여 분석용 나일론막에서 슬롯 블롯한다.

도 10은, 재조합 멩고 바이러스 레플리콘으로 트랜스펙션되고 [^{35}S]-메티오닌 으로 표지된 HeLa 세포에서 발현된 면역침강 GFP 융합 폴리펩티드에 대한 SDS-PAGE 분석이다. 로딩된 샘플은 다음과 같다: 가짜-트랜스펙션된 HeLa 세포 또는 rM△BB-GFP, rM△BB-GFP-NP118 (2 클론) 또는 rM△BB-GFP-lcmvNP RNA 레플리콘으로 트랜스펙션된 HeLa 세포. 분자량(kDa)은 좌측에 나타낸 바와 같다.

도 11은, rM△BB-GFP-NP118 및 rM△BB-GFP-lcmvNP 레플리콘 RNA와, 대조군으로서의 pCMV-NP 및 pCMV-MG34 플라스미드 DNA로 면역화시킨 BALB/c 마우스에서 LCMV-특이적 T 세포의 유도를 보여주는 ELISPOT 분석이다. 최종 주사 후 3주째에, 재료 및 방법에서 기재한 면역우세 NP118-126 펩티드 존재하에 IFNγ ELISPOT 분석으로 LCMV-특이적 CD8+ T 세포 빈도를 측정하였다. 데이타는 10^{5} 비장세포에 대한 SFC수로 나타낸다.

도 12는, 재조합 멩고 바이러스 레플리콘 rM△BB-GFP, rM△BB-GFP-NP118 또는 rM△BB-GFP-lcmvNP로 트랜스펙션된 HeLa 세포에서 GFP 발현에 대한 형광세포측정기 기록이다.

실시예

멩고 바이러스 게놈으로부터 유도한 레플리콘 cDNA를, 양성 센스 방향으로, T7 RNA 폴리머라아제 I 프로모터 박테리아 플라스미드 다운스트림과 독특한 BamH I 절단위치의 업스트림으로 클로닝하였다. BamH I로 박테리아 플라스미드를 선형화 한 후, T7 RNA 폴리머라아제를 사용하여 바이러스 RNA-유사 전사를 만들었고, 이는 동물 세포의 트랜스펙션 또는 동물 숙주로의 감염에 사용될 수 있다.

제1 레플리콘 종류인 rM△BB 종류를 재료 및 방법 그리고 실시예 1에 기재한 바에 따라 구성하였다. CRE를 제외한 L-P1-2A 전구체의 거의 모든 암호서열을 제거하였다. 이 레플리콘들은 트랜스펙션된 HeLa 세포에서 복제하여, GFP 또는 인플루엔자 NP를 벡터-유도 잔기와의 융합 단백질로서 발현시켰다. rM△BB-NP 레플리콘은, 네이키드 RNA 형태로 주입되면, 마우스에서 항-NP 면역 반응을 유도한다. 이 전략을 기초로, 다른 레플리콘들도 구성하였는데, 이들도 복제하여 이어서 림프구 맥락수막염 바이러스(LCMV)의 NP 발현 및 실시예 9에 기재한 바와 같은 H2 ^{d} 마우스 LCMV 면역우세 NP118-126 에프토프에 상응하는 합성 폴리펩티드의 발현을 가져온다.

제2 레플리콘 종류인 rM△FM 종류를 구성하여, 이물 단백질 서열과 융합된 벡터 서열량을 최소화함으로써 이물 서열을 더 원래형으로 발현시켰다. 이 rM△FM종류 역시 HeLa 세포에서 복제하였다. 반대로, SP 및 TM 영역등의 인플루엔자 HA 전체를 포함하는 rM△FM-HA 재조합 레플리콘은 복제 역량이 없었다.

피코나바이러스 게놈은 정상적으로는 당단백질을 암호화하지 않는다. 본 발명자들은, 본 발명자들이 앞서 폴리오바이러스 게놈으로부터 유도된 레플레콘에 대해 보인 바와 같, 모노시스트로닉 멩고 바이러스-유도된 레플리콘이 이물 당화 단백질을 발현시킬 수 없다는 점에 주목하였다. 그러나, 본 발명자들은 디시스트로 닉 폴리오바이러스(PV) 레플리콘은 당당백질을 발현시킬 수 있다는 것을 앞서 증명한 바 있다. 구체적으로, 본 발명자들은 디시스트로닉 레플리

콘인 r△PV-IR-HA를 구성하였는데, 이는 HA 및 PV 서열의 해독이 EMCV 내부 리보좀 엔트리 위치(IRES)의 삽입에 의해 비커플되었기 때문이다. r△PV-IR-HA 레플리콘은 트랜스펙션되면 복제되어 세포 표면에 정확하게 당화된 HA가 발현되도록 한다(29). 마찬가지로, 이물 바이러스 또는 포유동물 IRES를 삽입하여 디시스트로닉 멩고 바이러스 레플리콘을 구성할 수 있고, 바이러스 또는 종양 항원 또는 생물학적 활성의 폴리펩티드와 같은 당화 단백질의 발현을 복제하고 이끄는 능력을 시험할 수 있다.

재료 및 방법

세포, 바이러스 및 플라스미드

DMEM 완전 매질 (둘베코의 변형 이글 매질로 1mM 피루브산나트륨, 4.5mg/ml L-글루코오스, 100U/ml 페니실린 및 100μg/ml 스트렙토마이신을 함유)에 5% 열-불활성 태아 송아지 혈청(FCS)(TechGen #8010050)을 보충한 매질에서 5% 이산화탄소 존재하에 37℃에서 HeLa 세포(ATCC 접근 번호 CCL-2)를 성장시켰다.

EL4(마우스 림프종, H-2^{b})(ATCC 접근번호 TIB-39) 및 P815(마우스 대식세포종, H-2^{d})(ATCC 접근번호 TIB-64) 세포를 10% FCS가 보충된 RPMI 완전 매질(RPMI 1640, 10mM HEPES, 50μM β-머캅토에탄올, 100U/ml 페니실린, 100μg/ml 스트렙토 마이신 함유)에 두었다.

전술한 바와 같이, 실험처리되지 않은(naive) 마우스에 감염시킨 폐 균질물의 계대 접종(serial passage)을 통해 마우스-적합화된 인플루엔자 바이러스 A/PR/8/34(ma)(H1N1)를 유도하였다(20). 11일생 발생란에 단일 융모접종하여 바이러스 스탁을 만들었는데, 이는 마우스 병원성에는 영향을 미치지 않았다.

플라스미드 pCI-NP는, 다른 곳에서 기재한 바와 같이(30), 인플루엔자 NP 암호 서열을, CMV 바로-초기 인핸서/프로모터의 다운스트림인 발현 플라스미드 pCI (Promega #E1731) Sal I와 Sma I 위치 사이에 삽입하여 만들었다. 플라스미드 pCI-NP는 컨센서스 서열 A/PR/8/34(ma) NP cDNA를 포함하는데, 이는 요청시 발명자로부터 얻을 수 있고, 코돈 107에 침묵돌연변이(E: GAG→GAA)와 코돈 277에 추가의 Pro→Ser 돌연변이를 갖는다. 코돈 277의 돌연변이는, 주요 항원적합성 I(MHC-I) 제한성의 관심있는 면역우세 에피토프 NP366-374에 직접적으로 영향 미치지는 않는다.

재조합 레플리콘의 시험관내 전사를 위한 플라스미드 구성화

L-P1-2A 결손 및 치환을 갖는 멩고 바이러스 cDNA를 함유하는 플라스미드를 플라스미드 pMC24(pM16.1이라고도 명명, 위스콘신주, 메디슨, 위스콘신대학, 안 팔멘베르그가 제공)로부터 유도하였는데, 이는 파지 T7 프로모터의 다운스트림에 위치한 약독화 멩고 바이러스주의 전장 감염성 cDNA를 함유한다(8).

플라스미드 pM△BB(서열번호 26)는 서브게놈성 멩고 바이러스 cDNA를 포함하 는데, 여기서 누클레오티드 737 내지 3787은 Sac I/Xho I 폴리링커 (GAGCTCGAG)(서열번호 1) 및 멩고 바이러스 CRE(도 1)를 싸고있는 vMC24 cDNA의 누클레오티드 1137-1267에 의해 치환되었다. 플라스미드 pM△BB는, 플라스미드 pMN34(15)를 BstB I으로 분해(digesting)한 후 자가-연결시켜 구성하였다. pM△BB를 함유하는 박테리아는 프랑스 파리 소재의 국립 미생물 배양물 수집소(CNCM)에 2001년 5월 21일자로 접근 번호 I-2668로 기탁되어 있다. 플라스미드 pM△N34는 디자인이 pM△BB와 유사하나, 멩고 바이러스 게놈이 더 작은 정도(누클레오티드 737-3680)로 제거되어 있다.

플라스미드 pM△XBB는, 플라스미드 pM△BB로부터 CRE를 둘러싼 서열들을 제거하기 위해 구성하였다. 간략히, 올리고누클레오티드 5'-TCGAGGCTAGCTT-3'(서열번호 2)와 5'-CGAAGCTAGCC-3'(서열번호 3)을 어닐링하여 Xho I-Bst BI 링커를 얻었고, 이를 플라스미드 pMB△34의 Xho I와 Bst BI 위치 사이에서 클로닝하였다. 양성클론은 빅 다이 터미네이터 서열분석 키트(퍼킨 엘머 #P/N 4303150)와 ABI377 자동 서열분석기(퍼킨 엘머)를 사용하여 서열분석되었다.

클로닝 목적을 위해, 주형으로 pEGFP-N1(클로네텍 #6085-1)을 이용하는 프로브-리딩 PWO 폴리머라아제(로슈 #1644947)와, 프라이머로 모두 Sac I 제한 효소 위치(줄친부분)를 갖는 하기 올리고누클레오티드를 이용하여 GFP를 암호화하는 서열을 PCR 증폭시켰다: 5'-GCTGAGCTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3' (서열번호 4); 5'-GCAGAGCTCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG -3' (서열번호 5). GFP 서열을 pM△XBB 및 pM△BB 프레임내 Sac I 위치에 삽입하여 플라스미드 pM△XBB-GFP와 pM△BB-GFP를 각각 얻었다. 전술한 바와 같이, 양성 클론을 서열분석하였다.

pM△BB-NP는 두 단계로 구성되었다. 첫째, 인플루엔자 바이러스 A/PR/8/34(ma) NP의 돌연변이 cDNA를 포함하는 재조합 cDNA 단편을 PWO 폴리머라아제로 생성하고 PCR 프로토콜(22)로 중복 연장하였다. 상기 돌연변이 생성은, 코돈 277에 존재하는 돌연변이를 올바른 Pro277로 되돌리고 코돈 160에 침묵 돌연변이(D: GAT→GAC)를 도입

하여 다음 실험을 위해 BamH I 위치를 파괴하기 위해 수행되었다. 간략하게, 두개의 중복 DNA 단편은 플라스미드 pCI-NP를 올리고누클레오티드 5'-TCTCCACAGGTGTCCACTCC-3' (서열번호 6)와 5'-CACATCCTGGGGTCCATTCCGGTGCGAAC-3' (서열번호 7)로 PCR 증폭시키고, 플라스미드 pTG-NP24(이는 참조문헌 30으로 기재한 pTG-NP82에 유사하나, P277S 돌연변이를 포함하지 않음)를 올리고누클레오티드 5'-ACCGGAATGGACCCCAGGATGTGCTCTCTG-3' (서열번호 8)와 5'-GTCCCATCGAGTGCGGCTAC-3' (서열번호 9)로 PCR 증폭시켜 제조하였다. 모두 Xho I 제한 효소 부위(줄친부분)를 포함하는 올리고누클레오티드 5'-CGGAATTCTCGAGATGGCGTCTCAAGGCACCAAACG-3' (서열번호 10) 및 5'-GCGAATTCTCGAGATTGTCGTACTCCTCTGCATTGTC-3' (서열번호 11)로 생성된 융합 PCR 산물을 플라스미드 pTG 186(13)의 EcoR I 위치로 클로닝시켜 플라스미드 pTG-R4를 얻었다. 전술한 바대로 양성 클론을 서열분석하였다. 둘째, Xho I으로 분해해 pTG-R4로부터 유도된 NP 암호화 서열들을 pM△BB의 Xho I 위치에 삽입시킴으로써 이 NP 서열이 멩고 바이러스 다단백질 서열의 나머지와 함께 프레임내 있도록 하여, 플라스미드 pM△BB-NP를 제조하였다. 독특한 Sac I 위치를 이용하는 상기 플라스미드 pM△BB에 대한 방법과 동일한 방법으로(상기 참조), GFP 암호 서열을 플라스미드 pM△BB-NP로 삽입하여 플라스미드 pM△BB-GFP-NP를 얻었다. 플라스미드 pM△BB-GFP-lcmvNP를 구성하기 위해, 플라스미드 pCMV-NP를 주형으로 하고 올리고누클레오티드 5'-CGGAATTCTCGAGATGTCCTTGTCTAAGGAAGTTAAG-3' (서열번호 12)와 5'-GCGAATTCTCGAGTGTCACAACATTTGGGCCTC-3' (서열번호 13)를 이용하여 LCMV 바이러스의 NP 암호 서열을 PCR 증폭시켰다. 그 결과 생성된 DNA 단편을 플라스미드 pM△BB-GFP의 Xho I 위치로 클로닝시켰다. 전술한 바대로 양성 클론을 서열분석하였다.

LCMV의 NP118-126 H2 ^{d} -제한성 면역우세 에피토프의 암호 서열을 재구성하기 위해, 100uM 농도의 올리고누클레오티드 5'TCGAAGCTAGCGAAAGACCCCAAGCTTCAGGTGTGTATATGGGTAATTTGA CAC-3' (서열번호 14)와 5'TCGAGTGTCAAATTACCCATATACACACCTGAAGCTTGGGGTCTTTCGCTAG CT-3' (서열번호 15)를 750mM 트리스-염산 pH 7.7에서, 100°C에서 5분간 그 다음에는 20°C에서 한시간 어닐링하여, 합성 링커를 얻었다. 이 링커를 플라스미드 pM△BB-GFP의 Xho I 위치에 삽입하여, 플라스미드 pM△BB-GFP-NP118을 얻었다. 전술한 바대로, 양성 클론을 서열분석하였다.

플라스미드 pM△FM(서열번호 27)을 얻기 위해, 올리고누클레오티드 5'TCGAGGCTAGCCAGCTTTGAATTTTGACCTTCTTAAGCTTGCGGGAGACGTC GAGTCCAACCCTGGGCCCT-3' (서열번호 16)과 5'TCGAAGGGCCCAGGGTTGGACTCGACGTCTCCCGCAAGCTTAAGAAGGTCA A AATTCAACAGCTGGCTAGCC-3' (서열번호 17)을 100uM 농도로 750mM 트리스-염산 pH 7.7에서 100°C에서 5분간 그 다음에는 20°C에서 한시간 어닐링하여 합성 링커를 얻었다. 이 링커를 플라스미드 pM△BB의 Xho I 위치에 삽입하여, 플라스미드 p△2AB를 얻었다. 그 다음, 올리고누클레오티드 5'-CGAGCATG-3' (서열번호 18)와 5'-CTAGCATGCTCGAGCT-3' (서열번호 19)을 어닐링하여 다른 링커를 만들었다. 이 링커를 p△2AB의 Sac I과 Nhe I 위치 사이에 삽입하여 플라스미드 pM△FM을 얻었다. 전술한 바대로, 양성 클론을 서열분석하였다. 이 플라스미드 pM△FM를 함유하는 박테리아를 2001년 5월 21일자로 CNCM에 접근번호 I-2669로 기탁하였다.

인플루엔자 HA 서열을 클로닝하기 위해, 5M 구아니듐 이소티오시아네이트 및 페놀을 사용하여 표준 RNA 추출법으로 A/PR/8/34(ma) 감염 마우스의 폐 균질물에서 RNA 바이러스 게놈을 추출하였다. 추출된 바이러스 RNA를 cDNA로 역전사하였다. 그 다음, 개시 코돈 전과 종결 코돈 후에 Bam HI 위치를 포함하는 HA 암호 서열을 PWO 폴리머라아제와 서열 5'-CTGGATCCAAAATGAAGGCAAACCT-3' (서열번호 20); 및 5'-CAGGATCCTAGATGCATATTCTGCACTG-3' 을 사용하여 PCR 증폭시켰다. 생성된 DNA 단편을 플라스미드 pTG186의 Bam HI 위치에서 클로닝시켜 플라스미드 pTG-HA8을 얻었다.

그 다음, A/PR/8/34(ma) 바이러스 HA 암호 서열을, 플라스미드 pTG-HA8을 주형으로 하고 올리고누클레오티드 5'-GAAAGGCAAACCTACTGGTCCTGTT-3' (서열번호 22) 와 5'-CGTGCAGTCGACAGGATGCATATTCTGCACTGCAAAG-3' (서열번호 23)를 이용하여 PCR 증폭시켰다. 이 올리고누클레오티드는, 생성된 DNA 단편이 Sal I에 의해 분해되어 플라스미드 p2△AB의 클레나우-파괴된 Sac I 위치와 Nhe I 위치사이에서 클로닝되어 플라스미드 pM△FM-HA를 얻도록 고안되었다. 전술한 바와 같이 양성 클론을 서열분석하였다. 이 플라스미드는 재조합 레플리콘 cDNA를 포함하는데, 여기서는 해독 개시 Aμg 뒤에, 구제역 바이러스(FMDV)의 2A/2B 자가촉매 절단 위치와 프레임내 융합된 HA 서열이 오고, 그 뒤에 CRE, 원래의 멩고 바이러스 2A/2V 절단 위치 그리고 바이러스 다단백질의 나머지가 온다 (도 1).

