



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0170836
(43) 공개일자 2024년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/15 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/15 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7036936
(22) 출원일자(국제) 2023년04월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월05일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2023/053433
(87) 국제공개번호 WO 2023/194913
국제공개일자 2023년10월12일
(30) 우선권주장
63/362,488 2022년04월05일 미국(US)

(71) 출원인
베링거인겔하임베트메디카게엠베하
독일 인겔하임 55218
(72) 발명자
패터슨 애비 레이
미국 조지아주 30096 델루스 세털라이트 불러바드
3239 에이에이치 페이턴츠 베링거 인겔하임 애니
멀 헬스 유에스에이 인코포레이티드
앤스트롬 데이비드 마이클
미국 조지아주 30096 델루스 세털라이트 불러바드
3239 에이에이치 페이턴츠 베링거 인겔하임 애니
멀 헬스 유에스에이 인코포레이티드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

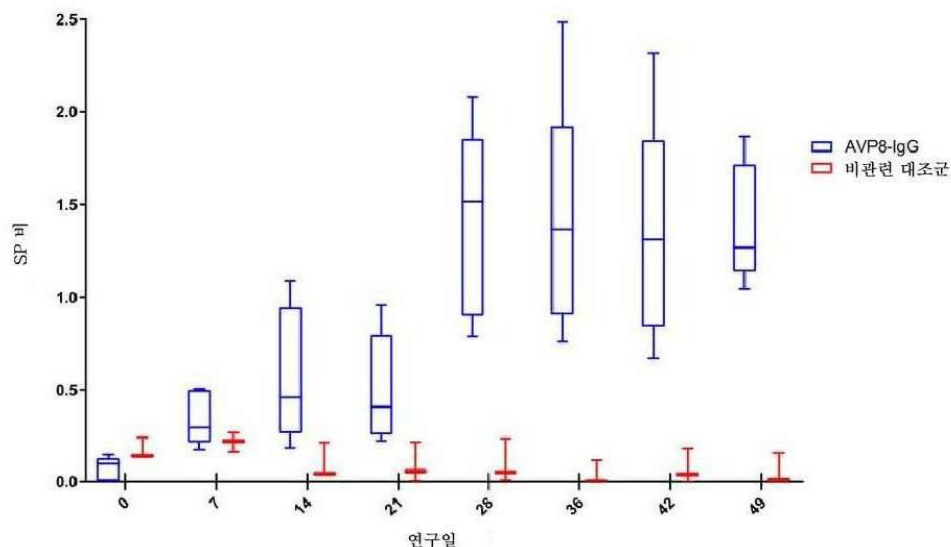
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 로타바이러스에 대한 백신접종에 유용한 면역원성 조성물

(57) 요약

본 발명은 특히 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후를 감소시키기 위한 백신을 제조하는데 유용한 재조합적으로 작제된 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 (i) N-말단에서 C-말단 방향으로 (A) 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편 및 (B) 예를 들어 IgG Fc 단편과 같은 면역글로불린 Fc 단편을 포함하는 융합 단백질, 및 (ii) 상기 융합 단백질과 상이한 면역원성 물질을 함유하는 면역원성 조성물에 관한 것으로, 여기서 상기 면역원 조성물은 돼지에서 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후, 사망률 또는 분변 배출을 감소시키는 방법에서 사용 가능하다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/005 (2013.01)
A61K 2039/552 (2013.01)
A61K 2039/55566 (2013.01)
A61K 2039/58 (2013.01)
A61K 2039/6025 (2013.01)
A61K 2039/6056 (2013.01)
A61K 2039/70 (2013.01)
C12N 2720/12322 (2013.01)
C12N 2720/12334 (2013.01)

(72) 발명자

하이웁 그레고리 브라이언

미국 조지아주 30096 델루스 세털라이트 불러바드
 3239 에이에이치 페이턴즈 베링거 인겔하임 애니멀
 헬스 유에스에이 인코포레이티드

존슨 웨슬리 스콧

미국 조지아주 30096 델루스 세털라이트 불러바드
 3239 에이에이치 페이턴즈 베링거 인겔하임 애니멀
 헬스 유에스에이 인코포레이티드

조던 다이애나 엠. 머피

미국 조지아주 30096 델루스 세털라이트 불러바드
 3239 에이에이치 페이턴즈 베링거 인겔하임 애니멀
 헬스 유에스에이 인코포레이티드

니콜슨 브라이언

미국 조지아주 30096 델루스 세털라이트 불러바드
 3239 에이에이치 페이턴즈 베링거 인겔하임 애니멀
 헬스 유에스에이 인코포레이티드

본 에릭 마틴

미국 조지아주 30096 델루스 세털라이트 불러바드
 3239 에이에이치 페이턴즈 베링거 인겔하임 애니멀
 헬스 유에스에이 인코포레이티드

와이드너 저스틴

미국 조지아주 30096 델루스 세털라이트 불러바드
 3239 에이에이치 페이턴즈 베링거 인겔하임 애니멀
 헬스 유에스에이 인코포레이티드

명세서

청구범위

청구항 1

- (i) - 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편, 및
- 면역글로불린 Fc 단편
- 을 포함하는 폴리펩타이드
- 및
- (ii) 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질
- 을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 링커 모이어티를 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결되거나,

상기 면역글로불린 Fc 단편은 상기 면역글로불린 Fc 단편의 N-말단 아미노산 잔기와 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단 아미노산 잔기 사이의 펩타이드 결합을 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결되는, 면역원성 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 구조식 x-y-z의 융합 단백질이고, 여기서

x는 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편으로 구성되고;

y는 링커 모이어티이고;

z는 면역글로불린 Fc 단편인, 면역원성 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 로타바이러스는 돼지 로타바이러스이고/이거나,

상기 로타바이러스는 로타바이러스 A 및 로타바이러스 C로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 N-말단 연장된 렉틴-유사 도메인이고, 상기 N-말단 연장은 길이가 1개 내지 20개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 5개 내지 15개의 아미노산 잔기인, 면역원성 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 로타바이러스는 유전자형 P[7] 로타바이러스, 유전자형 P[6] 로타바이러스 및 유전자형 P[13] 로타바이러스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 일부, 특히 로타바이러스 A VP8 단백질의 일부의 컨센서스 서열로 이루어지거나, 이러한 컨센서스 서열이고,

상기 로타바이러스 VP8 단백질의 일부의 상기 컨센서스 서열은 바람직하게는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 획득될 수 있는, 폴리펩타이드:

- 로타바이러스 VP8 단백질의 일부를 코딩하는 복수의 뉴클레오타이드 서열을 아미노산 서열로 번역하는 단계,
- 바람직하게는 MUSCLE 서열 정렬 소프트웨어 UPGMB 클러스터링 및 디폴트 갭 페널티 파라미터를 사용하여 상기 아미노산 서열을 공지된 로타바이러스 VP8 단백질에 정렬하는 단계,
- 상기 정렬된 서열을 계통발생학적 분석에 적용하고 로타바이러스 VP8 단백질 서열에 기반하여 이웃 결합 계통 발생 재구성을 생성하는 단계로서, 특히 계통 발생학적 분석을 위해 상기 정렬된 아미노산 서열을 MEGA7 소프트웨어로 가져오고 로타바이러스 VP8 단백질 서열에 기반하여 이웃 결합 계통발생 재구성을 생성하는 단계,
- 계통발생의 부트스트랩 테스트(n=100)와 함께 푸아송 보정 방법을 사용하여 최적의 트리를 계산하는 단계,
- 총 170개 위치에 걸쳐 부위당 아미노산 치환 단위의 진화 거리와 동일한 분지 길이를 이용하여 축적에 따라 최적의 트리를 그리는 단계,
- 부트스트랩 클러스터 연관성이 70% 초과인 노드를 유의미한 것으로 간주하는 단계,
- 약 10%의 거리 및 70% 초과인 부트스트랩 클러스터 연관성을 갖는 노드를 클러스터로 지정하는 단계,
- 클러스터를 선택하고 상기 클러스터 내에서 정렬된 위치당 최대 빈도를 식별하여 컨센서스 서열을 생성하는 단계,
- 및 임의로, 동일한 비율의 아미노산이 정렬된 위치에서 관찰되는 경우, 미리 정의된 생성물 보호 프로파일과 함께 보고된 역학 데이터에 기반하여 아미노산 잔기를 선택하는 단계.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 또는 더 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, 면역원성 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 장관 세포가 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편이 유래된 로타바이러스에 의한 감염에 취약한 종의 계통에 의해 코딩된 면역글로불린 Fc 단편이고/이거나,

상기 면역글로불린 Fc 단편은 바람직하게는 돼지 IgG Fc 단편이고/이거나,

상기 면역글로불린 Fc 단편은 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는, 면역원성 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커 모이어티는 길이가 1개 내지 50개의 아미노산 잔기인 아미노산 서열이고/이거나,

상기 링커 모이어티는 서열번호 9(Gly-Gly-Ser), 서열번호 10 및 서열번호 11로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 66%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는, 면역원성 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15 및 서열번호 16으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질인, 면역원성 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 2개 이상의 면역원성 물질로 이루어지고, 여기서 모든 상기 면역원성 물질은 상기 폴리펩타이드와 상이하고 서로 상이한, 면역원성 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 성분(ii)는 2개 이상의 면역원성 물질로 이루어지고, 각각의 상기 물질은 로타바이러스 항원을 포함하고, 모든 상기 로타바이러스 항원은 성분(i)의 상기 면역원성 단편과 상이하고 서로 상이한, 면역원성 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는

- 로타바이러스 VP8 단백질의 제1 면역원성 단편, 및

- 면역글로불린 Fc 단편

을 포함하는 제1 폴리펩타이드이고,

상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은

로타바이러스 VP8 단백질의 제2 면역원성 단편을 포함하는 제2 폴리펩타이드로서, 상기 제2 면역원성 단편은 상기 제1 면역원성 단편과 상이한, 제2 폴리펩타이드,

및 바람직하게는 로타바이러스 VP8 단백질의 제3 면역원성 단편을 포함하는 제3 폴리펩타이드로서, 상기 제3 면역원성 단편은 상기 제1 및 제2 면역원성 단편 둘 다와 상이한, 제3 폴리펩타이드,

및 임의로 로타바이러스 VP8 단백질의 제4 면역원성 단편을 포함하는 제4 폴리펩타이드로서, 상기 제4 면역원성 단편은 상기 제1 내지 제3 면역원성 단편 모두와 상이한, 제4 폴리펩타이드

를 포함하거나 이로 이루어지는, 면역원성 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은

로타바이러스 VP8 단백질의 제2 면역원성 단편을 포함하는 제2 폴리펩타이드, 및

로타바이러스 VP8 단백질의 제3 면역원성 단편을 포함하는 제3 폴리펩타이드

를 포함하거나 이로 이루어지고,

상기 제1 내지 제3 면역원성 단편 각각은 **X7**, **X6**, **X13** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,