플라스미드 DNA의 시험관내 전사

멩고 바이러스-유도된 플라스미드를 BamH I으로 선형화한 후 프로메가 리보맥스-T7 대용량 RNA 생산 시스템(Promega # P1300)을 사용하여 제조업체 설명서에 따라 이를 전사시켰다. 생체내 연구를 위해, 반응 혼합물을 RQ1 DNA분해효소 (1.5U/μg DNA, Promega #M6101)로 37°C에서 20분간 처리한 후, 페놀-클로로포름으로 추출하고, 표준

분자생물학 기술에 의해 아세트산암모늄-이소프로필 알콜에서 먼저 침전시킨 후 그 다음에 아세트산나트륨-이소프로필 알콜에서 침전시킨 다음 무-엔도톡신 PBS(Life Science)에 재현탁시켰다. 시험관내 전사 연구를 위해, 아세트산암모늄-이소프로필 알콜에서 침전시키고 RNA 분해효소가 없는 물에 재현탁시키는 것을 제외하고는, 반응 혼합물을 위와 동일하게 처리하였다.

토끼 그물망세포 용해물의 시험관내 해독

시험관내 합성된 RNA(10μg/ml)를, 0.8mCi/ml의 [^{35}S]-메티오닌 (Amersham #J1515; 1000Ci/mmol), 0.5mM $MgCl_2$ 및 100mM KCl이 보충된 Flexi™토끼 그물망세포 용해물 시스템(Promega #L540)으로 시험관내 해독하였다. 반응 혼합물을 30℃에서 15분간 항온배양하고, 10mM EDTA중의 100μg/ml RNA 분해효소 A로 30℃에서 15분 처리한 다음, 코닥 X-OMAT 필름에 자동으로 방사선촬영되는 12% SDS 폴리아크릴아미드 겔에 전기영동시켜 분석하였다.

RNA 트랜스펙션

이지젝트 플러스 엘렉트로포레이토(Equibio)를 사용한 엘렉트로포레이션으로 RNA를 HeLa 세포에 트랜스펙션시켰다. 간략히, $16x10^6$를 트립신 처리하고, PBS로 2회 세척한 후, 얼음-냉각 PBS 800ul에 재현탁하고, 35μg의 RNA 또는 DNA 존재하에 0.4cm 전극 갭 큐벳에서 일회 펄스로 엘렉트로포레이션 하였다. 2% FCS를 갖는 DMEM 완전 매질로 세포를 즉시 옮기고, 8개의 35mm 직경의 조직배양 접시에 분배한 후 37℃, 5% CO_2에서 항온배양하였다.

RNA 복제 분석

트랜스펙션 후 상이한 시간 간격에서 표준 방법(6)을 사용하여 세포질 RNA를 준비하였다. 1X SSC, 50% 포름아미드, 7% 포름알데히드에서 65℃, 15분간 변성시 킨 후, 이 RNA 샘플을 나일론 막(Hybond N, Amersham #RPN203N) 위에 점 찍은 후 멩고 바이러스 RNA 누클레오티드 6022-7606에 상보적인 ^{32}P-표지된 RNA 프로브로 혼성시켰다. 혼성화는, 6X SSC, 5X 덴하르트 용액 및 0.1% SDS를 포함하는 용액에서 65℃로 18시간 동안 수행하였다. 이 막을 실온에서 2X SSC, 0.1% SDS 용액으로 3회 세척하고, 다시 0.1X SSC, 0.1% SDS 용액으로 65℃에서 3회 세척하였다. 마지막으로 이 막을 STORM™820 포스포리메이저(Molecular Dynamics)에 노출시키고 이미지 퀀트 프로그램(Molecular Dynamics)으로 분석하였다.

RNA-트랜스펙션 세포에서 GFP 발현 분석

전술한 바대로 HeLa 세포를 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 후 8시간 내지 12시간에서 세포를 트립신처리 하고, PBS로 세척한 후, 100ul PBS, 1% 파라포름알데히드에서 60분간 4℃로 항온배양시켜 고정하였다. FACS칼리버 형광세포측정기(Becton-Dickinson)로 샘플의 형광강도를 분석하였다.

RNA-트랜스펙션 세포에서 인플루엔자 NP 발현 분석

인플루엔자 바이러스 A/PR/8/34-감염된 또는 RNA/DNA-트랜스펙션된 세포를 발현 최대 시점에서 2시간 동안 [35S]-메티오닌(50uCi/ml; Amershan; 1000Ci/mmol)으로 대사시키며 표지하였다. 발현 최대 시점은, rM△BB-GFP 레플리콘 RNA 또는 pCI-GFP 플라스미드 DNA로 트랜스펙션된 HeLa 세포에서의 GFP 발현 연구로 결정하 였다. RNA 트랜스펙션 세포에 대해서는 트랜스펙션 후 6 내지 9시간 사이에 최대 발현이 관찰되었다. DNA 트랜스펙션 세포에 대해서는 트랜스펙션 후 20시간에 최대 발현이 관찰되었다. 인플루엔자 바이러스 A/PR/8/34-감염된 HeLa 세포에 대해서는 감염 후 20시간에 최대 발현이 관찰되었다. 다음, 세포를 PBS로 세척하고, pH 7.5의 50mM 트리스-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1%NP40 및 0.5% 프로테아제 저해제 칵테일(Sigma)로 세포를 분해하였다. 세포 추출물을, 단백질 A 세파로스 비드(Amersham Pharmacia Biotech #17-0780-01) 존재하에 RIPA 완충액(50mM 트리스-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% 데옥시콜레이트, 0.1% 도데실황산나트륨, 0.5% NP40 및 0.5% 프로테아제 저해제 칵테일)에서 인플루엔자 A/PR/8/34/ 바이러스에 대한 토끼 항체로 4℃에서 밤새 면역침강시켰다. 이 면역침강물을 RIPA 완충액으로 세척하고, 65℃ 래믈리(Laemmli) 샘플 완충액에서 전개시키고, SDS-PAGE로 분석한 후, 코닥 X-OMAT 필름상에 자가방사선촬영하여 가시화하였다.

RNA-트랜스펙션 세포에서 GFP 융합 단백질 발현 분석

GFP(Invitrogen #46-0092)에 대해 생긴 토끼 항체를 가지고, 전술한 바와 같이, RNA/DNA 트랜스펙션된 HeLa 세포 추출물을 면역침강시킨 후 NP 발현을 분석하였다.

면역화(접종)

생후 7 내지 8주된 C57BL/6 숫컷 마우스에, 50μg 플라스미드 DNA 또는 25μg 멩고 바이러스 레플리콘 RNA를 포함하는 100ul PBS를 근육주사(각 정강 전방근육에 50ul)하였다. 3주 간격으로 근육주사로 추가접종하였다. 주사에 사용한 DNA는 Nucleobond PC2000 키트(Nucleobond #740576)를 사용하여 만들고, 트리톤 X114로 추출한 다음 페놀-클로로포름으로 추출하였다. 그 다음, QCL-1000 엔도톡신 키트(BioWhittaker #50-647U)로 측정한 바와 같이 샘플에 엔도톡신이 없다는 것을(<100U/mg) 시험하였다. 주사 전후에 아가로스 겔 전기영동으로 RNA 제제를 분석하여 분해가 없음을 확인하였다.

항체 역가

마지막 주사후 3주째에 마우스에서 혈액을 채취하였다. 혈청 샘플을 계열희석하여, 1웰 당 항원으로서 계면활성제-파괴된 A/PR/8/34 바이러스 0.5μg을 사용하는 ELISA법으로 NP-특이적 항체 역가를 측정하였다. 간단히 말하면, 96-웰 ELISA 플레이트 (NUNC Maxisorp, #439454)를 밤새 4℃에서 pH 9.6의 0.2M 탄산나트륨, 0.2M 중탄산나트륨중의 계면활성제-파괴된 A/PR/8/34 바이러스 0.5μg으로 코팅하였다. 서양고추냉이 퍼옥시다아제(HRP)(Biosystems #BI2413C)에 컨쥬게이트된 항-마우스 IgG(H+L) 항체 1/2000 희석액으로 결합 항체를 검출하였고 공급자가 지시한바와 같이 TMB 퍼옥시다아제 기질(KPL #50-76-00)을 부가하여 가시화하였다.

450nm에서 배경값에 두배에 해당하는 광학밀도를 보이는 혼주 혈청 희석치의 역수로 역가를 계산하였다. 혼주 혈청은 4마리 또는 5마리 마우스 그룹으로부터 제조되었다.

세포독성 분석

면역화한지 3주째 비장 세포를 채취하여, 10% FCS, 1.0mM 비필수 아미노산, 1mM 피루브산나트륨 및 2.5% 콘카나발린 A 상청액으로 보충된 RPMI 완전 매질에서 $2x10^{6}$ 세포/ml로 T75플라스크에 똑바로 뿌렸다. 10^{6} 동계비장세포/ml로 7일간 비장세포를 재자극시켰는데, 이는 5% FCS로 보충된 RPMI 완전 매질에서 NP366 펩티드(ASNENMETM, Neosystem; 서열번호 24) 10uM로 37℃에서 3시간 동안 맥동시켰고, 세척한 후 방사선조사하였다(2500 rads). 본질적으로는 기재된 바와 같이(9), 표준 4시간 ^{51}Cr 방출 세포독성 검정을 이용하여 재자극 이펙토 세포의 세포독성 활성을 측정하였다. 세포를 매질에서 단독으로 또는 1% 트리톤 X-100에서 각각 항온배양하여 자발적 방사성 방출 및 최대 방사성 방출을 결정하였다. 특이적 ^{51}Cr 방출 퍼센트는, (실험 방출 - 자발적 방출)/(최대 방출 - 자발적 방출) x 100으로 계산하였다.

IFNγ ELISPOT 검정

최종 접종 후 3주째에 비장 세포를 채취하여 표준 IFNγ ELISPOT 검정시스템에서 인플루엔자 또는 LCMV 바이러스-특이적 CD8+ T 세포의 존재를 분석하였다. 간략하게, 비장 세포를 20시간 동안 1uM의 인플루엔자 NP366 합성 펩티드(ASNENMETM, Neosystem; 서열번호 24) LCMV NP118-126 펩티드(PRQASGVYM, Neosystem, 서열번호 25) 및 IL-2(10U/ml)로, 공급 세포로서 1웰당 $5X10^{5}$ 조사된(2000 rads) 동계 비장 세포 존재하에 96-웰 멀티스크린 HA 니트로셀룰로오스 플레이트(Milipore)에서 자극시켰는데, 이는 랫트 항-마우스 IFNγ 항체(R4-6A2, Becton-Dickinson)로 코팅된 것이었다. 바이오틴틸레이트 항-마우스 IFNγ 항체(XMG1.2, Becton-Dickinson), 알칼리포스파타아제-컨쥬게이티드 스트렙타비딘(Becon-Dickinson) 및 BCIP/NBT 기질(Sigma)과 함께 연속적으로 항온배양하니 반점이 생겼다. 각 웰에서의 반점-생성 세포(SFC) 수를 계수함으로써 IFNγ-생성 세포 빈도수를 결정하였다. 그 결과를 SFC 수/10^{5} 비장세포로 나타내었다.

A/PR/8/34(ma) 바이러스로 마우스 접종 감염

세번째 면역화 후 1주 또는 3주째, 100mg/kg 케타민(Merial)으로 C57BL/6 마우스를 가볍게 마취시킨 후 PBS 40ul 중의 100pfu(0.1 LD_{50}) A/PR/8/34(ma) 바이러스로 비강내 접종하였다. 마우스는 접종 후 7일째 치사하였다. 폐균질물을 준비하고 MDCK 세포 단일막에서 표준 플라크 검정(36)으로 바이러스 적정하였다. 소량 샘플(정상 표준 편차, 비교대상 군집의 동일한 분산)에 대해 사용된 가정치를 가지고, 연구생 독립 t 시험(student's independent t test)을 이용하여 개별 마우스에 대해 측정한 바이러스 역가의 로그값(log_{10})에 대해 통계분석을 하였다.

플라스미드 pM△BB와 pM△FM을 함유하는 박테리아를 프랑스 파리 소재(28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France) CNCM 파스퇴르 연구소에 다음과 같이 기탁하였다.

플라스미드 접근번호 기탁일

pM△BB (서열번호 26) I-2668 2001. 5. 21.

pM△FM (서열번호 27) I-2669 2001. 5. 21.

pM△BB-GFP-lcmvNP(서열번호 28) I-2879 2002. 5. 16.

실시예 1: 멩고 바이러스 게놈으로부터 유도된 재조합 레플리콘 생성

멩고 바이러스-유도된 레플리콘을 생성하기 위해, 먼저 플라스미드 벡터 pM△BB를 구성하였는데, 여기서 캡시드 단백질의 L-P1-2A 전구체의 암호 서열은 원래 VP2 캡시드 단백질 암호 서열(15)에 위치하였던 Sac I/Xho I 다중링커와 멩고 바이러스 CRE로 치환되었다. 이 치환은, 2A의 19개의 C-말단 아미노산과 2B의 첫 아미노산(7)으로 구성된(도 1) 최적의 2A/2B 자가촉매 절단 부위에 해당하는 서열을 남기는 방식으로 행해졌다. 구체적으로, 플라스미드 pMC24 - 이는 T7 박테리오파지 φ10 프로모터 아래쪽에 위치하는 약독화 멩고 바이러스의 완전 감염성 cDNA를 포함하는데 - 의 누클레오티드 737-3787, L 및 2A 구조 단백질을 암호화하는 L-P1-2A 영역을 결손시켰다. 결손 서열은 Sac I, Xho I 폴리링커와 멩고 바이러스 CRE를 포함하는 서열로 치환되었다. 2A/2B 위치에서의 시스 자가촉매 절단을 위한 최적 서열을 포함하는 2A의 22개 C-말단 아미노산을 암호화하는 서열은 전술한 바와 같이 보존되었다. 결과물인 플라스미드 pM△BB (서열번호 26, 8017 염기쌍)는 합성 rM△BB 레플리콘 RNA의 T4 RNA 폴리머라아제로 시험관내 전사한다. 서열번호 26의 첫 염기는 레플리콘 RNA의 첫 염기에 상응하고, 전사 전 플라스미드의 선형화에 사용된 BamH I 위치는 4387 위치이고, T7 프로모터는 누클레오티드 7999 내지 8017로부터 온 것이고, 2G 잔기(누클레오티드 8016 내지 8017)는 실제 T7 RNA 폴리머라아제를 이용하여 이 플라스미드로부터 만들어진 합성 전사체의 일부이다.

그 다음, GFP, 인플루엔자 NP 또는 GFP-NP 융합 단백질을 위한 서열은 CRE의 위쪽의 pM△BB 폴리링커와 재구성된 2A/2B 절단 위치에 삽입되었고, 멩고 바이러스 다단백질을 암호화하는 프레임 내 나머지 서열들로는 플라스미드 pM△BB-GFP, pM△BB-NP 및 pM△BB-GFP-NP를 얻었다(도 1).

음성 조절 목적을 위해, 플라스미드 pM△XBB와 pM△XBB-GFP는 △X 구조물이 멩고 바이러스 CRE를 포함하지 않는다는 것을 제외하고는 pM△BB 및 pM△BB-GFP와 각각 유사하다(도 1).

본 출원에 기재된 모든 플라스미드는 당업계에 공지된 기술을 이용하여 실험실에서 얻은 것이다. 이들의 누클레오티드 서열은 공지되고 이용가능하다. PCR을 이용하여 이들을 얻은 경우에는 삽입물들의 완전한 서열분석을 통해 이들을 체크하였다.

pM△BB, pM△BB-GFP, pM△BB-NP 및 pM△BB-GFP-NP의 T7 RNA 폴리머라아제에 의한 시험관내 전사로 유도되고 BamH I로 선형화된 재조합 RNAs, rM△BB, rM△BB-GFP, rM△BB-NP 및 rM△BB-GFP-NP를 토끼 그물망세포 용해물에서 시험관내 해독하였다. 해독물을 SDS-PAGE로 분석하고 자동방사술로 가시화하였다. 도 2에서 보는 바와 같이, 레플리콘-암호화된 다단백질을 3C 프로테아제로 적절히 절단하여, 2C, 3C, 3D 및 3CD 단백질과 같은 절단 최종 생성물에 의해 증명되는 바와 같이 RNA 증폭에 필요한 비-구조성 단백질을 발현하였다. 반면, 각 rM△BB-유도된 레플리콘에서 재구성 2A/2B 위치의 정확한 시스 절단은 관찰되지 않았다. 본 발명자들은, 이물 서열이, 7개 링커 암호화된 잔기, CRE 암호화된 폴리펩티드(CREP, 44개 아미노산) 및 2A 단백질의 최종 22개의 잔기와 융합되어 이물 폴리펩티드의 크기가 약 8kD까지 증대된 융합 단백질로 발현될 것으로 기대하였다. 재조합 플라스미드 pM△BB-NP 레플리콘의 경우, 적절히 절단된 NP-CREP-2A* 융합 단백질의 발현은 a 밴드의 존재에 의해 드러나고 그 분자량은 63kD일 것으로 예상되었으나, 근사치 분자량은 70kDa이거나 약간 더 무거운 것으로 관찰되었다(도 2). 이와 반대로, GFP-CREP-2A* 및 GFP-NP-CREP-2A* 융합 단백질은 예상치(각각 35kDa 및 89kDa)와 유사한 분자량으로 이동하였다.

본 발명자들은, rM△BB-NP 레플리콘으로부터 만들어진 NP 단백질의 예상 크기와 실제 크기의 이 명백한 차이를, 2A/2B 절단이 일어나지 않았고 2B 단백질의 크기(154개의 아미노산)가 주어진다면 대신 다른 절단으로서 2B 폴리펩티드내 대략 N-말단의 1/3 정도에서 절단이 일어났다고 설명한다. 이 경우, rM△BB-NP 벡터에 의해 암호화된 NP-관련 이종 서열은 NP-CREP-2A*-△2B 융합 폴리펩티드로 발현되었다. NP 서열 및 CRE에 의해 암호화되고 절단 위치 앞에 위치한 아미노산을 신장시킨 것이 2A 나머지 서열이 절단을 허용하지 않는 방향으로 접히도록 만들었을 가능성이 있다. 현재로서 본 발명자들은 2B 폴리펩티드내 비정상적 절단이 발생한 것 에 대해 아무 설명이 없지만, 다른 피코나바이러스에 대해서는, 특히 프로세싱 단계에서 한 절단 경로가 차단된 경우(4), 다른 프로세싱 경로를 이미 기술한 바 있다.

실시예 2: 멩고 바이러스-유도된 레플리콘 rM△BB, rM△BB-GFP, rM△BB-NP 및 rM△BB-GFP-NP의 복제 특성

다음으로 본 발명자들은 이물 서열이 RNA 복제에 영향을 미치지 않으면서 멩고 바이러스 게놈에 삽입될 수 있는가를 결정하였다. 부가적으로, 인플루엔자 NP는 RNA들과 비-특이적으로 연관된다고 알려졌기 때문에(14, 32) 멩고 바이러스 RNA와의 작용은 이론적으로는 전체 복제 효율에 영향미칠 수 있을 것이다. 따라서, rM△BB, rM△BB-GFP, rM△BB-NP 및 rM△BB-GFP-NP의 합성 RNA 복사체를 HeLa 세포내로 트랜스펙션 시킨 후 다양한 시점에서 전체

세포질 RNA를 추출하였다. 멩고 바이러스 RNA의 누클레오티드 6022-7606에 상응하는 [^{32}P]- 방사표지된 리보프로브를 이용한 슬롯 블랏팅 후의 혼성화는, 모든 RNA에 대한 효율적 복제를 나타내었다(도 3). 본 발명자들의 연구에서, 세포는 엘렉트로포레이션으로 트랜스펙션되었는데 이 방법은 전통적인 DEAE-덱스트란 기술보다 더 효율적(> 50% 세포가 트랜스펙션됨)이었다. 이런 조건 하에서, 상기 4종 모두 캡시드 단백질의 존재 여부와 무관하게 세포병변효과(CPE)를 유도하였고, 트랜스펙션 후 24시간에 일반적으로 세포 단층의 파괴(데이타에 보여지지 않음)를 가져왔다. 이 모두를 고려할 때, 이 결과들은 GFP 또는 NP 암호 서열과 같은 이물 서열들을 삽입하는 경우 RNA 복제에 음성적 영향을 주기 않았다는 것을 보여준다.

<u>실시예 3: 멩고 바이러스-유도된 레플리콘에 의한 녹색형광 단백질의 발현</u>

멩고 바이러스-유도된 레플르콘으로 트랜스펙션된 세포의 530nm 형광을 모니터링하는 세포형광측정기를 이용하여 GFP 발현을 분석하였다. HeLa 세포를 rM△BB, rM△BB-GFP 또는 rM△XBB-GFP 레플리콘 RNA로 트랜스펙션 또는 가짜-트랜스펙션시켰다. 예비 실험 결과에 따를 때 시험 레플리콘 모두의 GFP 최대 발현 기간이 7시간 내지 12시간에 이르므로, 트랜스펙션 후 9 시간 째에 세포를 트립신 처리하고 FACS칼리버 세포형광측정기에서 형광강도를 분석하였다. 도 4에서 보는 바와 같이, rM△BB-GFP로 트랜스펙션된 세포에서는 GFP 발현을 검출할 수 있었던 반면 가짜로 트랜스펙션된 세포나 공벡터(empty vector) rM△BB로 트랜스펙션된 세포에서는 어떤 형광도 나타나지 않았는데, 이는 RNA 복제에 멩고 바이러스 CRE가 필요하다는 사실을 확인해 주는 것이며 따라서 이물 서열의 유의성 있는 발현을 위해서는 RNA 복제가 필요한다는 것을 증명해 주는 것이다. 이렇게, 멩고 바이러스-유도된 재조합 레플리콘은 트랜스펙션 세포에서 GFP의 효율적인 발현을 이끄는 것으로 보여졌다.

<u>실시예 4: 재조합 멩고 바이러스-유도된 레플리콘에 의한 인플루엔자 핵단백질의 발현</u>

A/PR/8/34 바이러스에 대한 항체를 가지고, 전술한 '방법'에서 기재한 바에 따라, 멩고 바이러스-유도된 레플리콘으로 트랜스펙션된 또는 A/PR/8/34 바이러스로 감염된 세포로부터 얻은 세포질 추출물의 핵단백질 발현을 분석하였다. HeLa 세포를 엘렉트로포레이션에 의해 레플리콘 RNA로 트랜스펙션 시킨 후 예비 실험 결과에 따라 최대 발현에서 [35S]-메티오닌으로 2시간 동안 대사적으로 표지시켰다. 세포질 추출물을 준비하여 인플루엔자 A/PR/8/34에 대해 생긴 다클론 항체를 이용해 단백질을 면역침강시킨 후 SDS-PAGE로 분석하고 자동방사촬영으로 가시화하였다. 도 5에서 보는 바와 같이, 겉보기 분자량 70kDa을 갖는 단백질이 rM△BB-NP로 트랜스펙션된 세포 추출물로부터 특이적으로 면역침강되었다(레인 3). 예상한대로, 가짜로 트랜스펙션된 세포 또는 공벡터 rM△BB로부터 유도된 레플리콘 RNA로 트랜스펙션된 세포에서는 면역 반응성 단백질이 검출되지 않았다.

멩고 바이러스-유도된 레플리콘에 의해 발현된 NP 융합 폴리펩티드는 겉보기 분자량 70kDa으로 이동하였는데(도 5, 레인 3), 이는 A/PR/8/34 바이러스-감염 세포(레인 6)에서 발현된 원래 형태의 NP의 분자량 55kD보다 높다. 상기 실시예 1에서 논의한 바와 같이, 분자량에 있어서의 이 차이는 시험관내 해독 실험에서 관찰된 바와 같이 NP-CREP-2A* 융합 단백질의 부가 아미노산 잔기와 2B 단백질의 부가 아미노산 잔기 때문이다. 또한, 이 관찰은, 멩고 바이러스 단단백질의 2A/2B 위치에서의 단백질분해 프로세싱이 일어나지 않고 2B 서열내 다른 절단 위치가 사용되었다는 가설과도 일치하는 것이었다. 흥미롭게도, 이는 레플리콘 RNA의 전체 복제 효율에 영향을 미치지 않았는데 이러한 사실은 이 대체적 프로세싱 경로가 멩고 바 이러스 다단백질 프로세싱 단계의 일부일 수 있다는 것을 암시하는 것이다.

재조합 레플리콘 rM△BB-GFP-NP로 HeLa 세포를 트랜스펙션하면(도 5, 레인 4), NP-관련 단백질이 또한 높은 수준으로 발현된다. 또 다시, NP-관련 물질이 예상보다 높은 분자량으로(89kDa 대신 약 97kDa 정도) 이동하기 때문에 2A/2B 위치에서의 절단이 일어나지 않은 것 같았다.

이렇듯, 멩고 바이러스-유도된 재조합 레플리콘은 트랜스펙션된 세포에서 적어도 2200개 이하 크기의 누클레오티드 이종 서열의 효율적 발현을 이끄는 것으로 밝혀졌다.

<u>실시예 5: 재조합 멩고 바이러스-유도된 레플리콘을 네이키드 RNA로 주입한 후의 NP-특이적 반응 유도</u>

이종특이적 면역 반응을 이끌어내기 위해 네이키드 멩고 바이러스 유도된 레플리콘 주입을 사용하는 것에 대한 실현가능성을 확립하기 위해, 본 발명자들은, 네이키드 RNA 상태로 주입된 재조합 rM△BB-NP가 NP-특이적 CTL 반응, 구체적으로는, NP's 우세성 H-2D ^{b} -제한 에피토프인 NP366에 대한 NP-특이적 CTL 반응을 유도할 수 있었는가를 결정하였다.

이 목적을 위해, rM△BB-NP 네이키드 RNA 25㎍를 한달 간격으로 두 번 또는 한번에 pCI-NP 네이키드 RNA 50㎍을 양성 대조군으로서 근육 주사하였다. 이러한 면역화 스케쥴은, 앞선 실험에 따라 정해진 것이고, 덜치명적인 인플루엔자 A/PR/8/34(ma) 감염(데이타는 보이지 않음)으로부터 회복된 마우스로부터 얻은 정도보다 약간 아래 수준의 검출성 NP-특이적 CTL 반응을 유도하기 위해서는 1회의 플라스미드 DNA 주사로 충분하다는 관찰에 기초한 것이

었다. 면역화 마우스에서 얻은 비장세포를 최종 주사 후 3주째에 수확하였고, NP366 펩티드로 시험관내 자극하였고 7일 후에 앞서 '방법'에서 기술한 바와 같은 전통적인 크로뮴 방출 검정법으로 세포분해 활성을 시험하였다. 비장 세포 배양은, NP366 펩티드로 로딩된 특이적으로 분해된 동계 EL4 세포의 rM△BB-NP RNA 또는 pCI-NP DNA로 감염된 마우스에서부터 시작하였다(도 6a). rM△BB-NP 레플리콘 RNA로 유도된 CTL 활성은 pCI-NP DNA로 유도된 활성에 꽤 유사하였고 높았다(즉, 이펙토 대 타겟 비 6.7:1에서 60% 내지 70% 분해). 모든 상황에서, 투여되지 않은 대조군 마우스의 자극된 비장 세포 또는 NP 서열을 함유하지 않는 대조군 벡터로 면역화된 마우스의 자극된 비장에서는 어떠한 분해(lysis)도 보이지 않았으며(도 6, 빈칸 표시), 펩티드가 담기지 않은 동계 타겟에서도 어떠한 분해도 보이지 않았다(도 6a). 결국, 모든 이펙토 군집에 있어서, 동종이형(allogeneic) P815 타겟 세포($H-2^{d}$)의 분해는 이들이 펩티드와 함께 항온배양되었는지 여부와 무관하게(데이타는 보이지 않음) 배경 수준 정도이었는데, 이는 세포분해(용해) 활성이 H-2 제한적이고 따라서 클래스 I 제한된 CD8+ T 세포 이펙토로부터 유래할 것이라는 사실을 알려주는 것이다.

마지막으로, rM△BB-NP RNA 및 pCI-NP DNA 두 근육주사로 유도된 특이적 T 세포 반응을 IFNγ ELISPOT 검정으로 정량하였다. IFNγ-생성 세포 빈도를, 전술한 '재료 및 방법'에서 기재한 바와 같이, 인플루엔자 바이러스 면역우세 NP366 펩티드로 면역화한 마우스로부터 얻은 비장 세포의 시험관내 자극에 대한 반응으로 결정하였다. 도 6c에 보인 바와 같이, T 세포 빈도가 현저히 높으며 레플리콘 RNA 및 플라스미드 DNA로 면역화한 마우스에서와 같은 정도(10^{5} 비장세포에 대해 100)이었다. 예상한대로, NP366 펩티드 부재하 또는 가짜 대조군으로 역할하는 공벡터로 면역화한 마우스에서 얻은 비장 세포에 대해서는 10^{5} 비장세포당 1 SFC 미만이 수득되었다.

이러한 발견은, 따라서, 멩고 바이러스 레플리콘은 네이키드 RNA 형태로 주입되면 명역원성이라서 인플루엔자 NP 서열과 같은 삽입된 이물 서열에 대해 이종특이적 면역성을 유도한다는 것을 보여주었다.

실시예 6: 재조합 레플리콘 rM△BB-NP로 면역화한 후 NP 특이 항체의 유도

네이키드 RNA 형태로 주입된 재조합 rM△BB-NP가 인플루에자 바이러스 항원에 대한 특이적 항체를 유도할 수 있는지를 평가하기 위해, rM△BB-NP RNA 25㎍ 또는 PCI-NP DNA 50㎍을 양성 대조군으로 하여 3주 간격으로 3회 C57BL/6 마우스에 근육주사 하였다. 최종 주입 후 3주째에 혈청을 수집(DNA에 대해 1 또는 2, RNA에 대해 2)하였다. 재료 및 방법에서 기재한 바와 같이, ELISA법으로 특이적 항-NP 항체 반응을 검사하였다.

도 7에서 보는 바와 같이, 네이키드 rM△BB-NP RNA 25㎍ 2회 주사는 인플루 엔자 NP에 대한 혈청 항체를 유도하였다. NP-특이적 ELISA 역가는 플라스미드 pCI-NP DNA 50㎍의 1회 주입으로 얻은 것 보다 약간 높았으나 pCI-NP DNA 2회 주입 후 얻은 것보다는 주목할정도로 낮았다.

실시예 5에서와 같이, 이 결과들은 멩고 바이러스 레플리콘이 네이키드 RNA로 투여되는 경우 면역원성이라서 삽입된 인플루엔자 NP 이물 서열에 대한 이종특이적 면역 반응을 유도할 수 있다는 것을 보여주었다. 이 모두를 고려할 때, 실시예 5 및 6은, 멩고 바이러스 레플리콘은 암호화된 이종 단백질에 대해 체액성(항체) 및 세포성(CTLs) 면역 반응을 모두 유도할 수 있다는 것을 증명한다.

실시예 7: 생체내 보호 면역

rM△BB-NP가 생체내에서 보호 면역을 일으킨다는 것을 보이기 위해, C57BL/6 마우스(1그룹 당 6마리)를 rM△BB 또는 rM△BB-NP 레플리콘 RNA 25㎍ 또는 pCI 또는 pCI-NP 플라스미드 DNA 50㎍으로 3주 간격으로 3회 면역화하였다. 최종 주사 후 3주째에 마우스를 102 pfu (0.1 LD_{50})의 마우스-적합화된 A/PR/8/34로 접종한 후, 접종 7일째에 폐에서의 바이러스 역가를 결정하였다. 도 8에서 보는 바와 같이, 각 NP-암호화 벡터를 주사한 마우스에서의 '바이러스 로드'는 상응하는 공벡터를 주사한 마우스에서보다 상당히 낮았다($p<0.001$; 연구생 시험).

비록 바이러스 역가의 하락이 심하지 않았다 해도 - 이는 본 발명자들의 마우스-적합화한 바이러스주의 높은 발병력(C57BL/6 마우스에 대한 LD_{50} 이 10^{3} pfu이 었슴)과 관련되었을 것인데 - 네이키드 RNA 면역화로 얻은 역가 감소는 더 좋게 기재된 네이키드 DNA 면역화로 얻은 것만큼 효율적이었다는 것에 주목할 가치가 있다. 이 관찰은, 멩고 바이러스에서 유도된 레플리콘으로 네이키드 RNA 면역화하여 유도한 면역 반응(CTLs일 것임)은 폐 바이러스 역가를 감소시킴으로써 인플루엔자에 대한 보호에 기여할 수 있다는 것을 증명한다.

실시예 8: 멩고 바이러스 게놈으로부터 유도된 재조합 rM△FM 레플리콘의 생성

이물 서열을 더욱 더 원래의 형태로 발현시키고자, 본 발명자들은 이물 물질에 융합하는 벡토 서열의 크기를 최소화하는 가능성을 조사하였다. 이를 달성하기 위해서, pM△FM 암호화 레플리콘의 폴리링커와 CRE 서열 사이에 FMDV의 2A/2B 자가촉매 절단 부위 서열을 삽입하였다(도 1). 그 최적 형태에 있어서, 이 절단 위치는 19개의 2A 단백질 C-말단 잔기와 2B 단백질의 첫 프롤린으로 이루어진 20개의 아미노산으로 구성된다(7).

결과물인 플라스미드 pM△FM(8092 염기쌍)는 서열번호 27에 해당하는데, 첫 염기는 레플리콘 RNA의 첫 염기에 상응하고, 전사 전 플라스미드를 선형화하는데 사용된 BamHI 부위는 4912 위치이고, T7 프로모터는 누클레오티드 8074-8092이고, 2G 잔기(누클레오티드 8091 및 8092)는 실제로 T7 RNA 폴리머라아제를 사용하여 이 플라스미드로부터 만들어진 합성 전사체의 일부이다.

다음, 인플루엔자 A/PR/8/34(ma) 바이러스의 HA 유전자 서열을 FMDV 2A 서열 의 바로 위쪽인 pM△FM의 Sac I와 Nhe I 위치 사이에 삽입하고, 프레임내 다른 남은 다단백질 서열들과 함께 플라스미드 pM△FM-HA를 얻었다.

이 구성물이 다단백질로 해독되고 예측된대로의 최종 생성물로 절단될 수 있다는 것을 증명하기 위해, 상응하는 선형화 플라스미드를 시험관내 전사하고 합성 RNA를 토끼 그물망세포 용해물에서 전술한 바와 같이 해독하였다. 모든 레플리콘은, 2C, 3C, 3D 및 3CD 바이러스 폴리펩티드의 존재로 증명되듯이 정확하게 절단된 최종 생성물의 해독 프로필과 유사한 프로필을 보였다(도 9A).

특히, 재조합 레플리콘 rM△BB-HA에 대해 재구성된 FMDV 2A/2B 위치의 정확한 시스(*in cis*) 절단이 관찰되었고, 따라서 FMDV 2A* 단백질(21 aa)의 26개 여분 아미노산 잔기와 폴리링커(5 aa)를 포함하는 적절히 절단된 HA-2A* 융합 단백질이, a 밴드의 존재에 의해 밝혀졌으며 그 예상 분자량은 65kDa이었다. 흥미롭게도, 더 높은 분자량의 a 밴드 존재는 이 시험관내 해독 검정에서 이 절단이 100% 효율적이지 않았다는 거을 암시하였다.

상응하는 모 레플리콘 rM△FM에 대해서는 이러한 절단 생성물 - 이는 3.4kDa MCS-2A 융합 단백질로 나타났을 것인데 - 은 그 작은 크기로 인해 보이지 않았지만, 겉보기 분자량 16kDa의 폴리펩티드는 존재하였다; 이 폴리펩티드는 멩고 바이러스 CRE, 멩고 바이러스 2A의 마지막 22개 잔기 및 2B의 N-말단에 걸친 서열에 상응할 것이고, 이 경우 전술한 rM△BB와 rM△BB-NP 레플리콘 경우에서 보인 바와 같이 FMDV 2A/2B 위치는 절단되는 반면 원래의 멩고 바이러스 2A/2B는 절단되지 않고 남아있었다는 것을 암시하였다.