여기서,

X7은 유전자형 P[7] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 나타내고,

X6은 유전자형 P[6] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 나타내고,

X13은 유전자형 P[13] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 나타내고,

XC는 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편을 나타내고;

단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X7**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X6**이고 상기 제3 면역원성 단편은 **X13** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X6**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**이고 상기 제3 면역원성 단편은 **X13** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X13**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**이고 상기 제3 면역원성 단편은 **X6** 및

XC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

단, 상기 제1 면역원성 단편이 XC인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 X7이고 상기 제3 면역원성 단편은 X6 및 X13로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은

제2 폴리펩타이드, 및

제3 폴리펩타이드

를 포함하거나 이로 이루어지고,

상기 제1 내지 제3 폴리펩타이드 각각은 R7, R13, R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,

여기서,

R7은 서열번호 12로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고,

R13은 서열번호 14로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고,

R6은 서열번호 13으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고,

RC는 서열번호 15로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고;

단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R7인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R13이고 상기 제3 폴리펩타이드는 R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R6인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고 상기 제3 폴리펩타이드는 R13 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R13인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고 상기 제3 폴리펩타이드는 R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

단, 상기 제1 폴리펩타이드가 RC인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고 상기 제3 폴리펩타이드는 R13 및 R6으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 서열번호 12로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질, 및

(ii) 서열번호 14, 서열번호 13 및 서열번호 15로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질

을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 약제로서 사용하기 위한, 바람직하게는 백신으로서 사용하기 위한 면역원성 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후, 사망률 또는 분변 배출을 감소시키거나 예방하는 방법에 사용하기 위한, 또는 대상체의 로타바이러스 감염을 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한

및/또는 대상체의 로타바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 사용하기 위한 면역원성 조성물.

청구항 20

자돈의 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후, 사망률 또는 분변 배출을 감소시키거나 예방하는 방법으로서, 상기 방법은

- 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 모돈에게 투여하는 단계, 및
- 상기 자돈이 상기 모돈에 의해 수유되도록 하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 21

제19항에 따른 면역원성 조성물 또는 제20항의 방법으로서, 상기 하나 이상의 임상 징후는

- 설사,
- 로타바이러스 콜로니화, 특히 장의 로타바이러스 콜로니화,
- 병변, 특히 육안적 병변,
- 1일 평균 체중 증가량 감소, 및
- 위장염

으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물 또는 방법.

청구항 22

제19항 또는 제21항에 따른 면역원성 조성물 또는 제20항 또는 제21항의 방법으로서,

- 상기 로타바이러스 감염은 유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 의한 감염이거나,
- 상기 로타바이러스에 의한 감염은 유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 의한 감염이거나,
- 상기 로타바이러스에 대한 면역 반응은 유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 대한 면역 반응인,

면역원성 조성물 또는 방법.

청구항 23

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물의 제조 방법으로서, 상기 방법은

- (a) 배양물 중의 감수성 세포를 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 명시된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터로 감염되도록 허용하는 단계로서, 상기 폴리펩티드는 상기 벡터에 의해 발현되는, 단계;
- (b) 이후 상기 폴리펩티드를, 특히 세포 배양 상청액에서 회수하는 단계로서, 바람직하게는 세포 파편은 바람직하게는 적어도 하나의 필터, 바람직하게는 2개의 필터를 통한 미세 여과를 포함하는 분리 단계를 통해 상기 폴리펩티드로부터 분리되고, 상기 적어도 하나의 필터는 바람직하게는 약 1 μ m 내지 약 20 μ m 및/또는 약 0.1 μ m 내지 약 4 μ m의 공극 크기를 갖는, 단계;

(c) 단계(b)의 혼합물에 이원 에틸렌이민(BEI)을 첨가하여 상기 벡터를 불활성화시키는 단계;

(d) 단계(c)로부터 생성된 혼합물에 티오황산나트륨을 첨가하여 BEI를 중화하는 단계; 및

(e) 약 5kDa 내지 약 100kDa, 바람직하게는 약 10kDa 내지 약 50kDa의 분자량 컷오프를 갖는 필터 막을 갖는 필터를 사용하는 여과 단계에 의해 상기 혼합물로부터 액체의 일부를 제거함으로써 단계(d)로부터 생성된 혼합물에서 상기 폴리펩티드를 농축시키는 단계를 포함하고,

상기 방법은

(f) 단계(e) 후에 잔류하는 혼합물을 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질과 혼합하는 단계; 및

(g) 임의로 단계(f) 후에 잔류하는 혼합물을 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제, 희석제, 부형제 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 추가 성분과 혼합하는 단계를 포함하거나,

상기 방법은

(f) 단계(e) 후에 잔류하는 혼합물을 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제, 희석제, 부형제 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 추가 성분과 혼합하는 단계 및

(g) 단계(f) 후에 잔류하는 혼합물을 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질과 혼합하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후를 감소시키기에 유용한 제조합적으로 작제된 폴리펩타이드에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 (i) N-말단에서 C-말단 방향으로 (A) 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편 및 (B) 예를 들어 IgG Fc 단편과 같은 면역글로불린 Fc 단편을 포함하는 융합 단백질, 및 (ii) 상기 융합 단백질과 상이한 면역원성 물질을 함유하는 면역원성 조성물에 관한 것으로, 상기 면역원 조성물은 돼지(swine)에서 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후, 사망률 또는 분변 배출(fecal shedding)을 감소시키는 방법에서 사용 가능하다.

배경 기술

[0002] 로타바이러스(Rotavirus)는 레오바이러스과(*Reoviridae*) 내의 속을 포함하는 이중-가닥 RNA 바이러스이다. 로타바이러스 감염은 위장관 질환을 유발하는 것으로 알려져 있으며 영유아의 위장염의 가장 흔한 원인으로 간주된다. 로타바이러스는 분변-구강 경로를 통해 전파되며 소장 내벽 세포를 감염시킨다. 감염된 세포는 위장염을 유발하는 장독소를 생성하여 심각한 설사를 일으키고 때로는 탈수를 통해 사망에 이르게 한다.

[0003] 바이러스 분류에 관한 국제 위원회(International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV)에 의해 정의되고 Matthijnsens 등(Arch Virol 157:1177-1182 (2012))에 의해 요약된 바에 의하면, 로타바이러스는 이중 가닥 RNA(dsRNA)의 11개 세그먼트로 구성된 게놈을 보유하고 있으며 내부 바이러스 캡시드 단백질 6(VP6)의 항원 특성 및 서열-기반 분류에 따라 현재 8개 그룹(A-H)으로 분류되고, 본원에 언급된 상기 및 하기 간행물은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다.

[0004] 로타바이러스의 게놈은 6개의 구조 단백질(VP1-VP4, VP6 및 VP7)과 6개의 비구조 단백질(NSP1-NSP6)을 코딩하며, 여기서 게놈 세그먼트 1 내지 10은 각각 하나의 로타바이러스 단백질을 코딩하고, 게놈 세그먼트 11은 2개의 단백질(NSP5 및 NSP6)을 코딩한다.

[0005] 로타바이러스 A와 관련하여, 상이한 스트레인(strain)은 구조 단백질 VP7 및 VP4에 기반하여 유전자형(비교 서열 분석 및/또는 핵산 혼성화 데이터에 의해 정의됨) 또는 혈청형(혈청학적 검정에 의해 정의됨)으로 분류될 수 있다. VP7과 VP4는 가장 바깥쪽 단백질 층(외부 캡시드)의 성분이며, 둘 다 중화 에피토프를 보유하고 있다. VP7은 비리온의 외층 또는 표면을 형성하는 당단백질(따라서 "G"로 표시됨)이다. VP7은 스트레인의 G형을 결정하고 G 혈청형 및 G 유전자형에 대한 표기는 동일하다. VP4는 프로테아제 민감성(따라서 "P"로 표시됨)이며 바이러스의 P형을 결정한다. G형과 달리, P 혈청형 및 유전자형에 할당된 번호는 상이하다(Santos N. et Hoshino Y., 2005, Reviews in Medical Virology, 15, 29-56). 따라서, P 혈청형은 P 다음에 할당 번호로 표시되고, P

유전자형은 P 다음에 괄호 안에 할당 번호로 표시된다(예를 들어, "P[7]" 또는 "P[13]"). 동일한 유전자형에 속하는 균주는 89%보다 높은 아미노산 서열 동일성을 갖는다(Estes and Kapikian. Rotaviruses. In: Knipe, DM; Howley, PM Fields Virology, 5th ed.; Wolters Kluwer/ Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia, PA, USA (2007); Gorziglia *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 87(18):7155-9(1990)).

[0006] 로타바이러스는 특히 돼지의 위장염의 주요 원인이기도 하며 그룹 A 및 C 로타바이러스에 대한 항체는 돼지의 거의 100%에 존재한다(Vlasova *et al.* Viruses. 9(3): 48 (2017)). 현재, 로타바이러스 A에 대한 변형된 생백신 또는 사백신만이 이용 가능하다. 실험실에서 로타바이러스 C를 배양할 수 없기 때문에 이 그룹에 대한 백신 개발에 어려움을 겪어 왔으며, 이는 재조합 백신의 매력에 더해졌다.

[0007] 재조합 항-로타바이러스 백신의 생성은 3개의 층으로 배열된 4개의 단백질로 구성된 로타바이러스 캡시드의 복잡성으로 인해 방해받고 있다. 가장 내층은 T=1 대칭을 갖는 60개의 VP2 이량체로 구성된다. VP2 층은 T=13 대칭을 갖는 260개의 VP6 삼량체에 의해 형성되는 중간층의 적절한 순서를 위해 필요하다. VP2와 VP6 사이에 생성된 대칭 불일치는 5개의 별개의 VP6 삼량체 위치와 3개의 별개의 공극 유형을 생성한다. VP2가 없는 경우, VP6은 바이러스 어셈블리의 부산물을 나타낼 수 있는 염 및 pH-의존적 방식으로 정렬된 고분자량 미세소관 및 스펜도이드를 용이하게 형성한다. 캡시드에서 VP6 층은 VP4 스파이크를 적소에 고정하는 클램프 역할을 하는 VP7의 260개의 Ca²⁺-의존적 삼량체에 의해 포괄된다. VP7은 글리코실화된 또는 G형 항원이며 중화 에피토프를 포함한다. 대부분의 중화 항체는 삼량체 VP7만을 인식하고 VP7 삼량체의 해리를 방지하여 결국 스파이크의 방출을 차단하는 역할을 하는 것으로 생각된다. 로타바이러스 스파이크는 공극 유형 II에서만 VP6 층에 삽입되어 있는 60개의 VP4의 삼량체로 존재한다. VP4는 중화 에피토프를 포함하고 트립신에 의해 스파이크 염기 VP5* 및 절단 후 VP5*와 회합된 상태로 유지되는 세포 상호작용 헤드 VP8*로 절단되는 P형 항원이다. 트립신처리는, 스파이크가 숙주 세포 상의 수용체 결합을 위한 활성 부위를 노출시키기 위한 상당한 구조적 재배열을 겪는 동안, 스파이크가 세포에 진입할 수 있게 준비시킨다. 상기 어셈블리 과정의 복잡성을 무시하고, 적절한 어셈블리를 촉진하기 위한 환경 조건을 갖는 로타바이러스 캡시드 단백질의 화학양론적 발현은 달성하기 어렵다.