상기 2대 레플리콘의 복제 효율성을 시험하기 위해, HeLa 세포를 합성 RNA로 엘렉트로포레에션에 의해 트랜스펙션 시켰고, 트랜스펙션 후 상이한 시간 간격에서 세포질 RNA를 추출하여, 멩고 바이러스 게놈의 누클레오티드 6022-7606에 상보적인 멩고 바이러스 특이적 [^{32}P]-표지된 리보프로브를 사용하여 노던 혼성화로 분석하였다. 도 9B에 나타낸 바와 같이, rM△FM 레플리콘은 그 모체 rM△BB 만큼 효율적으로 복제하였고 이는 새로운 기술처리된 2A/2B 절단은 RNA 합성에 부작용을 끼치지 않았다는 것을 알려주는 것이다. 반면, rM△FM-HA 재조합 레플리콘은 복제에 적합하지 않았다.

rM△FM-HA 레플리콘에 존재하는 HA는 SP 및 TM 영역을 함유하기 때문에, 이 발견은 다른 피코나바이러스인 폴리오바이러스로부터 구성된 레플리콘 경우와 유사할 수 있다. 정말로, 폴리오바이러스 레플리콘 다단백질 N-말단에 바로 인접하여 SP 영역이 존재하면 그 상응하는 RNA의 복제가 폐기된다(1, 16)는 것이 발견되었다. 본 발명자들은 최근에 △P1 폴리오바이러스 레플리콘의 복제가 인플루엔자 HA의 완전한 서열을 삽입함으로써 없어졌다는 것을 보임으로써 이 관찰사실을 확증하였는데, 이 서열은 글리코실화된 막통과 단백질이었다. 더우기, 본 발명자들은, 폴리오바이러스에서 유도되고 그 P1 영역이 제거된 레프리콘을 사용하여 - 만일 이 레플리콘이 EMCV IRES와 같은 이종 IRES를 이물 서열과 남아있는 P2P3 다단백질 서열 사이에 삽입시켜 디시스트로닉으로 만들어졌다면 - 글리코실화된 HA 서열을 발현시키는 것이 가능하다는 사실을 증명하였다.

따라서, 디시스트로닉 멩고 바이러스 레플리콘을 구성할 수 있다. 이는 제일 먼저 이물의 바이러스 또는 포유동물 IRES를, 플라스미드 pM△BB의 Sac I/Xho I 폴리링커와 나머지 남은 다단백질 서열 사이에 삽입시킴으로써 구성될 수 있다. 예를 들어, 이런 디시스트로닉 멩고 바이러스 레플리콘은 말 비염 바이러스 A형 또는 B형의 이물 IRES를 삽입시켜 구성할 수 있는데, 이는 이들 두 IRES가 카디오바이러스 속 표본인 EMCV 바이러스의 IRES를 갖는 해독 인자에 대해 효율적으로 경쟁하기 때문이다(38). 디시스트로닉 폴리오바이러스 레플리콘에 대한 본 발명자들의 이전 연구에서 증명된 바와 같이, 이러한 디시스트로닉 멩고 바이러스 레플리콘은 글리고실화 이물 폴리펩티드를 복제하고 발현할 수 있다. 예를 들어, 인플루엔자 HA 서열은 이들 새로운 디시스트로닉 멩고 바이러스 레플리콘 중 하나에 삽입될 수 있다.

이 새로운 디시스트로닉 멩고 바이러스 레플리콘은, 글리코실화가 폴리펩티드의 항원성 또는 생물확적 활성에 주요 파라미터가 되면, 관심있는 이물 항원 또는 단백질이 발현되도록 할 것이다. 예를 들어, 멩고 바이러스 디시스트로닉 레플리콘을 사용하여 B형 간염 바이러스의 HB 항원 또는 인간 면역결핍 바이러스의 엔벨롭 당단백질 또는 인간 종양 세포의 표면 항원과 같은 암 항원을 발현시키는데 사용될 수 있다.

멩고 바이러스 rM△FM 레플리콘 벡터는 또한, 토끼 그물망세포 용해물에서 관찰된 바와 같이, 트랜스펙션된 세포에서 비-글리코실화 이물 단백질의 본래의 발현을 이끄는데 사용될 수 있다.

<u>실시예 9: 멩고 바이러스 레플리콘에 의한 다른 항원, LCMV 핵단백질(NP) 또는 LCMV NP118-126 에피토프의 발</u>

현

네이키드 RNA 형태로 접종된 멩고 바이러스-유도된 레플리콘이 다른 항원에 대한 이종특이적 면역 반응을 유도할 수 있다는 것을 보이기 위해, 본 발명자들은 rM△BB-GFP-lcmvNP 및 rM△BB-GFP-NP118 레플리콘을 구성하였다. 이 레플리콘은 각각 GFP와의 융합 단백질로서의 LCMV의 NP 및 NP118-126 H2d-제한적 면역우세 에피토프를 암호화한다.

이를 달성하기 위해, 재료 및 방법에서 기재한 바에 따라 플라스미드 pM△BB-GFP-lcmvNP (서열번호 28, 10417 염기쌍)를 구성하였다. 전사 전 플라스미드 선형화에 사용한 BamHI 위치는 7237위치이다. T7 프로모터는 누클레오티드 10399 부터 10417까지이고 2G 잔기 (누클레오티드 10416 및 10417)는 사실상 T7 RNS 폴리머라아제를 사용하여 이 플라스미드로부터 만들어진 합성 전사체의 일부이다.

다음, GFP와의 융합 단백질로서의 LCMV NP의 발현은, rM△BB-GFP-lcmvNP 레플리콘 RNA로 엘렉트로포레이션된 HeLa 세포의 세포질 추출물 내 예상 분자량이 97kDa인 a 밴드의 존재로 인해 밝혀졌다(도 10). GFP의 발현은 또한, 레플리콘으로 트랜스펙션된 HeLa 세포의 530nm 형광을 모니터링하는 세포형광측정기에 의해 증명될 수 도 있다(도 12). 마찬가지로, 15개 아미노산 전구체(NP116-130, 대략 1.7kDa)로서의 NP118-126 LCMV 에피토프의 발현은 GFP보다 약간 더 무거운(35kDa) 융합 단백질로서 검출되었다. 이는, 재조합 rM△BB-GFP-lcmvNP 및 rM△BB-GFP-NP118 RNA는 모체 rM△BB-GFP 레플리콘에 대해 전술한 바와 같이 복제되고 삽입된 서열의 합성을 허용하였다는 것을 알려주는 것이다. 나아가, 실시예 3과 함께, 이는 GFP 발현은 적절한 멩고 바이러스-유도된 레플리콘의 RNA 복제를 위한 마커로서 용이하게 사용될 수 있다는 것을 보여주었다.

마지막으로, BALB/c 마우스를 양성 대조군으로서 25μg의 rM△BB-GFP, rM△BB-GFP-lcmvNP 또는 rM△BB-GFP-NP118 네이키드 RNA 또는 50μg의 pCMV-NP 또는 pCMV-MG34 (40) 네이키드 RNA로 2회 근육주사하였다. 재료 및 방법에서 기재한 바와 같이, LCMV 면역우세 NP118-126 펩티드로 면역화된 마우스로부터 얻은 비장세포의 시험관내 자극에 반응하는 IFNγ ELISPOT 검정법으로, IFNγ-생성 세포의 빈도를 결정하였다. 도 11에 나타낸 바와 같이, rM△BB-GFP-lcmvNP 또는 rM△BB-GFP-NP118 레플리콘은 모두 고 빈도의 LCMV-특이적 T 세포(10^5 비장세포 당 70-200)를 유도하였다. 흥미롭게도, 이 빈도는 플라스미드 DNA로 유전 면역화한 후 관찰한 것 보다 약간 높은 것이었다.

결론적으로, 이러한 결과들은 멩고 바이러스 레플리콘이 전장의 이물 항원이든 이물 에피토프에 상응하는 짧은 관련 펩티드이든 면역원성 형태로 발현할 수 있기 때문에 이들이 이종특이적 면역 반응을 이끌어내는데 다능한 수단이라는 것을 보여주었다.

본 발명을 모두 상세히 기재하였는 바, 당업자는 본 발명이 본 발명의 정신 및 범주에서 벗어남 없이 그리고 과도한 실험 없이도 균등 범위 및 조건에서 실시될 수 있는 것으로 이해할 것이다. 또한, 본 발명이 어떤 구체적 양태 및 실시예에 비추어 기재되었지만, 본 발명자들은 본 발명이 더 변형될 수 있다고 믿는다. 본 출원은 전술한 일반 원칙을 따르는 본 발명의 어떠한 변형, 용도, 또는 적응도 모두 포함하는 것으로 의도한다.

본 출원에서 인용한 모든 참조문헌, 매뉴얼, 특허 및 특허 출원은 모두 그대로 본 명세서에 참조문헌으로 통합된다.

참조문헌:

1. Ansardi, D. C., Z. Moldoveanu, D. C. Porter, D. E. Walker, R. M. Conry, A. F. LoBuglio, S. McPherson, and C. D. Morrow 1994. Characterization of poliovirus replicons encoding carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 54:6359-64.

2. Bot, A., S. Bot, A. Garcia-Sastre, and C. Bona 1996. DNA immunization of newborn mice with a plasmid-expressing nucleoprotein of influenza virus. *Viral Immunol.* 9:207-10.

3. Choi, W. S., R. Pal-Ghosh, and C. D. Morrow 1991. Expression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gag, pol, and env proteins from chimeric HIV-1-poliovirus minireplicons. *J. Virol.* 65:2875-83.

4. Cohen, L., K. M. Kean, M. Girard, and S. Van der Werf 1996. Effects of P2 cleavage site mutations on poliovirus polyprotein processing. *Virology.* 224:34-42.

5. Conry, R. M., A. F. LoBuglio, M. Wright, L. Sumerel, M. J. Pike, F. Johanning, R. Benjamin, D. Lu, and D. T. Curiel 1995. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res.* 55:1397-400.

6. Dalemans, W., A. Delers, C. Delmelle, F. Denamur, R. Meykens, C. Thiriart, S. Veenstra, M. Francotte, C. Bruck, and J. Cohen 1995. Protection against homologous influenza challenge by genetic immunization with SFV-RNA encoding Flu-HA. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 772:255-6.

7. Donnelly, M. L., D. Gani, M. Flint, S. Monaghan, and M. D. Ryan 1997. The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins. *J. Gen. Virol.* 78:13-21.

8. Duke, G. M., and A. C. Palmenberg 1989. Cloning and synthesis of infectious cardiovirus RNAs containing short, discrete Poly(C) tracts. *J. Virol.* 63:1822-1826.

9. Escriou, N., C. Leclerc, S. Gerbaud, M. Girard, and S. van der Werf 1995. Cytotoxic T cell response to Mengo virus in mice: effector cell phenotype and target proteins. *J. Gen. Virol.* 76:1999-2007.

10. Fleeton, M. N., M. Chen, P. Berglund, G. Rhodes, S. E. Parker, M. Murphy, G. J. Atkins, and P. Liljeström 2001. Self-replicating RNA vaccines elicit protection against Influenza A Virus, Respiratory Syncytial Virus, and a Tickborne Encephalitis Virus. *J. Infect. Dis.* 183:1395-8.

11. Frolov, I., T. A. Hoffman, B. M. Pragai, S. A. Dryga, H. V. Huang, S. Schlesinger, and C. M. Rice 1996. Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:11371-7.

12. Kaplan, G., and V. R. Racaniello 1988. Construction and characterization of poliovirus subgenomic replicons. *J. Virol.* 62:1687-96.

13. Kieny, M. P., G. Rautmann, D. Schmitt, K. Dott, S. Wain-Hobson, M. Alizon, M. Girard, S. Chamaret, A. Laurent, L. Montagnier, and J. P. Lecocq 1986. AIDS virus env protein expressed from a recombinant vaccinia virus. *Biotechnology.* 4:790-795.

14. Kingsbury, D. W., I. M. Jones, and K. G. Murti 1987. Assembly of influenza ribonucleoprotein in vitro using recombinant nucleoprotein. *Virology.* 156:396-403.

15. Lobert, P. E., N. Escriou, J. Ruelle, and T. Michiels 1999. A coding RNA sequence acts as a replication signal in cardioviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:11560-5.

16. Lu, H. H., L. Alexander, and E. Wimmer 1995. Construction and genetic analysis of dicistronic polioviruses containing open reading frames for epitopes of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* 69:4797-806.

17. Martinon, F., S. Krishnan, G. Lenzen, R. Magno, E. Gomard, J.-G. Guillet, J.-P. Levy, and P. Meulien 1993. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur. J. Immunol.* 23:1719-1722.

18. Moldoveanu, Z., D. C. Porter, A. Lu, S. McPherson, and C. D. Morrow 1995. Immune responses induced by administration of encapsidated poliovirus replicons which express HIV-1 gag and envelope proteins. *Vaccine.* 13:1013-22.

19. Nichols, W. W., B. J. Ledwith, S. V. Manam, and P. J. Troilo 1995. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 772:30-9.

20. Oukka, M., J. C. Manuguerra, N. Livaditis, S. Tourdot, N. Riche, I. Vergnon, P. Cordopatis, and K. Kosmatopoulos 1996. Protection against lethal viral infection by vaccination with nonimmunodominant peptides. *J. Immunol.* 157:3039-45.

21. Percy, N., W. S. Barclay, M. Sullivan, and J. W. Almond 1992. A poliovirus replicon containing the chloramphenicol acetyltransferase gene can be used to study the replication and encapsidation of poliovirus RNA. *J. Virol.* 66:5040-6.

22. Pogulis, R. J., A. N. Vallejo, and L. R. Pease 1996. In vitro recombination and mutagenesis by overlap extension PCR. *Methods Mol Biol.* 57:167-76.

23. Porter, D. C., J. Wang, Z. Moldoveanu, S. McPherson, and C. D. Morrow 1997. Immunization of mice with poliovirus replicons expressing the C-fragment of tetanus toxin protects against lethal challenge with tetanus toxin. *Vaccine.* 15:257-64.

24. Pushko, P., M. Parker, G. V. Ludwig, N. L. Davis, R. E. Johnston, and J. F. Smith 1997. Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology.* 239:389-401.

25. Qiu, P., P. Ziegelhoffer, J. Sun, and N. S. Yang 1996. Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization. *Gene Therapy.* 3:262-8.

26. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed, vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

27. Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, S. E. Parker, G. H. Rhodes, P. L. Felgner, V. J. Dwarki, S. H. Gromkowski, R. R. Deck, C. M. DeWitt, A. Friedman, L. A. Hawe, K. R. Leander, D. Martinez, H. C. Perry, J. W. Shiver, D. L. Montgomery, and M. A. Liu 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science.* 259:1745-1749.

28. Ulmer, J. B., T. M. Fu, R. R. Deck, A. Friedman, L. Guan, C. DeWitt, X. Liu, S. Wang, M. A. Liu, J. J. Donnelly, and M. J. Caulfield 1998. Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J. Virol.* 72:5648-53.

29. Vignuzzi, M., S. Gerbaud, S. van der Werf, and N. Escriou 2002. Expression of a membrane-anchored glycoprotein, the Influenza hemagglutinin, by dicistronic replicons derived from the poliovirus genome. *J. Virol.* 76:5285-90.

30. Vignuzzi, M., S. Gerbaud, S. van der Werf, and N. Escriou 2001. Naked RNA immunization with replicons derived from the poliovirus and Semliki Forest virus genomes for the generation of a cytotoxic T cell (CTL) response against the Influenza A virus nucleoprotein. *J. Gen. Virol.* 82:1737-47.

31. Wolff, J. A., J. J. Ludtke, G. Acsadi, P. Williams, and A. Jani 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Human Molecular Genetics.* 1:363-9.

32. Yamanaka. K., A. Ishihama, and K. Nagata 1990. Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J. Biol. Chem.* 265:11151-5.

33. Ying. H., T. Z. Zaks, R. F. Wang, K. R. Irvine, U. S. Kammula, F. M. Marincola, W. W. Leitner, and N. P. Restifo 1999. Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. *Nature Medicine.* 5:823-7.

34. Zhou, X., P. Berglund, G. Rhodes, S. E. Parker, M. Jondal, and P. Liljeström 1994. Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine. *Vaccine.* 12:1510-1514.

35. Kurth, R. 1995. Risk potential of the chromosomal insertion of foreign DNA. Ann. N.Y. Acad. of Sci. 772:140-51.

36. Manuguerra, J.C. and C. Hannoun 1999. Influenza and other Viral Respiratory Diseases, surveillance and laboratory diagnosis. Edited by the Institut Pasteur. ISBN 2-901320-28-7.

37. Hoerr, I., R. Obst, H.G. Rammensee, and G. Jung 2000. *In vivo* application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. Eur. J. Immunol. 30:1-7.

38. Hinton, T.M. and B.S. Crabb 2001. The novel picornavirus Equine rhinitis B virus contains a strong type II internal ribosomal entry site which functions similarly to that of Encephalomyocarditis virus. *J. Gen. Virol.* 82:2257-69.

39. Yokoyama, M. J. Zhang, and J.L. Whitton 1995. DNA immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Virol.* 69:2684-88.

40. Rodriguez, F. L.L. An, S. Harkins, J. Zhang, M. Yokouama, G. Widera, J.T. Fuller, C. Kincaid, I.L. Campbell, and J.L. Whitton 1998. DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. *J. Virol.* 72:5174-81.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a) RNA 바이러스의 비-구조 단백질을 암호화하는 RNA 서열;

(b) 바이러스 복제에 필요한 바이러스성 비-암호화 RNA 서열; 및

(c) 이종단백질 또는 이종단백질 단편을 암호화하는 RNA 서열

을 포함하는, RNA 바이러스 바이러스성 게놈의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자.

청구항 2.
(a) RNA 바이러스의 비-구조 단백질을 암호화하는 RNA 서열;

(b) 바이러스 복제에 필요한 바이러스성 비-암호화 RNA 서열; 및

(c) 이종단백질 또는 이종단백질 단편을 암호화하는 RNA 서열을 포함하고 상기 (a)의 RNA 서열 및/또는 상기 (b)의 바이러스성 비-암호화 RNA 서열이 돌연변이형 또는 절단형(truncated form)인, RNA 바이러스 바이러스성 게놈의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자.

청구항 3.
제1항 또는 제2항에 있어서, RNA 바이러스가 카디오바이러스 또는 아프토바이러스 속인 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자.

청구항 4.
제3항에 있어서, RNA 바이러스가 멩고 바이러스인 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자.

청구항 5.
제4항에 있어서, 멩고 바이러스 VP2 유전자의 시스-작용 복제 요소(CRE)를 더 포함하는 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자.

청구항 6.
제4항에 있어서, 테일러 바이러스 VP2 유전자의 시스-작용 복제 요소(CRE)를 더 포함하는 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자.

청구항 7.
제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 이종단백질이 생물학적 활성 단백질, 리포터 단백질, 세포독성 단백질, 병원체 단백질 또는 종양 단백질중에서 선택된 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자.

청구항 8.
제7항에 있어서, 리포터 단백질이 녹색 형광 단백질인 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자.

청구항 9.
제7항에 있어서, 병원체 단백질이 인플루엔자 핵단백질 또는 인플루엔자 헤마글루티닌인 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자.

청구항 10.
제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 이종단백질 단편이 상기 이종단백질의 항원 또는 에피토프인 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자.

청구항 11.
제1항 내지 제7항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 백신.

청구항 12.
제11항에 있어서, 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자가 네이키드 RNA인 백신.

청구항 13.
제11항에 있어서, 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자가 캡시드화 RNA인 백신.

청구항 14.
제11항 내지 제13항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 담체가 물, 석유유, 동물유, 식물유, 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름, 식염수, 수용성 덱스트로즈, 글리세롤 용액, 다가양이온 입자, 단백질 입자, 프로타민 입자, 리포좀 및 금 입자중에서 선택된 백신.

청구항 15.
(a) 약제학적으로 허용가능한 담체내의 제1항 내지 제7항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 제제로 숙주를 면역화하는 단계를 포함하는, 숙주에서 보호 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 16.
제15항에 있어서, 단계 (a)의 제1항 내지 제7항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항에 따른 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자가 네이키드 형태인, 숙주에서 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 17.
제15항에 있어서, 단계 (a)의 제1항 내지 제7항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항에 따른 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자가 캡시드화 RNA인, 숙주에서 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 18.
제15항 내지 제17항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 담체가 물, 석유유, 동물유, 식물유, 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름, 식염수, 수용성 덱스트로즈, 글리세롤 용액, 다가양이온 입자, 단백질 입자, 프로타민 입자, 리포좀 및 금 입자 중에서 선택된, 숙주에서 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 19.
제15항 내지 제18항에 있어서, 숙주가 사람, 돼지, 개, 고양이, 소, 닭, 마우스 또는 말인, 숙주에서 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 20.
(a) RNA 바이러스의 비-구조 단백질을 암호화하는 RNA 서열;

(b) 바이러스 복제에 필요한 바이러스성 비-암호화 RNA 서열; 및

(c) 이종단백질 또는 이종단백질 단편을 암호화하는 RNA 서열

을 포함하는 RNA 바이러스 바이러스성 게놈의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자를 암호화하는 DAN 분자.

청구항 21.
(a) RNA 바이러스의 비-구조 단백질을 암호화하는 RNA 서열;

(b) 바이러스 복제에 필요한 바이러스성 비-암호화 RNA 서열; 및

(c) 이종단백질 또는 이종단백질 단편을 암호화하는 RNA 서열을 포함하고 상기 (a)의 RNA 서열 및/또는 상기 (b)의 바이러스성 비-암호화 RNA 서열이 돌연변이형 또는 절단형(truncated form)인 RNA 바이러스 바이러스성 게놈의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자를 암호화하는 DNA 분자.

청구항 22.
제20항 또는 제21항에 있어서, RNA 바이러스가 카디오바이러스 또는 아프토바이러스 속인 DNA 분자.

청구항 23.
제22항에 있어서, RNA 바이러스가 멩고 바이러스인 DNA 분자.

청구항 24.
제23항에 있어서, 멩고 바이러스 VP2 유전자의 시스-작용 복제 요소(CRE)를 포함하는 RNA 분자를 추가로 암호화하는 DNA 분자.

청구항 25.
제23항에 있어서, 테일러 바이러스 VP2 유전자의 시스-작용 복제 요소(CRE)를 포함하는 RNA 분자를 추가로 암호화하는 DNA 분자.

청구항 26.
제20항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 이종단백질이 생물학적 활성 단백질, 리포터 단백질, 세포독성 단백질, 병원체 단백질 또는 종양 단백질중에서 선택된 DNA 분자.

청구항 27.

제26항에 있어서, 리포터 단백질이 녹색 형광 단백질인 DNA 분자.

청구항 28.

제26항에 있어서, 병원체 단백질이 인플루엔자 핵단백질 또는 인플루엔자 헤마글루티닌인 DNA 분자.

청구항 29.

제26에 있어서, 이종단백질 단편이 상기 이종단백질의 항원 또는 에피토프인 DNA 분자.

청구항 30.

제26항에 있어서, 적합한 클로닝 벡터를 더 포함하는 DNA 분자.

청구항 31.

서열번호 26 (2001. 5. 21.자로 프랑스 파리 세덱스 15, 75724, 루 드 닥터 룩스 28, 파스퇴르 연구소 CNCM에 접근 번호 I-2668로 기탁)의 서열 또는 그 단편 및 발현가능 형태의 이종 단백질 또는 그 단편을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DAN 분자.

청구항 32.

돌연변이형 또는 절단형의 서열번호 26 (2001. 5. 21.자로 프랑스 파리 세덱 스 15, 75724, 루 드 닥터 룩스 28, 파스퇴르 연구소 CNCM에 접근 번호 I-2668로 기탁)의 서열 또는 그 단편 및 발현가능 형태의 이종 단백질 또는 그 단편을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DAN 분자.

청구항 33.

제31항 또는 제32항에 있어서, 이종 단백질이 생물학적 활성 단백질, 리포터 단백질, 세포독성 단백질, 병원체 단백질 또는 종양 단백질 중에서 선택된 DNA 분자.

청구항 34.

제33항에 있어서, 리포터 단백질이 녹색 형광 단백질인 DNA 분자.

청구항 35.

제33항에 있어서, 병원체 단백질이 인플루엔자 핵단백질 또는 인플루엔자 헤마글루티닌인 DNA 분자.

청구항 36.

제31항 또는 제32항에 있어서, 이종단백질 단편이 상기 이종단백질의 항원 또는 에피토프인 DNA 분자.

청구항 37.

서열번호 27 (2001. 5. 21.자로 프랑스 파리 세덱스 15, 75724, 루 드 닥터 룩스 28, 파스퇴르 연구소 CNCM에 접근 번호 I-2669로 기탁)의 서열 또는 그 단편 및 이종 단백질 또는 그 단편을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DAN 분자.

청구항 38.

돌연변이형 또는 절단형의 서열번호 26 (2001. 5. 21.자로 프랑스 파리 세덱스 15, 75724, 루 드 닥터 룩스 28, 파스퇴르 연구소 CNCM에 접근 번호 I-2668로 기탁)의 서열 또는 그 단편 및 발현가능 형태의 이종 단백질 또는 그 단편을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DAN 분자.

청구항 39.

제37항 또는 제38항에 있어서, 이종 단백질이 생물학적 활성 단백질, 리포터 단백질, 세포독성 단백질, 병원체 단백질 또는 종양 단백질 중에서 선택된 DNA 분자.

청구항 40.

제39항에 있어서, 병원체 단백질이 인플루엔자 핵단백질 또는 인플루엔자 헤마글루티닌인 DNA 분자.

청구항 41.

제37항 또는 제38항에 있어서, 이종단백질 단편이 상기 이종단백질의 항원 또는 에피토프인 DNA 분자.

청구항 42.

(a) 약제학적으로 허용가능한 담체내의 제20항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 DNA 분자를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 제제로 숙주를 면역화하는 단계를 포함하는, 숙주에서 보호 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 43.
제42항에 있어서, DNA 분자가 네이키드 DNA인, 숙주에서 보호 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 44.
제42항에 있어서, DNA 분자가 캡시드화 DNA인, 숙주에서 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 45.
허용가능한 매질 중에 제1항 내지 제7항, 제9항 및 제10항에 따른 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자 또는 제20항 내지 제41항에 따른 DNA 분자를 하나 이상 포함하는, 치료용 조성물.

청구항 46.
허용가능한 매질 중에 제1항 내지 제7항, 제9항 및 제10항에 따른 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자 또는 제20항 내지 제41항에 따른 DNA 분자를 하나 이상 포함하는, 치료용 키트.

청구항 47.
(a) 약제학적으로 허용가능한 담체내 존재하는 제1항 내지 제7항, 제9항 및 제10항중 어느 한 항에 따른 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자 및 제20항 내지 제41항중 어느 한 항에 따른 DNA 분자중에서 선택된 하나 이상의 DNA 분자를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 제제로 숙주를 면역화하는 단계를 포함하는, 숙주에서 면역 반응을 조절하는 방법.

청구항 48.
제42항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 담체가 물, 석유유, 동물유, 식 물유, 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름, 식염수, 수용성 덱스트로즈, 글리세롤 용액, 다가양이온 입자, 단백질 입자, 프로타민 입자, 리포좀 및 금 입자 중에서 선택된 방법.

청구항 49.
제42항에 있어서, 숙주가 사람, 돼지, 개, 고양이, 소, 닭, 마우스 또는 말인 방법.

청구항 50.
(a) 제1항 내지 제7항, 제9항 및 제10항중 어느 한 항에 따른 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자 또는 제20항 내지 제41항중 어느 한 항에 따른 DNA 분자중에서 선택된 하나 이상의 DNA 분자를 캡시드 단백질 P1 전구체를 발현하는 세포에 트랜스펙션시키는 단계;

(b) 상기 트랜스펙션된 세포로부터 캡시드화 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자를 제조하는 단계; 및

(c) 상기 단계 (b)의 제제로 숙주를 면역화하는 단계를 포함하는,

캡시드화 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자를 생성함으로써 RNA 바이러스 바이러스성 게놈의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA의 면역원성을 개선하는 방법.

청구항 51.
(a) 제1항 내지 제7항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항에 따른 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA 분자를 농축하는 단계; 및

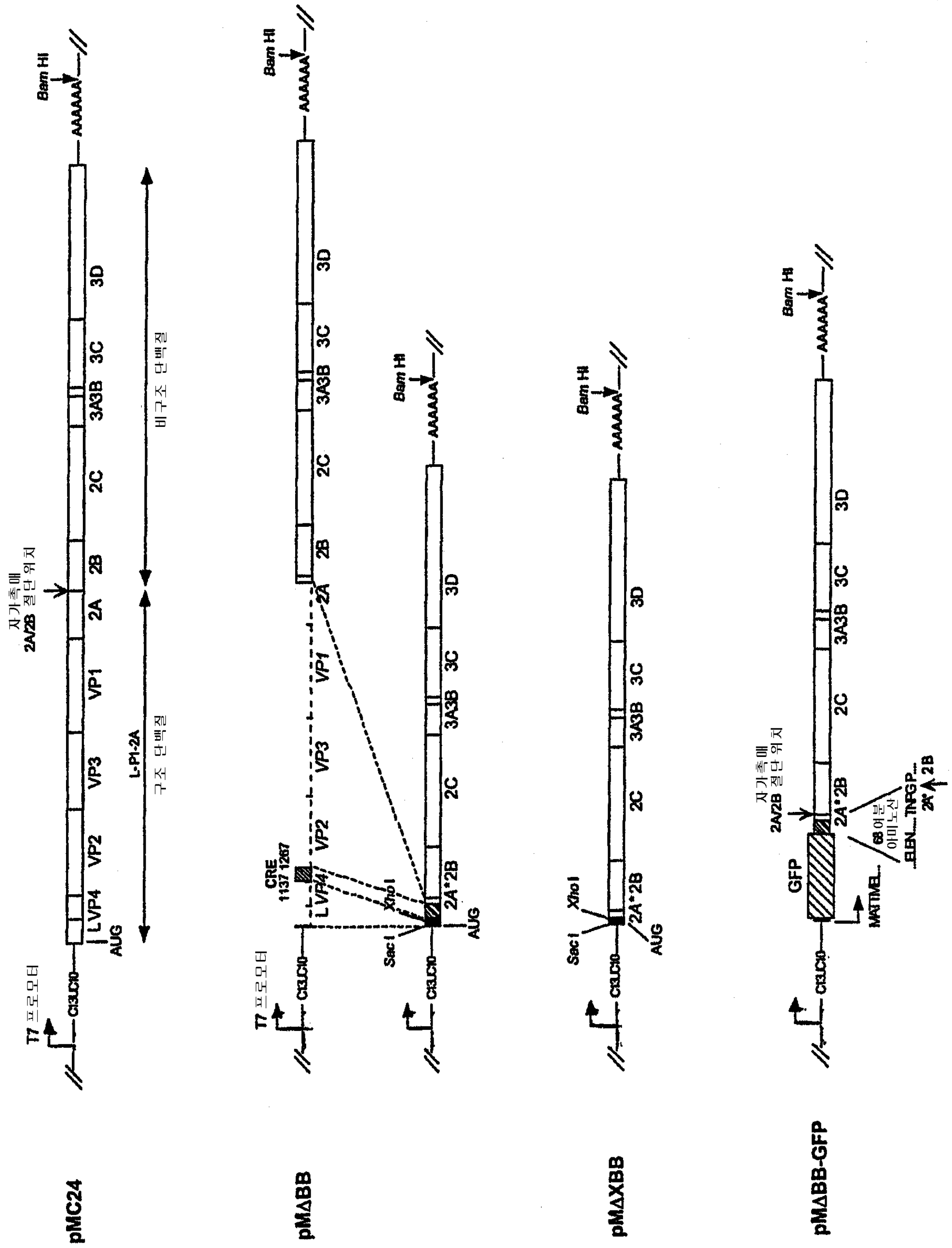
(b) 상기 단계 (a)의 농축된 RNA 분자로 숙주를 면역화하는 단계를 포함하 는, RNA 바이러스 바이러스성 게놈의 자가-복제 재조합 양성쇄 RNA의 면역원성을 개선하는 방법.

청구항 52.
제31항에 있어서, 서열번호 28 (2001. 5. 16.자로 프랑스 파리 세덱스 15, 75724, 루 드 닥터 룩스 28, 파스퇴르 연구소 CNCM에 접근 번호 I-2879로 기탁)의 서열을 포함하는 DNA 분자.

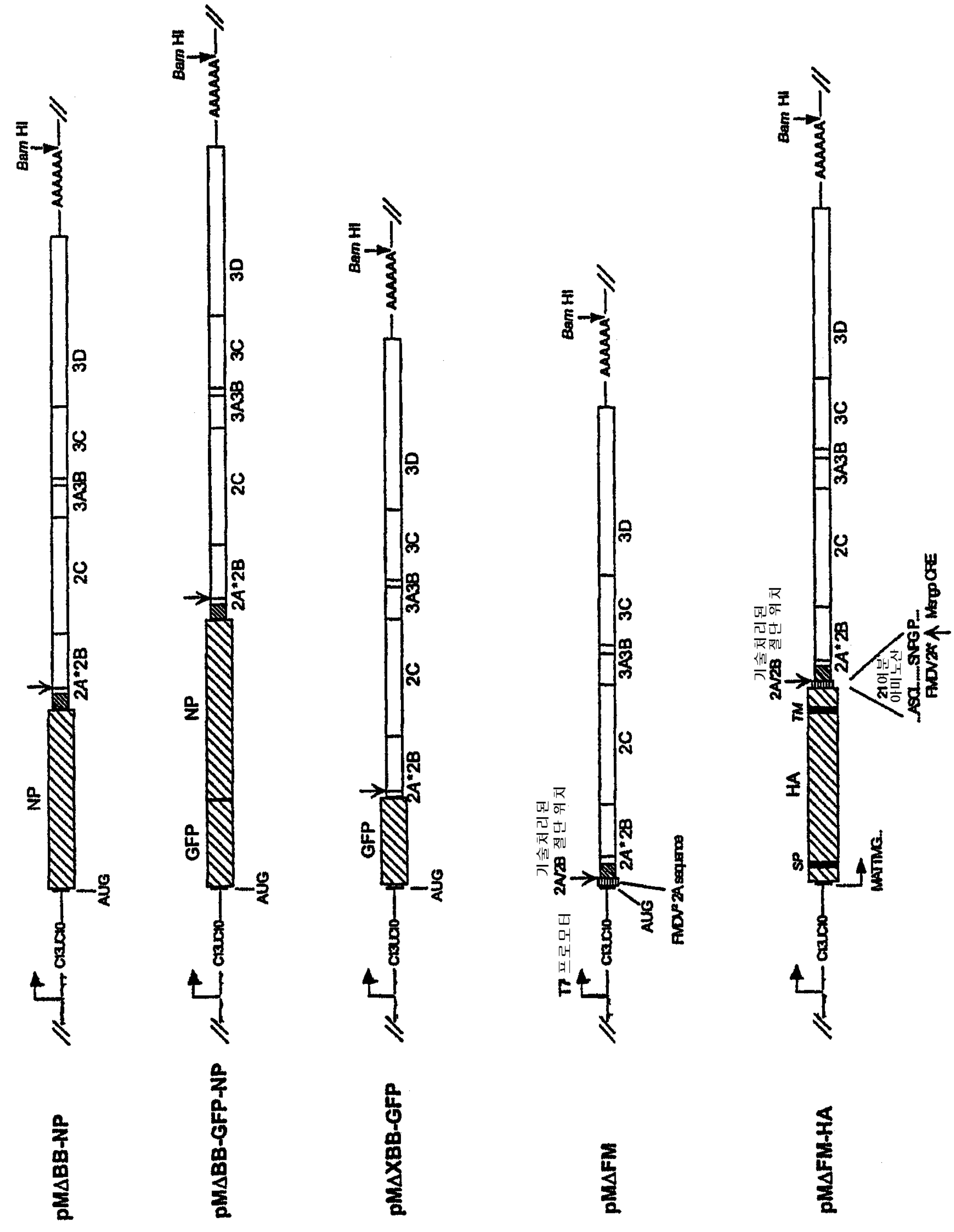
청구항 53.
제36항 또는 제41항에 있어서, 상기 이종단백질의 에피토프가 림프구 맥락수막염 바이러스 핵단백질의 NP118-126 에피토프인 DAN 분자.