[0008] 로타바이러스 캡시드 어셈블리의 어려움에 비추어, 서브유닛 백신 접근법에 대한 관심이 있었다. VP7 및 VP4는 중화 에피토프를 포함하는 두 단백질이지만, VP7의 사용은 이의 글리코실화 및 칼슘-의존적 삼량체화로 인해 복잡하였다. VP4의 사용은 삼량체화, 트립신처리 및 다양한 잠재적 입체형태(conformational) 상태로 인해 복잡하다. 중화 에피토프를 함유하는 VP4의 트립신처리에 의해 생산되는 VP8 도메인 또는 VP8*로도 명명된 VP8 단백질은 단량체이며, 고해상도로 결정된 구조를 가지며(Dormitzer *et al.* EMBO J. 21(5): 885-897 (2002)) 매우 안정적이라고 기재되어 있다.

[0009] 또한, VP8 단백질 내에서, 숙주 수용체와 상호 작용하고 바이러스가 숙주 세포에 부착하는데 관여하는 것으로 간주되는 것은 렉틴-유사 도메인(aa65-224)이다(Rodriguez *et al.*, PloS Pathog 10(5):e1004157 (2014)).

[0010] 아동용 로타바이러스 서브유닛 백신을 개발하기 위한 접근법이 기재되었으며, 여기서 과상표 독소이드 범용 CD4⁺ T 세포 에피토프(aa830-844) P2에 N-말단이 연결된 절두된 VP8 단백질(VP8*의 아미노산 잔기 64(또는 65)-223)은 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)에서 생산되었고(Wen *et al.* Vaccine. 32(35):4420-7 (2014)), 영유아에서 테스트되었다(Groome *et al.* Lancet Infect Dis.17(8):843- 853(2017)). 그러나, 이러한 (로타바이러스 유전자형 P[8]의 절단된 VP8 단백질에 기반하는) 1가 서브유닛 백신의 사용은 이형 로타바이러스 균주에 대해 불량한 반응을 유발하였고, 또한 3가 백신 제형(유전자형 P[4], P[6], P[8] 항원을 조합하기 위한 3개의 단백질로 구성됨)이 최근에 테스트되었다(Groome *et al.* Lancet Infect Dis. S1473-3099(20)30001 (2020)).

[0011] 또 다른 접근법에서, N-말단 절두된 VP8 단백질인 "VP8-1"(aa26-241)은 콜레라 독소의 5량체화 비독성 B 서브유닛(CTB)과 N-말단 또는 C-말단에서 융합되었다. 생성된 펜타머 융합 단백질(CTB-VP8-1, VP8-1-CTB) 중에서 CTB-VP8-1(즉, VP8-1 N-말단이 CTB에 융합됨)만이 추가 개발을 위한 실험 가능한 후보로 간주되었고, VP8-1-CTB에 비해, 이는 마우스 모델에서 GM1 또는 VP8*에 특이적인 형태 민감성 중화 모노클로날 항체에 더 높은 결합 활성을 보였고, 더 높은 역가의 중화 항체를 유발하고 더 높은 보호 효능을 부여하였다(Xue *et al.* Hum Vaccin Immunother 12(11) 2959-2968 (2016)).

[0012] 그러나, 로타바이러스 캡시드 어셈블리의 어려움에 비추어, 특히 서브유닛 백신이 일반적으로 매우 안전한 것으로 간주되기 때문에 대안적인 서브유닛 백신 접근법에 대한 관심이 있다. 또한 배양이 어려운 로타바이러스의 백신 항원을 간단하게 생산할 수 있도록 하는 효과적인 로타바이러스 서브유닛 항원의 재조합 발현이 강력하게 요구된다. 또한, 로타바이러스는 돼지의 위장염의 주요 원인이기 때문에, 특히 현재 시판되고 있는 돼지용 MLV

로타바이러스 백신과 대등하거나 더 효율적인 항원을 포함하는 폐지용 서브유닛 백신의 필요성이 절실하다.

발명의 내용

- [0013] 상기 기술적 문제에 대한 해결책은 청구범위에서 특징지어지는 설명 및 실시형태에 의해 달성된다.
- [0014] 따라서, 본 발명은 이의 상이한 양상에서 청구범위에 따라 구현된다.
- [0015] 본 발명은 로타바이러스 VP8 단백질의 단편, 즉 C-말단에서 IgG Fc 단편과 연결된 N-말단 연장된 렉틴-유사 도메인을 포함하는 폴리펩타이드의 모돈으로의 투여가, 상기 폴리펩타이드가 투여 전에 추가의 면역원성 물질과 혼합된 경우에도, 로타바이러스 시험감염(challenge) 후 자손의 설사 및 분변 배출을 중화 항체의 수동 전달을 통해 상당히 감소시킨다는 놀라운 발견에 기반한다.
- [0016] 제1 양상에서, 따라서 본 발명은
- [0017] (i) - 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편, 및
- [0018] - 면역글로불린 Fc 단편
- [0019] 을 포함하는 폴리펩타이드
- [0020] 및
- [0021] (ii) 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질
- [0022] 을 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것으로, 여기서 상기 면역원성 조성물은 이하에서 "본 발명의 면역원성 조성물"로도 명명된다.
- [0023] 따라서, 본 발명의 면역원성 조성물은 특히 2가지 성분(i; ii), 즉
- [0024] (i) - 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편, 및
- [0025] - 면역글로불린 Fc 단편
- [0026] 을 포함하는 폴리펩타이드로서, 상기 폴리펩타이드는 이하에서 각각 "본 발명의 면역원성 조성물의 성분(i)" 또는 "성분(i)"로도 명명되는, 폴리펩타이드, 및
- [0027] (ii) 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질로서, 상기 적어도 하나의 면역원성 물질은 이하에서 각각 "본 발명의 면역원성 조성물의 성분(ii)" 또는 "성분(ii)"로도 명명되는, 적어도 하나의 면역원성 물질
- [0028] 을 포함하는 조성물이다.
- [0029] - 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편 및
- [0030] - 면역글로불린 Fc 단편 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편
- [0031] 을 포함하고 본 발명의 맥락에서 본원에 기재된 폴리펩타이드는 이하에서 "본 개시내용의 폴리펩타이드"로도 명명된다.
- [0032] 따라서, 본 발명의 면역원성 조성물의 성분(i)은 본 개시내용의 폴리펩타이드이다.
- [0033] 바람직하게는, 성분(ii)는 2개, 3개 또는 그 이상의 면역원성 물질로 이루어지며, 여기서 상기 모든 면역원성 물질은
- [0034] 성분(i)와 상이하고
- [0035] 서로 상이하다.
- [0036] 본 발명의 맥락에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드가 세포에서 생산될 때 세포로부터 방출되고 이어서 세포 자체로부터가 아니라 세포를 둘러싼 상청액으로부터 회수될 수 있기 때문에, 이러한 면역원성 조성물이 간단히 생산될 수 있다는 것도 예기치 않게 발견되었다. 후속적으로, 회수된 폴리펩타이드는 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질을 포함하는 추가 성분(들)과 쉽게 혼합되어 본 발명의 면역원성 조성물을 생산할 수 있다.

- [0037] 본 개시내용의 폴리펩타이드의 추가의 이점은, 원하는 경우, 이것이 상이한 로타바이러스의 2가지 면역원성 단편을 포함/제시하는 하나의 폴리펩타이드로서 제조될 수 있고, 이에 따라 동일한 목적을 위해 조합될 필요가 있는 2개의 상이한 1가 폴리펩타이드를 별도로 제조할 필요가 없다는 점이다.
- [0038] 바람직하게는, 본원에 기재된 면역글로불린 Fc 단편은
- [0039] - 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단, 또는
- [0040] - 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 N-말단에 연결된다.
- [0041] 특히, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 바람직하게는
- [0042] - 링커 모이어티를 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단, 또는
- [0043] - 링커 모이어티를 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 N-말단에 연결된다.
- [0044] 또 다른 바람직한 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 상기 면역글로불린 Fc 단편은
- [0045] - 상기 면역글로불린 Fc 단편의 N-말단 아미노산 잔기와 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단 아미노산 잔기 사이의 펩타이드 결합을 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결되거나,
- [0046] - 상기 면역글로불린 Fc 단편의 C-말단 아미노산 잔기와 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 N-말단 아미노산 잔기 사이의 펩타이드 결합을 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 N-말단에 연결된다.
- [0047] 가장 바람직하게는, 본원에 기재된 바와 같은 면역글로불린 Fc 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결된다.
- [0048] 따라서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 특히
- [0049] - 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편, 및
- [0050] - 면역글로불린 Fc 단편
- [0051] 을 포함하는 폴리펩타이드이며, 여기서 상기 면역글로불린 Fc 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결된다.
- [0052] 본원에 사용된 용어 "폴리펩타이드"는 특히 펩타이드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산 잔기의 임의의 쇄를 지칭하며, 생성물의 특정 길이를 지칭하지 않는다. 예를 들어, "폴리펩타이드"는 아미노산 잔기의 장쇄, 예를 들어 150개 내지 600개 이상의 아미노산 잔기 길이인 것을 지칭할 수 있다. 용어 "폴리펩타이드"는 하나 이상의 번역 후 변형을 갖는 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 번역 후 변형은, 예를 들어 글리코실화, 인산화, 지질화 (예를 들어, 미리스토일화 등), 아세틸화, 편재화, 황산화, ADP 리보실화, 하이드록실화, Cys/Met 산화, 카르복실화, 메틸화 등을 포함한다. 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 본 발명의 맥락에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0053] 용어 "면역원성 단편"은 특히 그것이 유래된 단백질의 면역원성을 적어도 부분적으로 보유하는 단백질의 단편을 지칭하는 것으로 이해된다. 따라서, "로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편"은 특히 전장 VP8 단백질의 면역원성을 적어도 부분적으로 보유하는 로타바이러스 VP8 단백질의 단편을 지칭하는 것으로 이해된다.
- [0054] "면역원성 물질"은 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 유발할 수 있는 임의의 물질, 특히 동물에서 면역 반응을 유발하거나 생산하거나 생성할 수 있는 펩타이드 또는 폴리펩타이드와 같은 분자를 지칭한다.
- [0055] 본원에 기재된 바와 같은 용어 "VP8 단백질"은 특히 로타바이러스와 관련하여 빈번하게 사용되는 "VP8 도메인", "VP8*" 또는 "VP4의 VP8 단편"과 동등한 것으로 이해된다.
- [0056] 본원에 기재된 바와 같은 용어 "면역글로불린 Fc 단편"은 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 2(CH2)와 중쇄 불변 영역 3(CH3)을 포함하고, 보다 구체적으로 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역과 경쇄 불변 영역 1(CL1)을 포함하지 않는 단백질을 지칭한다. 이는 면역글로불린의 힌지 영역 또는 힌지 영역의 일부 (즉, 중쇄 불변 영역의 힌지 영역)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 면역글로불린 Fc 단편은 중쇄 불변 영역 1(CH1)의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다.

- [0057] 본원에 사용된 용어 "면역글로불린 Fc 단편"은 "면역글로불린 Fc 도메인"과 동등한 것으로 이해된다.
- [0058] 본원에 사용된 용어 "~에 연결된(linked to)"은 특히 폴리펩타이드 내에서 면역글로불린 Fc 단편을 로타바이러스 VP 단백질의 면역원성 단편의 C-말단 또는 N-말단에 연결하기 위한 임의의 수단을 지칭한다. 연결 수단의 예는 (1.) 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편의 C-말단에 직접 연결되고 면역글로불린 Fc 단편과도 결합하는 개재 모이어티에 의한 상기 면역글로불린 Fc 단편과 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단의 간접적 연결, 및 (2.) 공유 결합에 의한 면역글로불린 Fc 단편과 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편의 C-말단의 직접 연결을 포함한다. 상기 용어 "~에 연결된" 및 "~와 연결된(linked with)"은 본 발명의 맥락에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0059] 특히, 본원에 사용된 바와 같은 표현
- [0060] "- 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편, 및
- [0061] - 면역글로불린 Fc 단편을 포함하는 폴리펩타이드로서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결되는, 폴리펩타이드"는 특히 표현
- [0062] "N-말단에서 C-말단 방향으로
- [0063] - 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편의 아미노산 서열, 및
- [0064] - 면역글로불린 Fc 단편의 아미노산 서열
- [0065] 을 포함하는 폴리펩타이드",
- [0066] 또는 표현
- [0067] "- 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편, 및
- [0068] - 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결된 면역글로불린 Fc 단편
- [0069] 을 포함하는 폴리펩타이드"와 동등하다.
- [0070] 가장 바람직한 양상에 따르면, 면역글로불린 Fc 단편은 링커 모이어티를 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편의 C-말단에 연결된다.
- [0071] 본 발명의 맥락에서 본원에 기재된 링커 모이어티는 바람직하게는 펩타이드 링커이다.
- [0072] 본원에 사용된 용어 "펩타이드 링커"는 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 펩타이드를 지칭한다. 보다 구체적으로, 본원에 사용된 용어 "펩타이드 링커"는 2개의 가변 단백질 및/또는 도메인, 예를 들어, 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편 및 면역글로불린 Fc 단편을 연결할 수 있는 펩타이드를 지칭한다.
- [0073] 특히 바람직한 양상에서, 면역글로불린 Fc 단편은 링커 모이어티를 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결되며, 여기서
- [0074] - 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 링커 모이어티의 N-말단 아미노산 잔기와 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편의 C-말단 아미노산 잔기 사이의 펩타이드 결합을 통해 링커 모이어티에 연결되고,
- [0075] - 링커 모이어티는 면역글로불린 Fc 단편의 N-말단 아미노산 잔기와 링커 모이어티의 C-말단 아미노산 잔기 사이의 펩타이드 결합을 통해 면역글로불린 Fc 단편에 연결된다.
- [0076] 또한, 면역글로불린 Fc 단편은 면역글로불린 Fc 단편의 N-말단 아미노산 잔기와 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편의 C-말단 아미노산 잔기 사이의 펩타이드 결합을 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편에 연결되는 것이 바람직할 수 있다.
- [0077] 본 개시내용의 폴리펩타이드는 특히 융합 단백질이라는 것을 이해할 것이다.
- [0078] 본원에 사용된 용어 "융합 단백질"은 동일하지 않은 2개 이상의 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 융합(즉, 결합)함으로써 형성된 단백질을 의미한다. 전형적으로, 융합 단백질은 재조합 DNA 기술을 사용하여 2개 이상의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 말단 간(end to end) 결합에 의해 제조된다. 보다 구체적으로, 용어 "융합 단백질"은 따라서 제1 폴리펩타이드를 코딩하는 제1 핵산 서열과 제2 폴리펩타이드를 코딩하는 적어도 제2 핵산을 조합함으로써 생성된 핵산 전사체로부터 번역된 단백질을 지칭하며, 여기서 융합 단백질은 천연 발생 단백질이 아니다. 핵산 작제물은 융합 단백질에서 결합된 2개 이상의 폴리펩타이드를 코딩할 수 있다.

- [0079] 또 다른 바람직한 양상에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 구조식 x-y-z의 융합 단백질이고, 여기서
- [0080] x는 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편으로 이루어지거나 이를 포함하고;
- [0081] y는 링커 모이어티이고;
- [0082] z는 면역글로불린 Fc 단편이다.
- [0083] 구조식 x-y-z에서, 특히 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단 아미노산 잔기가 바람직하게는 상기 링커 모이어티의 N-말단 아미노산 잔기와의 펩타이드 결합을 통해 상기 링커 모이어티와 연결되고, 상기 면역글로불린 Fc 단편의 N-말단 아미노산 잔기가 바람직하게는 상기 링커 모이어티의 C-말단 아미노산 잔기와의 펩타이드 결합을 통해 상기 링커 모이어티와 연결된다는 것을 이해해야 한다.
- [0084] 본원에 기재된 바와 같이 "x는 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편으로 이루어진다"라는 문구는 특히 "x는 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편이다"와 동등한 것으로 이해된다.
- [0085] 바람직한 양상에서, 본원에 언급된 바와 같은 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 바람직하게는 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편이 투여된 대상체에서 로타바이러스에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다.
- [0086] 또 다른 바람직한 양상에서, 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 길이가 50개 내지 200개, 바람직하게는 140개 내지 190개 아미노산 잔기인 폴리펩타이드이다.
- [0087] 본원에 언급된 로타바이러스는 바람직하게는 로타바이러스 A 및 로타바이러스 C로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 따라서, 본원에 언급된 바와 같은 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 바람직하게는 로타바이러스 A VP8 단백질의 면역원성 단편 및 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0088] 본원에서 언급된 바와 같은 용어(들) "로타바이러스 A" 및 "로타바이러스 C"는 각각 ICTV(문헌[Mattijnsens *et al.* Arch Virol 157: 1177-1182 (2012)]에 의해 요약됨)에서 정의된 바와 같은 로타바이러스 A 및 로타바이러스 C와 관련된다.
- [0089] 또 다른 바람직한 양상에 따르면, 본원에 언급된 로타바이러스는 돼지(porcine) 로타바이러스이다.
- [0090] 특히 바람직한 일 양상에서, 본원에 언급된 로타바이러스는 로타바이러스 A이다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같은 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 바람직하게는 로타바이러스 A VP8 단백질의 면역원성 단편이다.
- [0091] 추가의 바람직한 양상에서, 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 렉틴-유사 도메인을 포함한다. 본원에 언급된 바와 같은 "로타바이러스 VP8 단백질의 렉틴-유사 도메인"은 바람직하게는 로타바이러스 A VP8 단백질의 렉틴-유사 도메인인 것으로 이해된다.
- [0092] 용어 "로타바이러스 VP8 단백질의 렉틴-유사 도메인"은 특히 로타바이러스 VP8 단백질의 잔기 65-224를 지칭하거나, 각각 로타바이러스 VP8 단백질의 아미노산 잔기 65-224로 이루어진 아미노산 서열에 상응하고, 여기서 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 아미노산 잔기 65-224는 바람직하게는 로타바이러스 A VP8 단백질의 아미노산 잔기 65-224이다.
- [0093] 따라서, "로타바이러스 VP8 단백질의 렉틴-유사 도메인"은 바람직하게는 로타바이러스 VP8 단백질, 특히 로타바이러스 A VP8 단백질의 아미노산 잔기 65-224의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0094] 바람직하게는, 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 N-말단 연장된 렉틴-유사 도메인이고, 여기서 상기 N-말단 연장은 1개 내지 20개의 아미노산 잔기, 특히 5개 내지 15개의 아미노산 잔기의 길이이다. 가장 바람직하게는, 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 N-말단 연장된 렉틴-유사 도메인이며, 여기서 상기 N-말단 연장은 길이가 8개인 아미노산 잔기이다.
- [0095] 상기 N-말단 연장의 아미노산 서열은 바람직하게는 로타바이러스 VP8 단백질의 아미노산 서열에서 렉틴-유사 도메인의 N-말단 아미노산 잔기에 축적하는 각각의 길이의 아미노산 서열이다.
- [0096] 따라서, 특정 양상에서, 본원에 언급된 바와 같은 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 바람직하게는 로타바이러스 VP8 단백질, 특히 로타바이러스 A 단백질의 아미노산 잔기 60-224, 아미노산 잔기 59-224, 아미노산 잔기 58-224, 아미노산 잔기 57-224, 아미노산 잔기 56-224, 아미노산 잔기 55-224, 아미노산 잔기 54-

224, 아미노산 잔기 53-224, 아미노산 잔기 52-224, 아미노산 잔기 51-224, 아미노산 잔기 50-224, 또는 아미노산 잔기 49-224의 아미노산 서열로 이루어진다.