도면

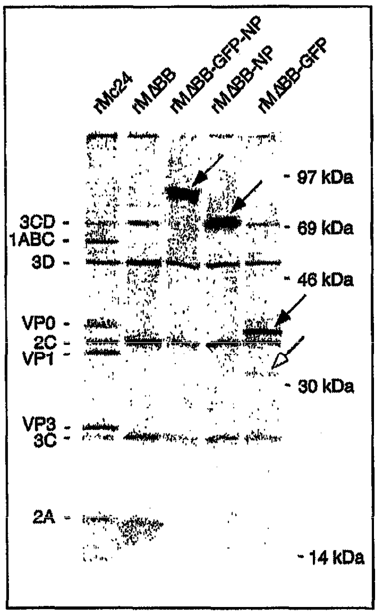
도면1a


pMC24
pMΔBB
pMΔXBB
pMΔBB-GFP
T7 프로모터
Bam HI
AAAAAA
L VP4
VP2
VP3
VP1
2A
2B
2C
3A3B
3C
3D
AUG
자가촉매
2A/2B 절단 위치
L-P1-2A
구조 단백질
비구조 단백질
CRE
1137 1267
Sac I
Xho I
2A*2B
GFP
68 아미노산
2A*
MASTMEL
TNFGP

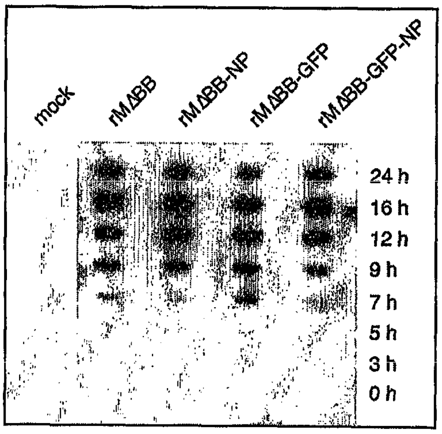
도면1b


pMΔBB-NP
pMΔBB-GFP-NP
pMΔXBB-GFP
pMΔFM
pMΔFM-HA
Bam HI
AAAAAA
NP
GFP
HA
SP
TM
AUG
2A*2B
2C
3A3B
3C
3D
T7 프로모터
기술처리된 2A/2B 절단 위치
21아미노산
FMDV 2A sequence

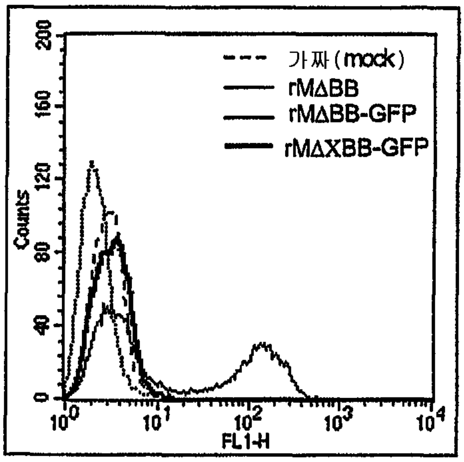
도면2


rMc24
rMΔBB
rMΔBB-GFP-NP
rMΔBB-NP
rMΔBB-GFP
97 kDa
69 kDa
46 kDa
30 kDa
14 kDa
3CD
1ABC
3D
VP0
2C
VP1
VP3
3C
2A

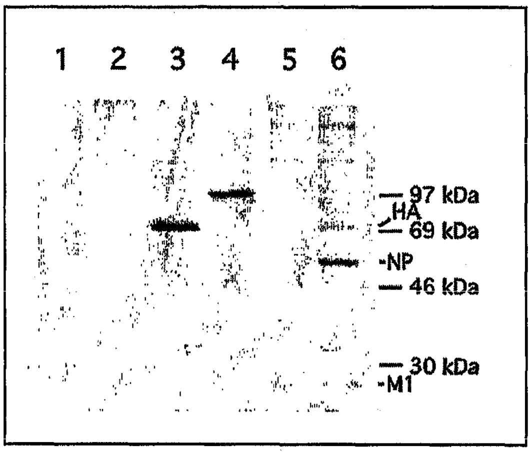
도면3


mock
rMΔBB
rMΔBB-NP
rMΔBB-GFP
rMΔBB-GFP-NP
24 h
16 h
12 h
9 h
7 h
5 h
3 h
0 h

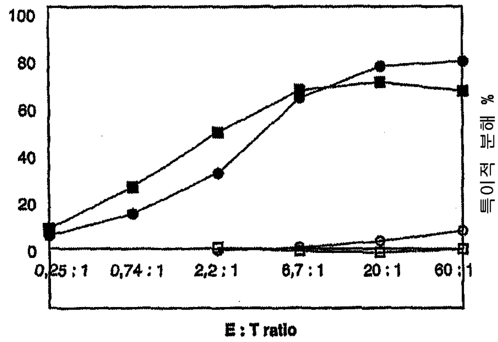
도면4


가짜(mock)
rMΔBB
rMΔBB-GFP
rMΔXBB-GFP
Counts
FL1-H

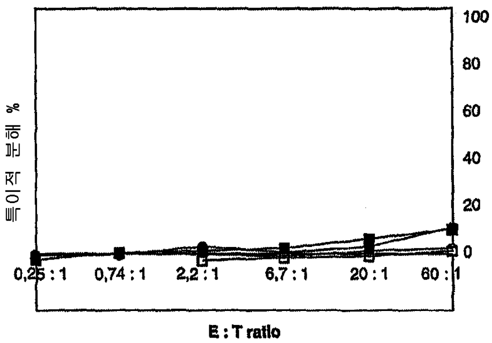
도면5



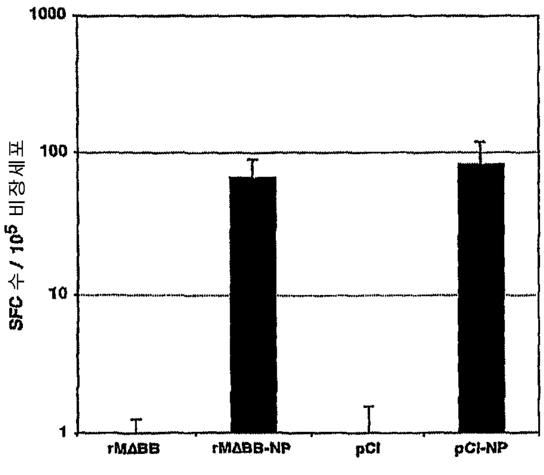
도면6a



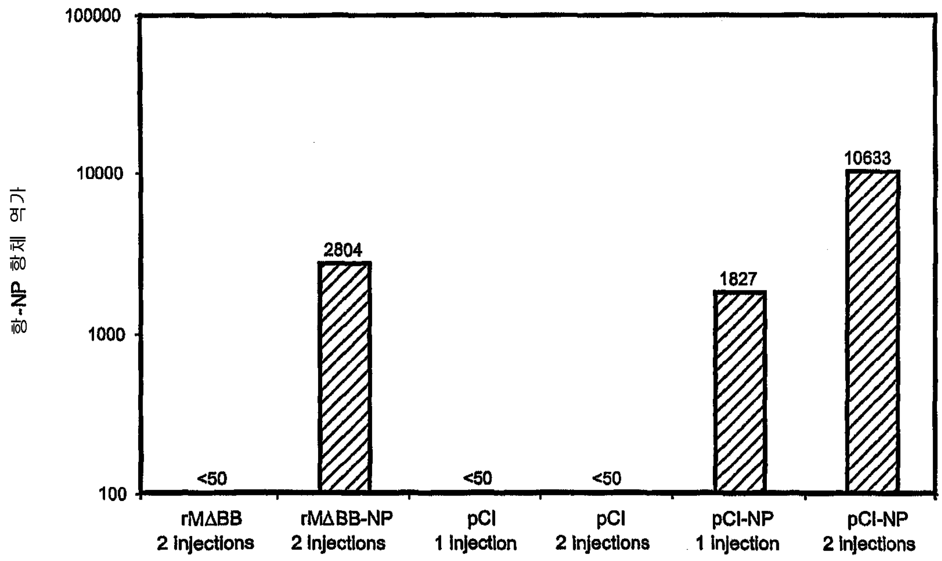
도면6b



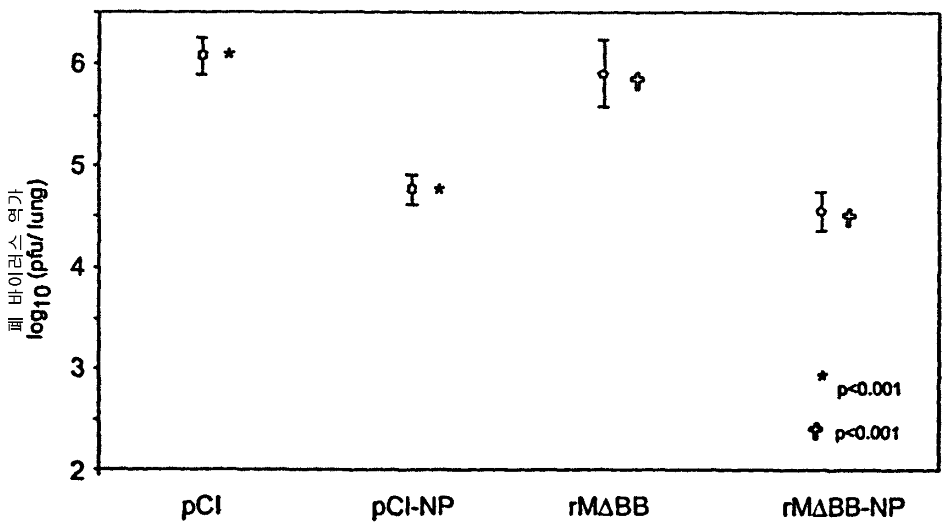
도면6c



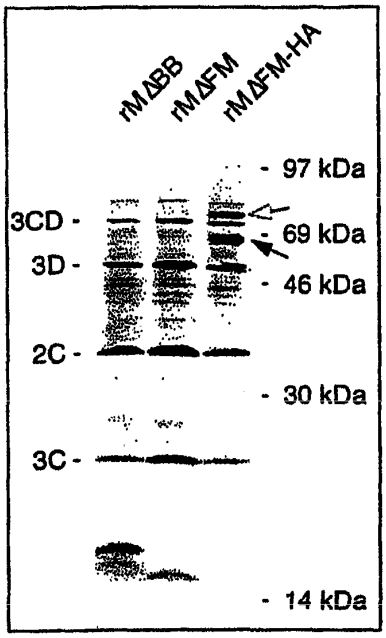
도면7


100000
10000
1000
100
항-NP 항체 역가
<50
2804
<50
<50
1827
10633
rMΔBB
2 injections
rMΔBB-NP
2 injections
pCI
1 injection
pCI
2 injections
pCI-NP
1 injection
pCI-NP
2 injections

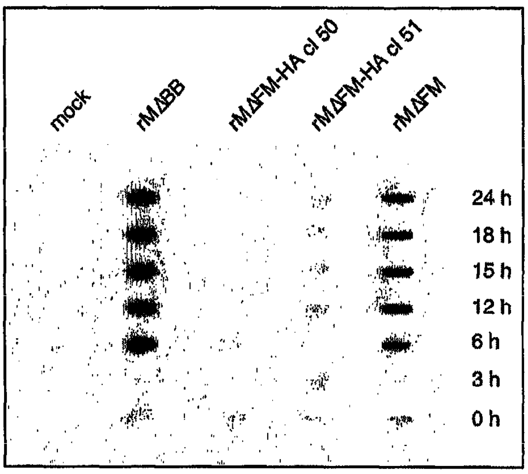
도면8


6
5
4
3
2
폐 바이러스 역가
log10 (pfu/ lung)
* p<0.001
✝ p<0.001
pCI
pCI-NP
rMΔBB
rMΔBB-NP

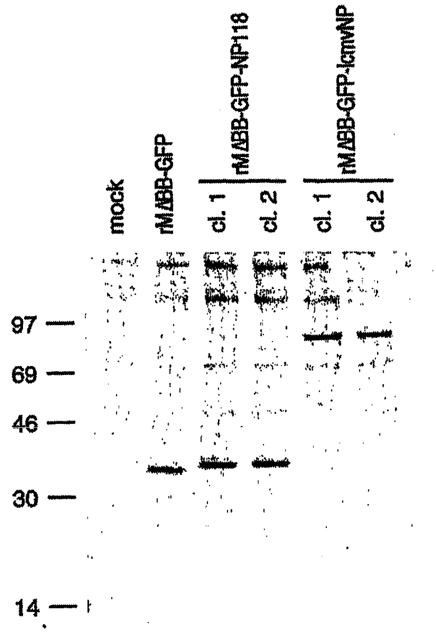
도면9a


rMΔBB
rMΔFM
rMΔFM-HA
3CD -
3D -
2C -
3C -
- 97 kDa
- 69 kDa
- 46 kDa
- 30 kDa
- 14 kDa

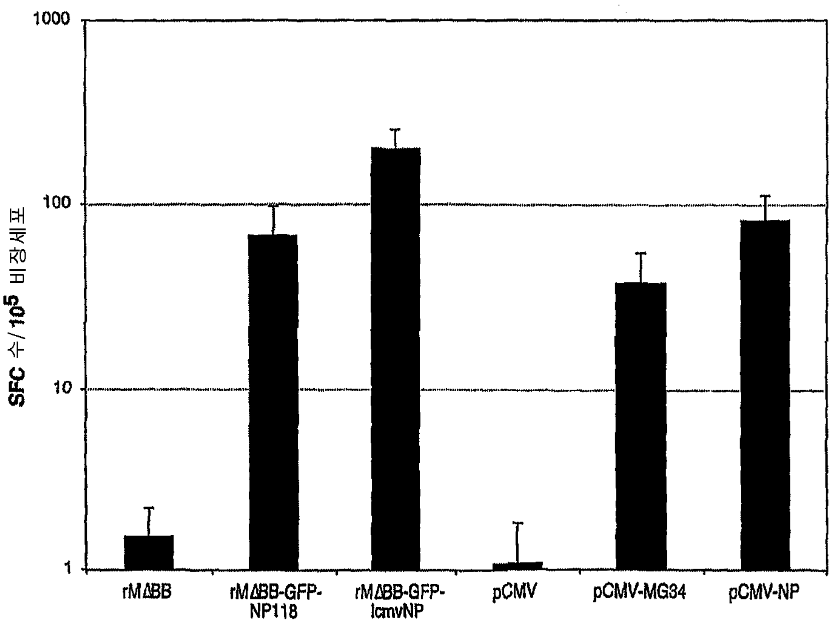
도면9b


mock
rMΔBB
rMΔFM-HA cl 50
rMΔFM-HA cl 51
rMΔFM
24 h
18 h
15 h
12 h
6 h
3 h
0 h

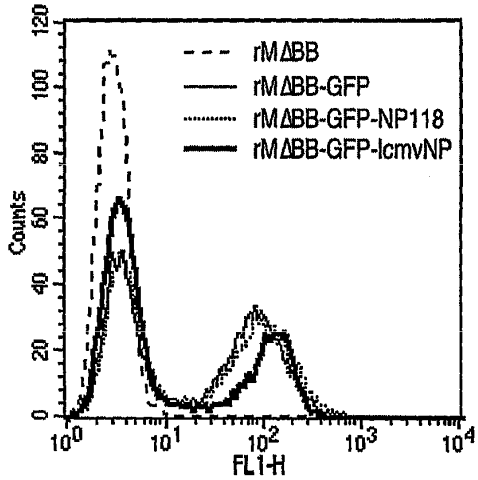
도면10


mock
rMΔBB-GFP
rMΔBB-GFP-NP118
cl. 1
cl. 2
rMΔBB-GFP-lcmvNP
cl. 1
cl. 2
97
69
46
30
14

도면11


1000
100
10
1
SFC 수/10^5 비장세포
rMΔBB
rMΔBB-GFP-NP118
rMΔBB-GFP-lcmvNP
pCMV
pCMV-MG34
pCMV-NP

도면12



SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT PASTEUR

<120> Replicons derived from positive strand RNA virus genomes useful for the production of heterologous proteins