- [0097] 가장 바람직하게는, 본원에 언급된 바와 같은 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 로타바이러스 VP8 단백질, 특히 로타바이러스 A 단백질의 아미노산 잔기 57-224의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0098] 아미노산 잔기의 상기 번호매김(예를 들어 "65-224" 또는 "57-224")은 바람직하게는 야생형 로타바이러스 VP8 단백질, 특히 야생형 로타바이러스 A VP8 단백질의 아미노산 서열을 참조한다. 상기 야생형 로타바이러스 VP8 단백질은 바람직하게는 서열번호 1에 제시된 단백질이다.
- [0099] 추가의 바람직한 양상에 따르면, 본원에 언급된 로타바이러스는 로타바이러스, 특히 유전자형 P[6] 로타바이러스, 유전자형 P[7] 로타바이러스 및 유전자형 P[13] 로타바이러스로 이루어진 그룹으로부터 선택된 로타바이러스 A이다. 따라서, 본원에 언급된 바와 같은 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 바람직하게는 유전자형 P[6] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편, 유전자형 P[7] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편 및 유전자형 P[13] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 특히 유전자형 P[6] 로타바이러스 A VP8 단백질의 면역원성 단편, 유전자형 P[7] 로타바이러스 A VP8 단백질의 면역원성 단편 및 유전자형 P[13] 로타바이러스 A VP8 단백질의 면역원성 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0100] 본원에 사용된 용어 "유전자형 P[6] 로타바이러스", "유전자형 P[7] 로타바이러스", "유전자형 P[13] 로타바이러스" 및 "유전자형 P[23] 로타바이러스"는 특히 로타바이러스의 확립된 VP4(P) 유전자형 분류(예를 들어, P[6], P[7], P[13] 또는 P[23])와 관련되고, 이는 문헌[Estes and Kapikian. Rotaviruses. In: Knipe, D.M.; Howley, P.M. Fields Virology, 5th ed.; Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia, PA, USA (2007); Gorziglia *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 87(18):7155-9 (1990)]에 기재되어 있다.
- [0101] 가장 바람직하게는, 본원에 언급된 로타바이러스는 유전자형 P[7] 로타바이러스이다. 따라서, 본원에 언급된 바와 같은 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 가장 바람직하게는 유전자형 P[7] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편, 특히 유전자형 P[7] 로타바이러스 A VP8 단백질의 면역원성 단편이다.
- [0102] 본원에 언급된 로타바이러스 VP8 단백질은 가장 바람직하게는 서열번호 1의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0103] 본원에 언급된 바와 같은 로타바이러스 VP8 단백질의 렉틴-유사 도메인은 바람직하게는 서열번호 2의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0104] 일례에서, 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 서열번호 3의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0105] 또 다른 바람직한 양상에서, 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 일부, 특히 로타바이러스 A VP8 단백질의 일부의 컨센서스(consensus) 서열로 이루어지거나 이러한 컨센서스 서열이다.
- [0106] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "컨센서스 서열"은 특히 관련 서열 패밀리에서 가장 빈번하게 발생하는 아미노산(또는 뉴클레오타이드)으로부터 형성된 서열을 지칭한다(예를 들어, 문헌[Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987)] 참조). 단백질 패밀리에서, 컨센서스 서열 내의 각 위치는 패밀리의 해당 위치에서 가장 빈번하게 발생하는 아미노산에 의해 점유된다. 따라서, 용어 "컨센서스 서열"은 추정된 아미노산 서열(또는 뉴클레오타이드 서열)을 의미한다. 컨센서스 서열은 복수의 유사한 서열을 나타낸다. 컨센서스 서열 내의 각 위치는 3개 이상의 서열을 정렬함으로써 결정되는 해당 위치에서 가장 빈번하게 발생하는 아미노산 잔기(또는 뉴클레오타이드 염기)에 상응한다.
- [0107] 바람직하게는, 본원에 언급된 바와 같은 로타바이러스 VP8 단백질 일부의 컨센서스 서열은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 수득 가능하다:
- [0108] - 로타바이러스 VP8 단백질의 일부를 코딩하는 복수의 뉴클레오타이드 서열을 아미노산 서열로 번역하는 단계,
- [0109] - 바람직하게는 MUSCLE 서열 정렬 소프트웨어 UPGMB 클러스터링 및 디폴트 갭 페널티 파라미터를 사용하여 상기

아미노산 서열을 공지된 로타바이러스 VP8 단백질에 대해 정렬하는 단계,

- [0110] - 상기 정렬된 서열을 계통발생학적 분석에 적용하고 로타바이러스 VP8 단백질 서열에 기반하여 이웃 결합 계통 발생 재구성을 생성하는 단계로서, 특히 계통 발생학적 분석을 위해 상기 정렬된 아미노산 서열을 MEGA7 소프트웨어로 가져오고 로타바이러스 VP8 단백질 서열에 기반하여 이웃 결합 계통발생 재구성을 생성하는 단계,
- [0111] - 계통 발생의 부트스트랩 테스트(n=100)와 함께 푸아송 보정 방법을 사용하여 최적의 트리를 계산하는 단계,
- [0112] - 총 170개 위치에 걸쳐 부위당 아미노산 치환 단위의 진화 거리와 동일한 분지 길이를 이용하여 축적에 따라 최적의 트리를 그리는 단계,
- [0113] - 부트스트랩 클러스터 연관성이 70% 초과인 노드를 유의미한 것으로 간주하는 단계,
- [0114] - 약 10%의 거리 및 70% 초과인 부트스트랩 클러스터 연관성을 갖는 노드를 클러스터로서 지정하는 단계,
- [0115] - 클러스터를 선택하고 상기 클러스터 내의 정렬된 위치당 최대 빈도를 식별하여 컨센서스 서열을 생성하는 단계,
- [0116] - 및 임의로, 동일한 비율의 아미노산이 정렬된 위치에서 관찰되는 경우, 미리 정의된 생성물 보호 프로파일과 함께 보고된 역학 데이터에 기반하여 아미노산 잔기를 선택하는 단계.
- [0117] 예를 들어, 이러한 맥락에서 로타바이러스 VP8 단백질의 번역원성 단편은 바람직하게는 서열번호 4 및 서열번호 5로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0118] 추가의 바람직한 양상에서, 본원에 언급된 로타바이러스는 로타바이러스 C이다. 이러한 양상에 따르면, 로타바이러스 VP8 단백질의 번역원성 단편은 바람직하게는 로타바이러스 C VP8 단백질의 번역원성 단편이다.
- [0119] 이러한 양상의 맥락에서, 로타바이러스 VP8 단백질의 번역원성 단편은 바람직하게는 서열번호 6의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0120] 따라서, 본 발명에 따르면, 로타바이러스 VP8 단백질의 번역원성 단편은 바람직하게는
- [0121] - 로타바이러스 A VP8 단백질의 번역원성 단편, 특히 본원에 기재된 임의의 로타바이러스 A VP8 단백질의 번역원성 단편, 또는
- [0122] - 로타바이러스 VP8 단백질의 일부, 예컨대 로타바이러스 A VP8 단백질의 일부의 컨센서스 서열, 바람직하게는 컨센서스 서열의 맥락에서 본원에 기재된 로타바이러스 VP8 단백질의 임의의 번역원성 단편, 또는
- [0123] - 로타바이러스 C VP8 단백질의 번역원성 단편, 특히 본원에 기재된 로타바이러스 C VP8 단백질의 임의의 번역원성 단편
- [0124] 으로 이루어지거나 이러한 단편이다.
- [0125] 특히 바람직한 양상에서, 로타바이러스 VP8 단백질의 번역원성 단편은 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드이다.
- [0126] 본원에 기재된 번역글로불린 Fc 단편은 바람직하게는 길이가 적어도 220개의 아미노산 잔기, 가장 바람직하게는 길이가 220개 내지 250개의 아미노산 잔기이다.
- [0127] 특히 바람직한 다른 양상에 따르면, 본원에 기재된 번역글로불린 Fc 단편은 비-글리코실화된다(non-glycosylated). 본원에 사용된 용어 "비-글리코실화된다"는 특히 번역글로불린 Fc 단편에 올리고당 분자가 부착되어 있지 않음을 의미한다.
- [0128] 바람직하게는, 본원에 언급된 바와 같은 번역글로불린 Fc 단편은 번역글로불린의
- [0129] - 중쇄 불변 영역 2(CH2), 및
- [0130] - 중쇄 불변 영역 3(CH3),

- [0131] - 및 임의로 힌지 영역 또는 힌지 영역의 일부를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0132] 또 다른 바람직한 양상에 따르면, 본원에 언급된 면역글로불린은 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 따라서, 면역글로불린 Fc 단편은 바람직하게는 IgG Fc 단편, IgA Fc 단편, IgD Fc 단편, IgE Fc 단편 및 IgM Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0133] 가장 바람직한 양상에 따르면, 본원에 기재된 면역글로불린 Fc 단편은 IgG Fc 단편이다.
- [0134] 본원에서 언급된 바와 같은 IgG는 바람직하게는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5 및 IgG6으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 따라서, 또 다른 바람직한 양상에 따르면, 본원에 언급된 면역글로불린 Fc 단편은 IgG1 Fc 단편, IgG2 Fc 단편, IgG3 Fc 단편, IgG4 Fc 단편, IgG5 Fc 단편 및 IgG6 Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0135] 가장 바람직하게는, 면역글로불린 Fc 단편은 장관 세포가 본원에 언급된 바와 같은 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편이 유래된 로타바이러스에 의한 감염에 민감한 종의 게놈에 의해 코딩된 단백질이다. 예를 들어, 로타바이러스 VP8 단백질의 단편이 돼지 로타바이러스 VP8 단백질의 단편인 경우, 면역글로불린 Fc 단편은 바람직하게는 돼지 게놈에 의해 코딩된 면역글로불린 Fc 단편이다. 또 다른 예에 따르면, 로타바이러스 VP8 단백질의 단편이 닭 로타바이러스 VP8 단백질의 단편인 경우, 면역글로불린 Fc 단편은 바람직하게는 닭 게놈에 의해 코딩된 면역글로불린 Fc 단편이다.
- [0136] 보다 구체적으로, 면역글로불린 Fc 단편은 바람직하게는 돼지 IgG Fc 단편이다.
- [0137] 추가의 바람직한 양상에서, 면역글로불린 Fc 단편은 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0138] 본원에 언급된 링커 모이어티 또는 펩타이드 링커는 각각 바람직하게는 길이가 1개 내지 50개의 아미노산 잔기, 특히 길이가 3개 내지 20개의 아미노산 잔기인 아미노산 서열이다. 예를 들어, 상기 링커 모이어티는 길이가 3개, 8개 또는 10개의 아미노산 잔기인 펩타이드 링커일 수 있다.
- [0139] 목적에 따라, 융합 단백질 파트너 간의 단백질 분해 위험을 감소시키기 위해 짧은 링커가 바람직할 수 있다. 따라서, 본 발명의 맥락에서 기재된 펩타이드 링커는 바람직하게는 각각 1 내지 5개의 아미노산 잔기, 보다 바람직하게는 2 내지 4개의 아미노산 잔기, 가장 바람직하게는 3개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0140] 바람직한 양상에 따르면, 링커 모이어티는 서열번호 9, 서열번호 10 및 서열번호 11로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 66%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0141] 본원에 언급된 바와 같은 "서열번호 9"는 아미노산 서열(아미노산 잔기에 대한 단일 문자 코드): GGS를 지칭하며, 이는 통상적인 3글자 코드로는 Gly-Gly-Ser이다.
- [0142] 따라서, 본 발명의 맥락에서 "서열번호 9"는 하기 서열 목록에서 서열번호 9의 서열에 대해 제시된 바와 같이 아미노산 서열 Gly-Gly-Ser 또는 각각 "Gly Gly Ser"를 나타낸다.
- [0143] 바람직하게는, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편의 N-말단 아미노산 잔기에 측접하는 N-말단 메티오닌 잔기를 갖는다.
- [0144] 다른 바람직한 양상에 따르면, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 상기 면역글로불린 Fc 단편의 C-말단에 연결된 로타바이러스 VP8 단백질의 추가 면역원성 단편을 포함한다.
- [0145] 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편은 바람직하게는
- [0146] - 로타바이러스 A VP8 단백질의 면역원성 단편, 특히 본원에 기재된 임의의 로타바이러스 A VP8 단백질의 면역원성 단편, 또는
- [0147] - 로타바이러스 VP8 단백질의 일부, 예컨대 로타바이러스 A VP8 단백질의 일부의 컨센서스 서열, 바람직하게는 컨센서스 서열의 맥락에서 본원에 기재된 로타바이러스 VP8 단백질의 임의의 면역원성 단편, 또는
- [0148] - 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편, 특히 본원에 기재된 임의의 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역

원성 단편이거나 이로 이루어진다.

- [0149] 특히, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편은 바람직하게는 서열번호 2 내지 서열번호 6으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0150] 특히 바람직한 양상에서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편은 C-말단이 상기 면역글로불린 Fc 단편에 연결된 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편과 상이하다.
- [0151] 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편은 바람직하게는 링커 모이어티를 통해, 특히 본원에 기재된 임의의 링커 모이어티를 통해 상기 면역글로불린 Fc 단편의 C-말단에 연결된다. 바람직하게는, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편의 N-말단 아미노산 잔기 및 링커 모이어티의 C-말단 아미노산 잔기 사이의 펩타이드 결합을 통해 링커 모이어티에 연결된다.
- [0152] 대안적으로, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편의 N-말단 아미노산 잔기와 상기 면역글로불린 Fc 단편의 C-말단 사이의 펩타이드 결합을 통해 상기 면역글로불린 Fc 단편의 C-말단에 연결되는 것이 바람직할 수 있다.
- [0153] 특히 바람직한 양상에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15 및 서열번호 16으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0154] 바람직하게는, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15 및 서열번호 16으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이다.
- [0155] 본원에 사용된 표현 "아미노산 서열로 이루어진" 또는 "아미노산 서열로 이루어진다"는, 각각, 특히 또한 단백질 또는 단백질 도메인이 발현되는 세포에 의해 영향을 받는 아미노산 서열의 임의의 공동변역 및/또는 번역후 변형 또는 변형들에 관한 것으로 이해된다. 따라서, 본원에 기재된 표현 "아미노산 서열로 이루어진" 또는 "아미노산 서열로 이루어진다"는 각각, 달리 명시적으로 언급되지 않는 한, 단백질 또는 단백질 도메인이 발현되는 세포에 의해 야기되는 하나 이상의 변형, 특히 단백질 생합성 및/또는 단백질 프로세싱에 의해 야기되는 아미노산 잔기의 변형, 바람직하게는 글리코실화, 인산화 및 아세틸화로 이루어진 그룹으로부터 선택된 변형을 갖는 아미노산 서열과 관련된다.
- [0156] 본 발명의 맥락에서 언급된 바와 같은 용어 "적어도 90%"와 관련하여, 상기 용어는 바람직하게는 "적어도 91%", 보다 바람직하게는 "적어도 92%", 보다 더욱 바람직하게는 "적어도 93%" 또는 특히 "적어도 94%"와 관련된 것으로 이해된다.
- [0157] 본 발명의 맥락에서 언급된 바와 같은 용어 "적어도 95%"와 관련하여, 상기 용어는 바람직하게는 "적어도 96%", 보다 바람직하게는 "적어도 97%", 보다 더욱 바람직하게는 "적어도 98%" 또는 특히 "적어도 99%"와 관련된 것으로 이해된다.
- [0158] 본 발명의 맥락에서 언급된 바와 같은 용어 "적어도 99%"와 관련하여, 상기 용어는 바람직하게는 "적어도 99.2%", 보다 바람직하게는 "적어도 99.4%", 보다 더욱 바람직하게는 "적어도 99.6%" 또는 특히 "적어도 99.8%"와 관련된 것으로 이해된다.
- [0159] 보다 구체적으로, 용어 "적어도 99% 서열 동일성"은 99.1 %, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 또는 99.9% 서열 동일성을 지칭한다.
- [0160] 본원에 사용된 용어 "100% 서열 동일성을 갖는"은 용어 "동일하다"와 동등한 것으로 이해된다.
- [0161] 퍼센트 서열 동일성은 당업계에서 인식된 의미를 가지며 두 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열 사이의 동일성을 측정하기 위한 다수의 방법이 있다. 예를 들어, 문헌[Lesk, Ed., *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, Ed., *Biocomputing: Informatics And Genome Projects*, Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., *Computer Analysis Of Sequence Data, Part I*, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, *Sequence Analysis In Molecular Biology*, Academic Press, (1987); and Gribskov & Devereux, Eds., *Sequence Analysis Primer*, M Stockton Press, New York, (1991). Methods for aligning polynucleotides or polypeptides are codified in computer programs, including the

GCG program package (Devereux et al., *Nuc. Acids Res.* 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul et al., *J. Molec. Biol.* 215:403 (1990)), and Bestfit program (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711) which uses the local homology algorithm of Smith and Waterman (*Adv. App. Math.*, 2:482-489 (1981))] 참조. 예를 들어, FASTA 알고리즘을 사용하는 컴퓨터 프로그램 ALIGN은 -12의 갭 오픈 페널티 및 -2의 갭 확장 페널티를 갖는 아핀 갭 검색과 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 목적상, 뉴클레오타이드 서열은 DNASTAR Inc.의 MegAlign 소프트웨어 버전 11.1.0(59), 419의 Clustal W 방법을 사용하여 프로그램에 설정된 디폴트 다중 정렬 매개변수(갭 페널티 = 15.0, 갭 길이 페널티 = 6.66, 지연 발산 서열(delay divergent sequence)(%) = 30%, DNA 전이 중량 = 0.50 및 DNA 중량 매트릭스 = IUB)를 사용하여 정렬되고, 단백질/아미노산 서열은 각각 DNASTAR Inc.의 MegAlign 소프트웨어 버전 11.1.0(59), 419의 Clustal W 방법을 사용하여 프로그램에 설정된 디폴트 다중 정렬 매개변수(갭 페널티 = 10.0, 갭 길이 페널티 = 0.2 및 지연 발산 서열(%) = 30% 인 Gonnet 시리즈 단백질 중량 매트릭스)를 사용하여 정렬된다.

- [0162] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "서열번호 X의 서열과의 서열 동일성"은 용어 "서열번호 X의 길이에 걸쳐 서열번호 X의 서열과의 서열 동일성" 또는 용어 "서열번호 X의 전체 길이에 걸쳐 서열번호 X의 서열과의 서열 동일성"과 각각 동등한 것으로 이해된다. 이와 관련하여, "X"는 "서열번호 X"가 본원에 언급된 임의의 서열번호를 나타내도록 1 내지 25로부터 선택된 임의의 정수이다.
- [0163] 본원에 사용된 바와 같은 표현 "서열번호 [...],... 및 서열번호 [...]로 이루어진 그룹"은 "서열번호 [...]의 서열,... 및 서열번호 [...]의 서열로 이루어진 그룹"과 상호교환 가능하다. 이러한 문맥의 "[...]"는 서열의 번호에 대한 플레이스홀더(placeholder)이다. 예를 들어, 표현 "서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 그룹"은 "서열번호 3의 서열, 서열번호 4의 서열, 서열번호 5의 서열 및 서열번호 6의 서열로 이루어진 그룹"과 상호교환 가능하다.
- [0164] 또 다른 바람직한 특정 양상에 따르면, 본 개시내용의 폴리펩타이드는
- [0165] - 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편, 특히 본원에 기재된 임의의 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편,
- [0166] - 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 N-말단 아미노산 잔기에측접하는 N-말단 메티오닌 잔기, 및
- [0167] - 면역글로불린 Fc 단편, 특히 본원에 기재된 임의의 면역글로불린 Fc 단편으로서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 특히 링커 모이어티를 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결되며, 상기 링커 모이어티는 바람직하게는 본원에 기재된 임의의 링커 모이어티인, 면역글로불린 Fc 단편,
- [0168] - 및 임의로 특히 링커 모이어티를 통해 상기 면역글로불린 Fc 단편의 C -말단에 연결된 로타바이러스 VP8 단백질의 추가 면역원성 단편으로서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편은 바람직하게는 본원에 기재된 임의의 로타바이러스 VP8 단백질의 추가 면역원성 단편이고, 여기서 상기 링커 모이어티는 바람직하게는 본원에 기재된 임의의 링커 모이어티인, 로타바이러스 VP8 단백질의 추가 면역원성 단편
- [0169] 으로 이루어진다.
- [0170] 또 다른 추가의 바람직한 양상에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 본 개시내용의 추가 폴리펩타이드와 이량체를 형성한다. 가장 바람직하게는, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 추가의 동일한 폴리펩타이드와 동종이량체를 형성한다.
- [0171] 따라서, 특히 용어 "본 개시내용의 폴리펩타이드"는 본 개시내용의 2개의 폴리펩타이드로 구성된 임의의 이량체를 추가로 포함하고, 특히 본 개시내용의 2개의 동일한 폴리펩타이드로 구성된 임의의 동종이량체를 포함하는 것으로 특히 이해된다.
- [0172] 또 다른 바람직한 특정 양상에 따르면, 본 개시내용은 복수의 본 개시내용의 폴리펩타이드를 포함하거나 그로 구성된 다량체를 제공하며, 여기서 상기 다량체는 이하에서 "본 개시내용의 다량체"로도 명명된다.
- [0173] 바람직하게는, 본 개시내용의 다량체는 본 개시내용의 하나의 폴리펩타이드와 본 발명의 추가의 동일한 폴리펩타이드에 의해 형성된 동종이량체이다.
- [0174] 특히 용어 "본 개시내용의 다량체"는 본 개시내용의 상이한 다량체의 임의의 혼합물, 예를 들어
- [0175] - 본 개시내용의 하나의 폴리펩타이드와 본 발명의 추가의 동일한 폴리펩타이드에 의해 형성된 동종이량체, 및