<130> IP2003378FR

<150> US provisional No.60/292,515

<151> 2001-05-23

<160> 28

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 1

gagctcgag 9

<210> 2

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

tcgaggctag ctt 13

<210> 3

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

cgaagctagc c 11

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

gctgagctca tggtgagcaa gggcgaggag c 31

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

gcagagctcc ttgtacagct cgtccatgcc g 31

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

tctccacagg tgtccactcc 20

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

cacatcctgg ggtccattcc ggtgcgaac 29

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

accggaatgg accccaggat gtgctctctg 30

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

gtcccatcga gtgcggctac 20

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

cggaattctc gagatggcgt ctcaaggcac caaacg 36

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

gcgaattctc gagattgtcg tactcctctg cattgtc 37

<210> 12

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

cggaattctc gagatgtcct tgtctaagga agttaag 37

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

gcgaattctc gagtgtcaca acatttgggc ctc 33

<210> 14

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

tcgaagctag cgaaagaccc caagcttcag gtgtgtatat gggtaatttg acac 54

<210> 15

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:plasmid

<400> 15

tcgagtgtca aattacccat atacacacct gaagcttggg gtctttcgct agct 54

<210> 16

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

tcgaggctag ccagctttga attttgacct tcttaagctt gcgggagacg tcgagtccaa 60

ccctgggccc t 71

<210> 17

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17

tcgaagggcc cagggttgga ctcgacgtct cccgcaagct taagaaggtc aaaattcaac 60

agctggctag cc 72

<210> 18

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18

cgagcatg 8

<210> 19

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

ctagcatgct cgagct 16

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

ctggatccaa aatgaaggca aacct 25

<210> 21

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 21

caggatccta gatgcatatt ctgcactg 28

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 22

gaaaggcaaa cctactggtc ctgtt 25

<210> 23

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 23

cgtgcagtcg acaggatgca tattctgcac tgcaaag 37

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 24

Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 25

Arg Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr Met

1 5

<210> 26

<211> 8017

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:plasmid

<400> 26

tttgaaagcc gggggtggga gatccggatt gccggtccgc tcgatatcgc gggccgggtc 60

cgtgactacc cactccccct ttcaacgtga aggctacgat agtgccaggg cgggtcctgc 120

cgaaagtgcc aacccaaaac cacataaccc cccccccccc tccccccccc ctcacattac 180

tggccgaagc cgcttggaat aaggccggtg tgcgtctgtc tatatgttac ttctactaca 240

ttgtcgtctg tgacgatgta ggggcccgga acctggtcct gtcttcttga cgagtattcc 300

taggggtctt tcccctctcg acaaaggaat acaaggtctg ttgaatgtcg tgaaggaagc 360

agttcctctg gacgcttctt gaagacaagc aacgtctgta gcgacccttt gcaggcagcg 420

gaatcccccca cctggtgaca ggtgcctctg cggccgaaag ccacgtgtgt aagacacacc 480
tgcaaaggcg gcacaacccc agtgccacgt tgtgcgttgg atagttgtgg aaagagtcaa 540
atggctctcc tcaagcgtat tcaacaaggg gctgaaggat gcccagaagg taccccactg 600
gctgggatct gatctggggc ctcggtgcgc gtgctttaca cgcgttgagt cgaggttaaa 660
aaacgtctag gcccccgaa ccacggggac gtggttttcc tttgaaaacc acgacaataa 720
tatggctaca accatggagc tcgagaatac agaggagatg gagaatttat cagaccgagt 780
gtctcaagac actgccggca acacggtcac aaacacccaa tcaaccgttg gtcgtcttgt 840
cggatacgga acagttcatg atggggaaca tccattcgaa acacattatg caggatactt 900
ttcagatctt ttgatccacg atgtcgagac caatcccggg cctttcacgt ttaaaccaag 960
acaacggccg gtttttcaga ctcaaggagc ggcagtgtca tcaatggctc aaaccctact 1020
gccgaacgac ttggccagca aagctatggg atcagccttt acggctttgc tcgatgccaa 1080
cgaggacgcc caaaaagcaa tgaagattat aaagacgtta agttctctat cggatgcatg 1140
ggaaaatgta aaaggaacat tgaacaaccc ggagttctgg aaacaactct taagcagatg 1200
tgtgcaactg attgccggga tgacgatagc agtgatgcat ccggacccct tgacgctgct 1260
ttgcttggga gtcttgacag cagcagagat cacaagccag acaagcctgt gcgaagaaat 1320
agcagctaaa ttcaaaacaa tcttcactac tcccccccct cgttttcctg tgatctcact 1380
tttccaacag cagtcccccc ttaaacaggt caatgatgtt ttctctctgg caaagaacct 1440
agactgggca gtgaagacag ttgaaaaagt ggttgattgg tttggaactt gggttgcaca 1500
agaagagaga gagcagaccc tggatcagct gctccagcga ttccccgagc acgcgaagag 1560
gatttcagac cttcgtaatg gaatggctgc ctatgttgaa tgcaaggaga gcttcgattt 1620
ctttgagaaa ctttacaatc aagcagttaa ggagaagaga actggaattg ctgccgtttg 1680
tgaaaagttc agacaaaaac atgaccatgc cacggcacga tgtgaaccag ttgtgatcgt 1740
gttgcgcggt gatgctggtc agggaaagtc attgtcaagt caaatcattg cccaggctgt 1800
ttctaaaact atttttgggc gccagtcagt ctattctctt cctcctgatt cagatttctt 1860
tgatggctat gagaaccagt ttgccgcaat aatggatgat ttgggacaaa atcccgatgg 1920
ttcagatttt accaccttct gccagatggt gtccacgaca aacttactcc caaacatggc 1980
tagtctggag agaaaaggaa ccccccttcac atctcagctc gtagtggcta cgacaaatct 2040
cccggagttt agacctgtta caattgccca ttatcctgct gttgagcgcc gcattacttt 2100
cgactactcg gtgtctgcag gtccagtttg ttcaaagacc gaagctggtt gcaaagtgtt 2160
ggatgttgaa agagccttta ggccaacagg tgatgcccct cttccatgtt tccaaaataa 2220
ttgcctattc ttggaaaagg ctggcctgca gttcagagat aataggtcca aggagatttt 2280
atctttggtt gatgtgatcg agagagctgt gactagaata gagaggaaga agaaagtcct 2340
cacagcggtg cagacccttg tggcccaagg gcctgttgat gaagttagct tttactcggt 2400
tgtccagcag ctcaaggcta gacaggaagc tacagatgag cagttggagg aactccagga 2460

agcctttgcc cgggttcagg agcggagttc agtgttctca gactggatga agatttccgc 2520
catgctttgt gccgccaccc tagctctcac acaagtggtg aagatggcta aggctgtcaa 2580
acagatggtg agaccagact tggtgcgggt ccagctggat gagcaagaac agggtcctta 2640
taacgaaacc acccgtataa agcccaaaac tcttcaattg ctagatgtcc agggtccaaa 2700
tccgactatg gactttgaaa agtttgttgc taagtttgtt acagccccca ttggttttgt 2760
gtaccccaca ggtgttagca ctcagacatg cctacttgtg aagggacgta ccctggcggt 2820
gaatcggcac atggcagagt ctgactggac ctccattgta gtgcgtggtg ttagccacac 2880
ccgctcctca gtgaaaatta tcgccatagc caaagctggg aaggagactg atgtgtcgtt 2940
cattcgcctt tcatctggtc ccttgtttag agataatact agcaagtttg tgaaggccag 3000
tgacgtattg ccccatagct cttccccct tattgggatc atgaatgtgg acattccaat 3060
gatgtataca gggacatttc tgaaggctgg cgtctcggtg ccggttgaga cagggcagac 3120
tttcaaccac tgcatccact acaaagcaaa tacacggaaa ggctggtgtg ggtctgcaat 3180
cctggccgat cttggtggga gcaagaagat tctgggcttc cattcagccg gctccatggg 3240
cgttgcagcc gcgtcgataa tttcacaaga aatgatcgat gcggtggtgc aggccttcga 3300
gccccagggt gcacttgagc ggctgccaga tggtccgcgc atccatgtac cccgaaagac 3360
tgctttgcgc ccgactgttg ccagacaggt cttccaaccc gcttttgccc cagctgttct 3420
ttctaaattt gacccacgca cggatgctga tgttgacgaa gtagcttttt caaaacatac 3480
atccaatcag gaaaccctcc ccccagtgtt tagaatggtt gctagggaat atgcgaacag 3540
agtattcgca ctgttgggca gagacaatgg aaggctgtca gtcaagcaag ccttggatgg 3600
acttgagggg atggacccta tggacaagaa cacttcccca ggccttccat atactacgct 3660
aggaatgcgt agaacagatg ttgtagattg ggaaaccgcc actcttatcc cctttgcagc 3720
agagagacta gaaaaaatga ataacaaaga cttttccgac attgtctatc agacattcct 3780
caaggacgag cttagaccta tagagaaggt acaagccgcc aagacacgga ttgtggatgt 3840
tccaccattt gagcactgca ttctgggtag acaactgctc gggaagttcg cttccaaatt 3900
ccagacccaa ccgggtctgg aattgggctc tgcaattggg tgtgacccag acgtgcattg 3960
gacagccttt ggtgtggcaa tgcaaggctt tgaaagggtg tatgatgtgg attattccaa 4020
ttttgattct acccattcag tagctatatt taggttattg gcagaggaat tcttttctga 4080
agagaatggc ttcgacccat tggttaagga ttatcttgag tccttagcca tttcaaaaca 4140
tgcgtatgag gaaaagcgct atctcataac cggtggtctt ccgtctggtt gtgcagcgac 4200
ctcaatgtta aatacaataa tgaataatat tattattagg gccggtttgt atcttacata 4260
taaaaatttt gagtttgatg acgtgaaggt cttgtcttat ggtgatgatc ttctagtggc 4320
aactaattac caattgaact ttgatagagt gagaacaagc ctggcaaaga caggatataa 4380
gattacaccc gctaacaaaa cttctacctt tcccctggaa tcaactcttg aggatgtagt 4440
attcctgaag agaaaattta agaaagaggg ccctctatat cgacctgtca tgaatagaga 4500

ggcgttagaa gcaatgttgt catattatcg tccagggact ctatctgaga aactcacttc 4560

aatcactatg cttgccgtgc attctggcaa acaggagtac gatcgactct ttgccccgtt 4620

tcgcgaggtt ggagtgatcg taccaacttt tgagagtgtg gagtacagat ggaggagcct 4680

gttctggtaa tagcgcggtc actggcacaa cgcgttaccc ggtaagccaa ccgggtgtac 4740

acggtcgtca taccgcagac agggttcttc tactttgcaa gataaactag agtagtaaaa 4800

taaatagttt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaacgggat cctctagagt cgacctgcag 4860

gcatgcaagc ttttgttccc tttagtgagg gttaattccg agcttggcgt aatcatggtc 4920

atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg 4980

aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt 5040

gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg 5100

ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga 5160

ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat 5220

acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca 5280

aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc 5340

tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata 5400

aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc 5460

gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc 5520

acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga 5580

accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc 5640

ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 5700

gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag 5760

gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag 5820

ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca 5880

gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga 5940

cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 6000

cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga 6060

gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 6120

tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga 6180

gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgct caccggctcc 6240

agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac 6300

tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc 6360

agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc 6420

gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 6480

catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt 6540 ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 6600

atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 6660

tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag 6720

cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 6780

cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc 6840

atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa 6900

aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 6960

ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 7020

aaataaacaa ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga 7080

aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct 7140

cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac 7200

agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt 7260

tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca 7320

ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggaaatt 7380

gtaaacgtta atattttgtt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag ctcatttttt 7440

aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg 7500

ttgagtgttg ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga ctccaacgtc 7560

aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc accctaatca 7620

agttttttgg ggtcgaggtg ccgtaaagca ctaaatcgga accctaaagg gagcccccga 7680

tttagagctt gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaagggaa gaaagcgaaa 7740

ggagcgggcg ctagggcgct ggcaagtgta gcggtcacgc tgcgcgtaac caccacaccc 7800

gccgcgctta atgcgccgct acagggcgcg tcgcgccatt cgccattcag gctgcgcaac 7860

tgttgggaag ggcgatcggt gcgggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga 7920

tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa 7980

acgacggcca gtgaattgta atacgactca ctatagg 8017

<210> 27

<211> 8092

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:plasmid

<400> 27

tttgaaagcc gggggtggga gatccggatt gccggtccgc tcgatatcgc gggccgggtc 60

cgtgactacc cactccccct ttcaacgtga aggctacgat agtgccaggg cgggtcctgc 120

cgaaagtgcc aacccaaaac cacataaccc cccccccccc tccccccccc ctcacattac 180
tggccgaagc cgcttggaat aaggccggtg tgcgtctgtc tatatgttac ttctactaca 240
ttgtcgtctg tgacgatgta ggggcccgga acctggtcct gtcttcttga cgagtattcc 300
taggggtctt tcccctctcg acaaaggaat acaaggtctg ttgaatgtcg tgaaggaagc 360
agttcctctg gacgcttctt gaagacaagc aacgtctgta gcgacccttt gcaggcagcg 420
gaatcccccca cctggtgaca ggtgcctctg cggccgaaag ccacgtgtgt aagacacacc 480
tgcaaaggcg gcacaacccc agtgccacgt tgtgcgttgg atagttgtgg aaagagtcaa 540
atggctctcc tcaagcgtat tcaacaaggg gctgaaggat gcccagaagg taccccactg 600
gctgggatct gatctggggc ctcggtgcgc gtgctttaca cgcgttgagt cgaggttaaa 660
aaacgtctag gcccccgaa ccacggggac gtggttttcc tttgaaaacc acgacaataa 720
tatggctaca accatggagc tcgagcatgc tagccagctg ttgaattttg accttcttaa 780
gcttgcggga gacgtcgagt ccaaccctgg gcccttcgag aatacagagg agatggagaa 840
tttatcagac cgagtgtctc aagacactgc cggcaacacg gtcacaaaca cccaatcaac 900
cgttggtcgt cttgtcggat acggaacagt tcatgatggg gaacatccat tcgaaacaca 960
ttatgcagga tacttttcag atcttttgat ccacgatgtc gagaccaatc ccgggccttt 1020
cacgtttaaa ccaagacaac ggccggtttt tcagactcaa ggagcggcag tgtcatcaat 1080
ggctcaaacc ctactgccga acgacttggc cagcaaagct atgggatcag cctttacggc 1140
tttgctcgat gccaacgagg acgcccaaaa agcaatgaag attataaaga cgttaagttc 1200
tctatcggat gcatgggaaa atgtaaaagg aacattgaac aacccggagt tctggaaaca 1260
actcttaagc agatgtgtgc aactgattgc cgggatgacg atagcagtga tgcatccgga 1320
ccccttgacg ctgctttgct tgggagtctt gacagcagca gagatcacaa gccagacaag 1380
cctgtgcgaa gaaatagcag ctaaattcaa aacaatcttc actactcccc cccctcgttt 1440
tcctgtgatc tcacttttcc aacagcagtc ccccttaaa caggtcaatg atgttttctc 1500
tctggcaaag aacctagact gggcagtgaa gacagttgaa aaagtggttg attggtttgg 1560
aacttgggtt gcacaagaag agagagagca gaccctggat cagctgctcc agcgattccc 1620
cgagcacgcg aagaggattt cagaccttcg taatggaatg gctgcctatg ttgaatgcaa 1680
ggagagcttc gatttctttg agaaacttta caatcaagca gttaaggaga agagaactgg 1740
aattgctgcc gtttgtgaaa agttcagaca aaaacatgac catgccacgg cacgatgtga 1800
accagttgtg atcgtgttgc gcggtgatgc tggtcaggga aagtcattgt caagtcaaat 1860
cattgcccag gctgtttcta aaactatttt tgggcgccag tcagtctatt ctcttcctcc 1920
tgattcagat ttctttgatg gctatgagaa ccagtttgcc gcaataatgg atgatttggg 1980
acaaaatccc gatggttcag attttaccac cttctgccag atggtgtcca cgacaaactt 2040
actcccaaac atggctagtc tggagagaaa aggaaccccc ttcacatctc agctcgtagt 2100
ggctacgaca aatctcccgg agtttagacc tgttacaatt gcccattatc ctgctgttga 2160

gcgccgcatt actttcgact actcggtgtc tgcaggtcca gtttgttcaa agaccgaagc 2220
tggttgcaaa gtgttggatg ttgaaagagc ctttaggcca acaggtgatg cccctcttcc 2280
atgtttccaa aataattgcc tattcttgga aaaggctggc ctgcagttca gagataatag 2340
gtccaaggag attttatctt tggttgatgt gatcgagaga gctgtgacta gaatagagag 2400
gaagaagaaa gtcctcacag cggtgcagac ccttgtggcc caagggcctg ttgatgaagt 2460
tagcttttac tcggttgtcc agcagctcaa ggctagacag gaagctacag atgagcagtt 2520
ggaggaactc caggaagcct ttgcccgggt tcaggagcgg agttcagtgt tctcagactg 2580
gatgaagatt tccgccatgc tttgtgccgc caccctagct ctcacacaag tggtgaagat 2640
ggctaaggct gtcaaacaga tggtgagacc agacttggtg cgggtccagc tggatgagca 2700
agaacagggt ccttataacg aaaccacccg tataaagccc aaaactcttc aattgctaga 2760
tgtccagggt ccaaatccga ctatggactt tgaaaagttt gttgctaagt ttgttacagc 2820
ccccattggt tttgtgtacc ccacaggtgt tagcactcag acatgcctac ttgtgaaggg 2880
acgtaccctg gcggtgaatc ggcacatggc agagtctgac tggacctcca ttgtagtgcg 2940
tggtgttagc cacacccgct cctcagtgaa aattatcgcc atagccaaag ctgggaagga 3000
gactgatgtg tcgttcattc gcctttcatc tggtcccttg tttagagata atactagcaa 3060
gtttgtgaag gccagtgacg tattgcccca tagctcttcc ccccttattg ggatcatgaa 3120
tgtggacatt ccaatgatgt atacagggac atttctgaag gctggcgtct cggtgccggt 3180
tgagacaggg cagactttca accactgcat ccactacaaa gcaaatacac ggaaaggctg 3240
gtgtgggtct gcaatcctgg ccgatcttgg tgggagcaag aagattctgg gcttccattc 3300
agccggctcc atgggcgttg cagccgcgtc gataatttca caagaaatga tcgatgcggt 3360
ggtgcaggcc ttcgagcccc agggtgcact tgagcggctg ccagatggtc cgcgcatcca 3420
tgtaccccga aagactgctt tgcgcccgac tgttgccaga caggtcttcc aacccgcttt 3480
tgccccagct gttctttcta aatttgaccc acgcacggat gctgatgttg acgaagtagc 3540
tttttcaaaa catacatcca atcaggaaac cctcccccca gtgtttagaa tggttgctag 3600
ggaatatgcg aacagagtat tcgcactgtt gggcagagac aatggaaggc tgtcagtcaa 3660
gcaagccttg gatggacttg aggggatgga ccctatggac aagaacactt ccccaggcct 3720
tccatatact acgctaggaa tgcgtagaac agatgttgta gattgggaaa ccgccactct 3780
tatccccttt gcagcagaga gactagaaaa aatgaataac aaagactttt ccgacattgt 3840
ctatcagaca ttcctcaagg acgagcttag acctatagag aaggtacaag ccgccaagac 3900
acggattgtg gatgttccac catttgagca ctgcattctg ggtagacaac tgctcgggaa 3960
gttcgcttcc aaattccaga cccaaccggg tctggaattg ggctctgcaa ttgggtgtga 4020
cccagacgtg cattggacag cctttggtgt ggcaatgcaa ggctttgaaa gggtgtatga 4080
tgtggattat tccaattttg attctaccca ttcagtagct atatttaggt tattggcaga 4140
ggaattcttt tctgaagaga atggcttcga cccattggtt aaggattatc ttgagtcctt 4200