- [0176] - 본 개시내용의 동일한 폴리펩타이드 중 2개 초과에 의해 형성된 하나 이상의 다량체
- [0177] 의 혼합물을 추가로 포함하는 것으로 이해된다.
- [0178] 따라서, 특히 바람직한 일례에서, 본 발명의 면역원성 조성물의 성분(i)는
- [0179] - 본 개시내용의 하나의 폴리펩타이드로 이루어진 단량체, 및
- [0180] - 본 개시내용의 2개의 동일한 폴리펩타이드로 이루어진 동종이량체,
- [0181] - 및/또는 임의로 본 개시내용의 3개의 동일한 폴리펩타이드로 이루어진 동종삼량체
- [0182] 중에 존재하고,
- [0183] 여기서, 바람직하게는
- [0184] - 본 개시내용의 상기 2개의 동일한 폴리펩타이드 각각,
- [0185] - 및 임의로 본 발명의 상기 3개의 동일한 폴리펩타이드 각각은
- [0186] 본 개시내용의 상기 하나의 폴리펩타이드와 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0187] 또는, 보다 일반적으로, 본 발명은 또한
- [0188] (i) - 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편, 및
- [0189] - 면역글로불린 Fc 단편
- [0190] 을 포함하는 폴리펩타이드로서,
- [0191] 임의로 상기 폴리펩타이드는 복수의 상기 폴리펩타이드를 포함하거나 그로 구성된 다량체에 포함되는, 폴리펩타이드, 및
- [0192] (ii) 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질
- [0193] 을 포함하는 면역원성 조성물을 포함한다.
- [0194] 상기 폴리펩타이드와 상이한, 본원에 기재된 적어도 하나의 면역원성 물질은 바람직하게는 2개 이상의 면역원성 물질로 이루어지며, 여기서 모든 상기 면역원성 물질은
- [0195] 상기 폴리펩타이드와 상이하고,
- [0196] 서로 상이하다.
- [0197] 따라서, 본 발명의 면역원성 조성물의 성분(ii)은 바람직하게는 2개 이상의 면역원성 물질을 포함하거나 이로 이루어지고, 여기서 각각의 상기 면역원성 물질은 본 발명의 면역원성 조성물의 성분(i)과 상이하고 모든 상기 면역원성 물질은 서로 상이하다.
- [0198] 바람직하게는, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 상기 면역원성 단편과 상이한, 레오바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어진 적어도 하나의 면역원성 물질이다. 따라서, 성분(ii)은 바람직하게는 성분(i)의 상기 면역원성 단편과 상이한, 레오바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어진 적어도 하나의 면역원성 물질이다.
- [0199] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "레오바이러스 항원"은 특히 레오바이러스과에 속하는 바이러스에 특이적인 항체에 의해 인식되는 에피토프를 포함하는 펩타이드 또는 단백질 또는 이의 일부를 지칭한다.
- [0200] 바람직한 일 양상에서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 2개 이상의 면역원성 물질로 이루어지며, 여기서 각각의 상기 물질은 레오바이러스를 포함하거나 이로 이루어지고, 모든 상기 항원은 상기 면역원성 단편과 상이하고 서로 상이하다. 따라서, 성분(ii)은 바람직하게는 2개 이상의 면역원성 물질로 이루어지고, 여기서 각각의 상기 물질은 레오바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어지고, 모든 상기 항원은 성분(i)의 상기 면역원성 단편과 상이하고 서로 상이하다.
- [0201] 또 다른 바람직한 양상에서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 상기 면역원성 단편과 상이한 레오바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어진 적어도 하나의 단백질이다. 따라서, 성분(ii)은 바람직하게는 성분(i)의 상기 면역원성 단편과 상이한 레오바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어진 적어도 하나의

단백질이다.

- [0202] 추가의 바람직한 양상에서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 2개 이상의 단백질로 이루어지며, 여기서 각각의 상기 단백질은 레오바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어지고, 모든 상기 레오바이러스 항원은 상기 면역원성 단편과 상이하고 서로 상이하다. 따라서, 성분(ii)는 바람직하게는 2개 이상의 단백질로 이루어지고, 여기서 각각의 상기 단백질은 레오바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어지고 모든 상기 항원은 성분(i)의 상기 면역원성 단편과 상이하고 서로 상이하다.
- [0203] 바람직하게는, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 상기 면역원성 단편과 상이한, 로타바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어진 적어도 하나의 면역원성 물질이다. 따라서, 성분(ii)은 바람직하게는 성분(i)의 상기 면역원성 단편과 상이한, 로타바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어진 적어도 하나의 면역원성 물질이다.
- [0204] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "로타바이러스 항원"은 특히 로타바이러스과에 속하는 바이러스에 특이적인 항체에 의해 인식되는 에피토프를 포함하는 펩타이드 또는 단백질 또는 이의 일부를 지칭한다.
- [0205] 바람직한 일 양상에서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 2개 이상의 면역원성 물질로 이루어지며, 여기서 각각의 상기 물질은 로타바이러스를 포함하거나 이로 이루어지고, 모든 상기 항원은 상기 면역원성 단편과 상이하고 서로 상이하다. 따라서, 성분(ii)는 바람직하게는 2개 이상의 면역원성 물질로 이루어지고, 여기서 각각의 상기 물질은 로타바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어지고, 모든 상기 항원은 성분(i)의 상기 면역원성 단편과 상이하고 서로 상이하다.
- [0206] 또 다른 바람직한 양상에서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 상기 면역원성 단편과 상이한 로타바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어진 적어도 하나의 단백질이다. 따라서, 성분(ii)는 바람직하게는 성분(i)의 상기 면역원성 단편과 상이한 로타바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어진 적어도 하나의 단백질이다.
- [0207] 추가의 바람직한 양상에서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 2개 이상의 단백질로 이루어지며, 여기서 각각의 상기 단백질은 로타바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어지고, 모든 상기 로타바이러스 항원은 상기 면역원성 단편과 상이하고 서로 상이하다. 따라서, 성분(ii)는 바람직하게는 2개 이상의 단백질로 이루어지고, 여기서 각각의 상기 단백질은 로타바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어지고 모든 상기 항원은 성분(i)의 상기 면역원성 단편과 상이하고 서로 상이하다.
- [0208] 특히 바람직한 양상에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 바람직하게는
- [0209] (i) 상기 폴리펩타이드가 제1 폴리펩타이드이고;
- [0210] (ii) 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 상기 제1 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 추가 폴리펩타이드인
- [0211] 면역원성 조성물이다.
- [0212] 바람직하게는, 상기 적어도 하나의 면역원성 물질은
- [0213] o 상기 면역원성 단편과 상이한 레오바이러스 항원을 포함하거나 이로 이루어진 제2 폴리펩타이드를 포함하거나 이러한 제2 폴리펩타이드이고,
- [0214] 임의로 상기 제1 및 제2 폴리펩타이드 둘 다와 상이한 제3 폴리펩타이드를 포함하고,
- [0215] 임의로 상기 제1 내지 제3 폴리펩타이드 모두와 상이한 제4 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0216] 바람직하게는, 상기 제3 폴리펩타이드는 상기 면역원성 단편 및 제2 폴리펩타이드의 레오바이러스 항원 둘 다와 상이한 레오바이러스 항원을 포함한다.
- [0217] 상기 제4 폴리펩타이드는 바람직하게는
- [0218] - 상기 면역원성 단편,
- [0219] - 제2 폴리펩타이드의 레오바이러스 항원 및
- [0220] - 제3 폴리펩타이드의 레오바이러스 항원

- [0221] 모두와 상이한 레오바이러스 항원을 포함한다.
- [0222] 또 다른 특히 바람직한 양상에서,
- [0223] 본 발명의 면역원성 조성물의 성분(i)은 제1 폴리펩타이드이고
- [0224] 본 발명의 면역원성 조성물의 성분(ii)는 상기 제1 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 추가 폴리펩타이드이고,
- [0225] 여기서 바람직하게는 성분(ii)는
- [0226] - 성분(i)의 상기 면역원성 단편과 상이한 로타바이러스 항원을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하거나 이러한 제2 폴리펩타이드이고,
- [0227] - 바람직하게는 상기 제1 및 제2 폴리펩타이드 둘 다와 상이한 제3 폴리펩타이드를 포함하고,
- [0228] - 임의로 상기 제1 내지 제3 폴리펩타이드 모두와 상이한 제4 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0229] 바람직하게는, 상기 제3 폴리펩타이드는 성분(i)의 상기 면역원성 단편과 제2 폴리펩타이드의 로타바이러스 항원 둘 다와 상이한 로타바이러스 항원을 포함한다.
- [0230] 바람직한 양상에 따르면, 상기 제2 폴리펩타이드는 본원에 기재된 바와 같은 본 개시내용의 임의의 폴리펩타이드이고, 단 상기 제2 폴리펩타이드는 상기 제1 폴리펩타이드와 상이하고,
- [0231] 바람직하게는 상기 제3 폴리펩타이드는 본원에 기재된 바와 같은 본 개시내용의 임의의 폴리펩타이드이고, 단 상기 제3 폴리펩타이드는 상기 제1 및 제2 폴리펩타이드 둘 다와 상이하고,
- [0232] 임의로 상기 제4 폴리펩타이드는 본원에 기재된 바와 같은 본 개시내용의 임의의 폴리펩타이드이고, 단 상기 제4 폴리펩타이드는 상기 제1 내지 제3 폴리펩타이드 모두와 상이하다.
- [0233] 또 다른 바람직한 양상에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 바람직하게는
- [0234] (i) 상기 폴리펩타이드가
- [0235] - 제1 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편, 및
- [0236] - 면역글로불린 Fc 단편
- [0237] 을 포함하는 제1 폴리펩타이드이고;
- [0238] (ii) 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질이
- [0239] - 로타바이러스 VP8 단백질의 제2 면역원성 단편을 포함하는 제2 폴리펩타이드로서, 상기 제2 면역원성 단편은 상기 제1 면역원성 단편과 상이한, 제2 폴리펩타이드
- [0240] - 및 바람직하게는 로타바이러스 VP8 단백질의 제3 면역원성 단편을 포함하는 제3 폴리펩타이드로서, 상기 제3 면역원성 단편은 상기 제1 및 제2 면역원성 단편 둘 다와 상이한, 제3 폴리펩타이드
- [0241] - 및 임의로 로타바이러스 VP8 단백질의 제4 면역원성 단편을 포함하는 제4 폴리펩타이드로서, 상기 제4 면역원성 단편은 상기 제1 내지 제3 면역원성 단편 모두와 상이한, 제4 폴리펩타이드
- [0242] 를 포함하거나 이로 이루어지는 면역원성 조성물이다.
- [0243] 바람직하게는, 상기 제2 내지 제4 면역원성 단편 각각은
- [0244] - 로타바이러스 A VP8 단백질의 면역원성 단편, 특히 로타바이러스 A VP8 단백질의 본원에 기재된 임의의 면역원성 단편,
- [0245] - 로타바이러스 VP8 단백질의 일부, 예컨대 로타바이러스 A VP8 단백질의 일부의 컨센서스 서열, 바람직하게는 컨센서스 서열의 맥락에서 본원에 기재된 로타바이러스 VP8 단백질의 임의의 면역원성 단편, 및
- [0246] - 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편, 특히 본원에 기재된 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편
- [0247] 으로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,