agccatttca aaacatgcgt atgaggaaaa gcgctatctc ataaccggtg gtcttccgtc 4260

tggttgtgca gcgacctcaa tgttaaatac aataatgaat aatattatta ttagggccgg 4320

tttgtatctt acatataaaa attttgagtt tgatgacgtg aaggtcttgt cttatggtga 4380

tgatcttcta gtggcaacta attaccaatt gaactttgat agagtgagaa caagcctggc 4440

aaagacagga tataagatta cacccgctaa caaaacttct acctttcccc tggaatcaac 4500

tcttgaggat gtagtattcc tgaagagaaa atttaagaaa gagggccctc tatatcgacc 4560

tgtcatgaat agagaggcgt tagaagcaat gttgtcatat tatcgtccag ggactctatc 4620

tgagaaactc acttcaatca ctatgcttgc cgtgcattct ggcaaacagg agtacgatcg 4680

actctttgcc ccgtttcgcg aggttggagt gatcgtacca acttttgaga gtgtggagta 4740

cagatggagg agcctgttct ggtaatagcg cggtcactgg cacaacgcgt tacccggtaa 4800

gccaaccggg tgtacacggt cgtcataccg cagacagggt tcttctactt tgcaagataa 4860

actagagtag taaaataaat agttttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaac gggatcctct 4920

agagtcgacc tgcaggcatg caagcttttg ttccctttag tgagggttaa ttccgagctt 4980

ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 5040

caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag tgagctaact 5100

cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 5160

gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc 5220

ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 5280

ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 5340

agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 5400

taggctccgc ccccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 5460

cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 5520

tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 5580

gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct 5640

gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 5700

tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 5760

gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggt ggcctaacta 5820

cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 5880

aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt 5940

tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 6000

ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggtcatgag 6060

attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat 6120

ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 6180

tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat 6240 aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc 6300

acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 6360

aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag 6420

agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt 6480

ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 6540

agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 6600

tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc 6660

tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 6720

attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa 6780

taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg 6840

aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca ctcgtgcacc 6900

caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag 6960

gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 7020

cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 7080

tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc 7140

acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac 7200

gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct 7260

cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg 7320

cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat 7380

tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata 7440

ccgcatcagg aaattgtaaa cgttaatatt ttgttaaaat tcgcgttaaa tttttgttaa 7500

atcagctcat tttttaacca ataggccgaa atcggcaaaa tcccttataa atcaaaagaa 7560

tagaccgaga tagggttgag tgttgttcca gtttggaaca agagtccact attaaagaac 7620

gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa 7680

ccatcaccct aatcaagttt tttggggtcg aggtgccgta aagcactaaa tcggaaccct 7740

aaagggagcc cccgatttag agcttgacgg ggaaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa 7800

gggaagaaag cgaaaggagc gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggt cacgctgcgc 7860

gtaaccacca cacccgccgc gcttaatgcg ccgctacagg gcgcgtcgcg ccattcgcca 7920

ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag 7980

ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttcccag 8040

tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtgaa ttgtaatacg actcactata gg 8092

<210> 28

<211> 10417

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:plasmid

<400> 28

tttgaaagcc gggggtggga gatccggatt gccggtccgc tcgatatcgc gggccgggtc 60

cgtgactacc cactccccct ttcaacgtga aggctacgat agtgccaggg cgggtcctgc 120

cgaaagtgcc aacccaaaac cacataaccc cccccccccc tccccccccc ctcacattac 180

tggccgaagc cgcttggaat aaggccggtg tgcgtctgtc tatatgttac ttctactaca 240

ttgtcgtctg tgacgatgta ggggcccgga acctggtcct gtcttcttga cgagtattcc 300

taggggtctt tcccctctcg acaaaggaat acaaggtctg ttgaatgtcg tgaaggaagc 360

agttcctctg gacgcttctt gaagacaagc aacgtctgta gcgacccttt gcaggcagcg 420

gaatccccca cctggtgaca ggtgcctctg cggccgaaag ccacgtgtgt aagacacacc 480

tgcaaaggcg gcacaacccc agtgccacgt tgtgcgttgg atagttgtgg aaagagtcaa 540

atggctctcc tcaagcgtat tcaacaaggg gctgaaggat gcccagaagg taccccactg 600

gctgggatct gatctggggc ctcggtgcgc gtgctttaca cgcgttgagt cgaggttaaa 660

aaacgtctag gccccccgaa ccacggggac gtggttttcc tttgaaaacc acgacaataa 720

tatggctaca accatggagc tcatggtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt 780

gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga 840

gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcatctgca ccaccggcaa 900

gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccctgacc tacggcgtgc agtgcttcag 960

ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta 1020

cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagaccc gcgccgaggt 1080

gaagttcgag ggcgacaccc tggtgaaccg catcgagctg aagggcatcg acttcaagga 1140

ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat 1200

catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga 1260

ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc 1320

cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag cacccagtcc gccctgagca aagaccccaa 1380

cgagaagcgc gatcacatgg tcctgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcactctcgg 1440

catggacgag ctgtacaagg agctcgagat gtccttgtct aaggaagtta agagcttcca 1500

atggacgcaa gcattgagaa gagaattgca gagcttcaca tcagatgtga aggctgctgt 1560

cattaaggat gcaaccaacc ttctgaatgg gttggacttc tctgaggtca gcaatgttca 1620

gaggatcatg aggaaggaaa agagagatga caaagaccta cagagactca gaagtctcaa 1680

ccagactgta cattctcttg tggatttaaa gtcaacatca aagaagaatg ttttgaaagt 1740

ggggaggctc agtgcagaag aactgatgtc tcttgcggct gaccttgaga agctgaaggc 1800

caagatcatg aggtctgaaa ggccccaggc ttcaggggta tatatgggga acttaacaac 1860
acagcaacta gaccaaagat ctcagatcct acagatagtt gggatgagaa agcctcagca 1920
gggtgcaagt ggtgtggtaa gagtttggga tgtgaaagac tcatcacttt tgaacaatca 1980
atttggcaca atgccaagtc taactatggc ttgtatggcc aaacagtcac agactccgct 2040
caatgacgtt gtacaagcgc tcacagacct tggcttgctt tacacagtca agtatccaaa 2100
tcttaatgat cttgaaaggc tgaaagacaa gcacccagtt ctgggggtca tcactgaaca 2160
gcagtccagc atcaacattt ctggctataa ctttagtctt ggtgctgccg tgaaggcagg 2220
ggcagccctg ttggatgggg gtaacatgtt agagtcaatt ttgatcaagc caagcaacag 2280
cgaggacctc ttgaaggcag ttctcggggc caagagaaaa ctcaacatgt ttgtttcaga 2340
ccaagttggg gacaggaacc cttatgaaaa catcctctat aaagtttgcc tttcaggtga 2400
aggatggcca tacatagctt gtagaacatc gattgtgggg agagcatggg aaaacacaac 2460
aattgatctc acaagcgaga aacctgcagt caactcaccc aggccagcgc ctggagcagc 2520
aggtccacct caggtgggct taagctacag ccagacaatg cttttaaaag acctcatggg 2580
aggaattgac cccaacgctc ctacatggat tgacattgag ggtagattta atgatccagt 2640
ggaaatagca attttccaac cacagaacgg gcagttcata cacttttaca gggaacccgt 2700
tgatcaaaaa caattcaagc aagattccaa gtactcacac ggcatggatc ttgccgacct 2760
cttcaatgcg caacccgggt tgacctcgtc agttataggt gctcttccgc aggggatggt 2820
tctaagctgt caaggctccg atgacatcag aaagcttctg gactcacaaa ataggaagga 2880
cattaagctt atcgatgttg aaatgaccag ggaagcttcg agggagtatg aagacaaagt 2940
gtgggacaaa tatggctggt tgtgtaagat gcatactgga atagtaaggg acaaaaagaa 3000
gaaagagatc accccgcact gtgcactcat ggactgcatc atttttgaaa gcgcctccaa 3060
agcaaggctc ccagatctga aaactgttca caacattctg ccacatgacc taattttttag 3120
aggcccaaat gttgtgacac tcgagaatac agaggagatg gagaatttat cagaccgagt 3180
gtctcaagac actgccggca acacggtcac aaacacccaa tcaaccgttg gtcgtcttgt 3240
cggatacgga acagttcatg atggggaaca tccattcgaa acacattatg caggatactt 3300
ttcagatctt ttgatccacg atgtcgagac caatcccggg cctttcacgt ttaaaccaag 3360
acaacggccg gtttttcaga ctcaaggagc ggcagtgtca tcaatggctc aaaccctact 3420
gccgaacgac ttggccagca aagctatggg atcagccttt acggctttgc tcgatgccaa 3480
cgaggacgcc caaaaagcaa tgaagattat aaagacgtta agttctctat cggatgcatg 3540
ggaaaatgta aaaggaacat tgaacaaccc ggagttctgg aaacaactct taagcagatg 3600
tgtgcaactg attgccggga tgacgatagc agtgatgcat ccggacccct tgacgctgct 3660
ttgcttggga gtcttgacag cagcagagat cacaagccag acaagcctgt gcgaagaaat 3720
agcagctaaa ttcaaaacaa tcttcactac tcccccccct cgttttcctg tgatctcact 3780
tttccaacag cagtccccc ttaaacaggt caatgatgtt ttctctctgg caaagaacct 3840

agactgggca gtgaagacag ttgaaaaagt ggttgattgg tttggaactt gggttgcaca 3900
agaagagaga gagcagaccc tggatcagct gctccagcga ttccccgagc acgcgaagag 3960
gatttcagac cttcgtaatg gaatggctgc ctatgttgaa tgcaaggaga gcttcgattt 4020
ctttgagaaa ctttacaatc aagcagttaa ggagaagaga actggaattg ctgccgtttg 4080
tgaaaagttc agacaaaaac atgaccatgc cacggcacga tgtgaaccag ttgtgatcgt 4140
gttgcgcggt gatgctggtc agggaaagtc attgtcaagt caaatcattg cccaggctgt 4200
ttctaaaact atttttgggc gccagtcagt ctattctctt cctcctgatt cagatttctt 4260
tgatggctat gagaaccagt ttgccgcaat aatggatgat ttgggacaaa atcccgatgg 4320
ttcagatttt accaccttct gccagatggt gtccacgaca aacttactcc caaacatggc 4380
tagtctggag agaaaaggaa cccccttcac atctcagctc gtagtggcta cgacaaatct 4440
cccggagttt agacctgtta caattgccca ttatcctgct gttgagcgcc gcattacttt 4500
cgactactcg gtgtctgcag gtccagtttg ttcaaagacc gaagctggtt gcaaagtgtt 4560
ggatgttgaa agagccttta ggccaacagg tgatgcccct cttccatgtt tccaaaataa 4620
ttgcctattc ttggaaaagg ctggcctgca gttcagagat aataggtcca aggagatttt 4680
atctttggtt gatgtgatcg agagagctgt gactagaata gagaggaaga agaaagtcct 4740
cacagcggtg cagacccttg tggcccaagg gcctgttgat gaagttagct tttactcggt 4800
tgtccagcag ctcaaggcta gacaggaagc tacagatgag cagttggagg aactccagga 4860
agcctttgcc cgggttcagg agcggagttc agtgttctca gactggatga agatttccgc 4920
catgctttgt gccgccaccc tagctctcac acaagtggtg aagatggcta aggctgtcaa 4980
acagatggtg agaccagact tggtgcgggt ccagctggat gagcaagaac agggtcctta 5040
taacgaaacc acccgtataa agcccaaaac tcttcaattg ctagatgtcc agggtccaaa 5100
tccgactatg gactttgaaa agtttgttgc taagtttgtt acagccccca ttggttttgt 5160
gtaccccaca ggtgttagca ctcagacatg cctacttgtg aagggacgta ccctggcggt 5220
gaatcggcac atggcagagt ctgactggac ctccattgta gtgcgtggtg ttagccacac 5280
ccgctcctca gtgaaaatta tcgccatagc caaagctggg aaggagactg atgtgtcgtt 5340
cattcgcctt tcatctggtc ccttgtttag agataatact agcaagtttg tgaaggccag 5400
tgacgtattg ccccatagct cttcccccct tattgggatc atgaatgtgg acattccaat 5460
gatgtataca gggacatttc tgaaggctgg cgtctcggtg ccggttgaga cagggcagac 5520
tttcaaccac tgcatccact acaaagcaaa tacacggaaa ggctggtgtg ggtctgcaat 5580
cctggccgat cttggtggga gcaagaagat tctgggcttc cattcagccg gctccatggg 5640
cgttgcagcc gcgtcgataa tttcacaaga aatgatcgat gcggtggtgc aggccttcga 5700
gccccagggt gcacttgagc ggctgccaga tggtccgcgc atccatgtac cccgaaagac 5760
tgctttgcgc ccgactgttg ccagacaggt cttccaaccc gcttttgccc cagctgttct 5820
ttctaaattt gacccacgca cggatgctga tgttgacgaa gtagcttttt caaaacatac 5880

atccaatcag gaaaccctcc ccccagtgtt tagaatggtt gctagggaat atgcgaacag 5940
agtattcgca ctgttgggca gagacaatgg aaggctgtca gtcaagcaag ccttggatgg 6000
acttgagggg atggacccta tggacaagaa cacttcccca ggccttccat atactacgct 6060
aggaatgcgt agaacagatg ttgtagattg ggaaaccgcc actcttatcc cctttgcagc 6120
agagagacta gaaaaaatga ataacaaaga cttttccgac attgtctatc agacattcct 6180
caaggacgag cttagaccta tagagaaggt acaagccgcc aagacacgga ttgtggatgt 6240
tccaccattt gagcactgca ttctgggtag acaactgctc gggaagttcg cttccaaatt 6300
ccagacccaa ccgggtctgg aattgggctc tgcaattggg tgtgacccag acgtgcattg 6360
gacagccttt ggtgtggcaa tgcaaggctt tgaaagggtg tatgatgtgg attattccaa 6420
ttttgattct acccattcag tagctatatt taggttattg gcagaggaat tcttttctga 6480
agagaatggc ttcgacccat tggttaagga ttatcttgag tccttagcca tttcaaaaca 6540
tgcgtatgag gaaaagcgct atctcataac cggtggtctt ccgtctggtt gtgcagcgac 6600
ctcaatgtta aatacaataa tgaataatat tattattagg gccggtttgt atcttacata 6660
taaaaatttt gagtttgatg acgtgaaggt cttgtcttat ggtgatgatc ttctagtggc 6720
aactaattac caattgaact ttgatagagt gagaacaagc ctggcaaaga caggatataa 6780
gattacaccc gctaacaaaa cttctacctt tcccctggaa tcaactcttg aggatgtagt 6840
attcctgaag agaaaattta agaaagaggg ccctctatat cgacctgtca tgaatagaga 6900
ggcgttagaa gcaatgttgt catattatcg tccagggact ctatctgaga aactcacttc 6960
aatcactatg cttgccgtgc attctggcaa acaggagtac gatcgactct ttgccccgtt 7020
tcgcgaggtt ggagtgatcg taccaacttt tgagagtgtg gagtacagat ggaggagcct 7080
gttctggtaa tagcgcggtc actggcacaa cgcgttaccc ggtaagccaa ccgggtgtac 7140
acggtcgtca taccgcagac agggttcttc tactttgcaa gataaactag agtagtaaaa 7200
taaatagttt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaacgggat cctctagagt cgacctgcag 7260
gcatgcaagc ttttgttccc tttagtgagg gttaattccg agcttggcgt aatcatggtc 7320
atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg 7380
aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt 7440
gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg 7500
ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga 7560
ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat 7620
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca 7680
aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc 7740
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata 7800
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc 7860
gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc 7920

acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga 7980
accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc 8040
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 8100
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag 8160
gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag 8220
ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca 8280
gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga 8340
cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 8400
cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga 8460
gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 8520
tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga 8580
gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgct caccggctcc 8640
agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac 8700
tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc 8760
agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc 8820
gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 8880
catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt 8940
ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 9000
atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 9060
tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag 9120
cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 9180
cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc 9240
atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa 9300
aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 9360
ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 9420
aaataaacaa ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga 9480
aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct 9540
cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac 9600
agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt 9660
tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca 9720
ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggaaatt 9780
gtaaacgtta atattttgtt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag ctcatttttt 9840
aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg 9900
ttgagtgttg ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga ctccaacgtc 9960

aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc accctaatca 10020

agtttttttgg ggtcgaggtg ccgtaaagca ctaaatcgga accctaaagg gagcccccga 10080

tttagagctt gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaagggaa gaaagcgaaa 10140

ggagcgggcg ctagggcgct ggcaagtgta gcggtcacgc tgcgcgtaac caccacaccc 10200

gccgcgctta atgcgccgct acagggcgcg tcgcgccatt cgccattcag gctgcgcaac 10260

tgttgggaag ggcgatcggt gcgggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga 10320

tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa 10380

acgacggcca gtgaattgta atacgactca ctatagg 10417