- [0248] 특히, 단 상기 제2 내지 제4 면역원성 단편 모두는 상기 제1 면역원성 단편과 상이하고 서로 상이하다.
- [0249] 보다 구체적으로,
- [0250] 상기 제1 면역원성 단편은 **X7**, **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나
- [0251] 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**, **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나,
- [0252] 상기 제3 면역원성 단편은 **X7**, **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나,
- [0253] 상기 제4 면역원성 단편은 **X7**, **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;
- [0254] 여기서,
- [0255] **X7**은 유전자형 P[7] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 나타내고,
- [0256] **X13**은 유전자형 P[13] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 나타내고,
- [0257] **X6**은 유전자형 P[6] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 나타내고,
- [0258] **XC**는 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편을 나타내고,
- [0259] 특히, 단 상기 제2 내지 제4 면역원성 단편 모두는 상기 제1 면역원성 단편과 상이하고 서로 상이하다.
- [0260] 따라서, 본원에 언급된 바와 같이,
- [0261] "**X7**"은 유전자형 P[7] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 의미하고,
- [0262] "**X13**"은 유전자형 P[13] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 의미하고,
- [0263] "**X6**"은 유전자형 P[6] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 의미하고,
- [0264] "**XC**"는 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편을 의미한다.
- [0265] **X7**은 본원에 언급된 바와 같이, 바람직하게는 서열번호 3의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0266] **X13**은 본원에 언급된 바와 같이, 바람직하게는 서열번호 5의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0267] **X6**은 본원에 언급된 바와 같이, 바람직하게는 서열번호 4의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0268] **XC**는 본원에 언급된 바와 같이, 바람직하게는 서열번호 6의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0269] 특히, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 로타바이러스 VP8 단백질의 제2 면역원성 단편을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하거나 이로 이루어지고,
- [0270] 상기 제1 및 제2 면역원성 단편 각각은 **X7**, **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,
- [0271] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X7**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0272] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X6**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**, **X13** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0273] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X13**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0274] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **XC**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**, **X13** 및 **X6**으로 이루어진 그룹으로부터

선택된다.

- [0275] 보다 구체적으로, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은
- [0276] 로타바이러스 VP8 단백질의 제2 면역원성 단편을 포함하는 제2 폴리펩타이드, 및
- [0277] 로타바이러스 VP8 단백질의 제3 면역원성 단편을 포함하는 제3 폴리펩타이드
- [0278] 를 포함하거나 이로 이루어지고,
- [0279] 상기 제1 내지 제3 면역원성 단편 각각은 **X7**, **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,
- [0280] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X7**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X13**이고, 상기 제3 면역원성 단편은 **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0281] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X6**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**이고 상기 제3 면역원성 단편은 **X13** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0282] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X13**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**이고 상기 제3 면역원성 단편은 **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0283] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **XC**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**이고 상기 제3 면역원성 단편은 **X13** 및 **X6**로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0284] 보다 더욱 구체적으로, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은
- [0285] 로타바이러스 VP8 단백질의 제2 면역원성 단편을 포함하는 제2 폴리펩타이드
- [0286] 로타바이러스 VP8 단백질의 제3 면역원성 단편을 포함하는 제3 폴리펩타이드, 및
- [0287] 로타바이러스 VP8 단백질의 제4 면역원성 단편을 포함하는 제4 폴리펩타이드
- [0288] 를 포함하거나 이로 이루어지고,
- [0289] 여기서, 상기 제1 내지 제4 면역원성 단편 각각은 **X7**, **X6**, **X13** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,
- [0290] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X7**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X13**이고, 상기 제3 면역원성 단편은 **X6**이고 상기 제4 면역원성 단편은 **XC**이고,
- [0291] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X6**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**이고, 상기 제3 면역원성 단편은 **X13**이고 상기 제4 면역원성 단편은 **XC**이고,
- [0292] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X13**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**이고, 상기 제3 면역원성 단편은 **X6**이고 상기 제4 면역원성 단편은 **XC**이고,
- [0293] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **XC**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**이고, 상기 제3 면역원성 단편은 **X13**이고 상기 제4 면역원성 단편은 **X6**이다.
- [0294] 바람직하게는,
- [0295] 본원에 언급된 상기 제1 면역원성 단편은 유전자형 P[7] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편(**X7**)이고/이거나,
- [0296] 본원에 언급된 상기 제2 면역원성 단편은 유전자형 P[13] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편(**X13**)이고/이거나,
- [0297] 본원에 언급된 상기 제3 면역원성 단편은 유전자형 P[6] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편(**X6**)이고/이거나,
- [0298] 본원에 언급된 상기 제4 면역원성 단편은 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편(**XC**)이고/이거나.
- [0299] 가장 바람직하게는, 상기 제1 면역원성 단편은 유전자형 P[7] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편(**X7**)이고,
- [0300] 상기 제2 면역원성 단편은 유전자형 P[13] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편(**X13**)이고,

- [0301] 상기 제3 면역원성 단편은 유전자형 P[6] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편(X6)이고,
- [0302] 임의로 상기 제4 면역원성 단편은 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편(XC)이다.
- [0303] 바람직하게는,
- [0304] 상기 제1 면역원성 단편은 서열번호 3의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고
- [0305] 상기 제2 면역원성 단편은 서열번호 5의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고,
- [0306] 상기 제3 면역원성 단편은 서열번호 4의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고,
- [0307] 임의로, 상기 제4 면역원성 단편은 서열번호 6의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0308] 또 다른 바람직한 양상에서,
- [0309] 본원에 언급된 바와 같은 상기 제1 폴리펩타이드는 R7, R13, R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나,
- [0310] 본원에 언급된 바와 같은 상기 제2 폴리펩타이드는 R7, R13, R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나,
- [0311] 상기 제3 폴리펩타이드는 R7, R13, R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나,
- [0312] 상기 제4 폴리펩타이드는 R7, R13, R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;
- [0313] 여기서,
- [0314] R7은 서열번호 12로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고,
- [0315] R13은 서열번호 14로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고,
- [0316] R6은 서열번호 13로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고,
- [0317] RC는 서열번호 15로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고,
- [0318] 특히, 단, 상기 제2 내지 제4 폴리펩타이드 모두는 상기 제1 폴리펩타이드와 상이하고 서로 상이하다.
- [0319] 바람직하게는, 상기 제1 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 로타바이러스 VP8 단백질의 제2 폴리펩타이드를 포함하거나 이로 이루어지고,
- [0320] 상기 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은 R7, R13, R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,
- [0321] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R7인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R13, R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0322] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R6인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7, R13 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0323] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R13인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7, R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

- [0324] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 RC인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7, R13 및 R6으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0325] 특히, 상기 제1 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은
- [0326] 제2 폴리펩타이드, 및
- [0327] 제3 폴리펩타이드
- [0328] 를 포함하거나 이로 이루어지고
- [0329] 상기 제1 내지 제3 폴리펩타이드 각각은 R7, R13, R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,
- [0330] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R7인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R13이고 상기 제3 폴리펩타이드는 R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0331] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R6인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고 상기 제3 폴리펩타이드는 R13 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0332] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R13인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고 상기 제3 폴리펩타이드는 R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0333] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 RC인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고 상기 제3 폴리펩타이드 R13 및 R6으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0334] 보다 구체적으로, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은
- [0335] 제2 폴리펩타이드, 및
- [0336] 제3 폴리펩타이드, 및
- [0337] 제4 폴리펩타이드
- [0338] 를 포함하거나 이로 이루어지고,
- [0339] 여기서, 상기 제1 내지 제4 폴리펩타이드 각각은 R7, R6, R13 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,
- [0340] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R7인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R13이고, 상기 제3 폴리펩타이드는 R6이고, 상기 제4 폴리펩타이드는 RC이고,
- [0341] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R6인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고, 상기 제3 폴리펩타이드는 R13이고, 상기 제4 폴리펩타이드는 RC이고,
- [0342] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R13인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고, 상기 제3 폴리펩타이드는 R6이고, 상기 제4 폴리펩타이드는 RC이고,
- [0343] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 RC인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고, 상기 제3 폴리펩타이드는 R13이고, 상기 제4 폴리펩타이드는 R6이다.
- [0344] 바람직한 양상에 따르면,
- [0345] 본원에 언급된 상기 제1 폴리펩타이드는 서열번호 12의 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고,
- [0346] 본원에 언급된 상기 제2 폴리펩타이드는 서열번호 14, 서열번호 13 및 서열번호 15로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고,
- [0347] 바람직하게는 본원에 언급된 상기 제3 폴리펩타이드는 서열번호 14, 서열번호 13 및 서열번호 15로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고,

- [0348] 임의로, 본원에 언급된 상기 제4 폴리펩타이드는 서열번호 14, 서열번호 13 및 서열번호 15로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이다.
- [0349] 특히,
- [0350] (i) 서열번호 12의 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질, 및
- [0351] (ii) 서열번호 14, 서열번호 13 및 서열번호 15로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질
- [0352] 을 포함하는 본 발명의 면역원성 조성물이 바람직하다.
- [0353] 가장 특히,
- [0354] (i) 서열번호 12로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질, 및
- [0355] (ii) 서열번호 14로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질, 및
- [0356] 서열번호 13으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질
- [0357] 및 임의로 서열번호 15로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질
- [0358] 을 포함하는 본 발명의 면역원성 조성물이 바람직하다.
- [0359] 본 발명의 면역원성 조성물은 바람직하게는 각각의 성분(i) 및 성분(ii)의 물질(들)을 적어도 100 nM, 바람직하게는 적어도 250 nM, 보다 바람직하게는 적어도 500 nM, 및 가장 바람직하게는 적어도 1 μ M의 농도로 포함한다.
- [0360] 다른 바람직한 양상에 따르면, 본 발명의 면역원성 조성물은 각각의 성분 (i) 및 성분(ii)의 물질(들)을 100 nM 내지 50 μ M, 바람직하게는 250 nM 내지 25 μ M, 및 가장 바람직하게는 1 내지 10 μ M의 농도로 함유한다.
- [0361] 특히 1 mL 또는 경우에 따라 2 mL의 본 발명의 면역원성 조성물이 대상체에게 투여된다. 따라서, 대상체에게 투여될 본 발명의 면역원성 조성물의 용량은 바람직하게는 1 mL 또는 2 mL의 용적을 갖는다.
- [0362] 바람직하게는 상기 면역원성 조성물의 1회 용량 또는 2회 용량이 대상체에게 투여된다.
- [0363] 본 발명의 면역원성 조성물은 바람직하게는 전신으로 또는 국소적으로 투여된다. 통상적으로 사용되는 적합한 투여 경로는 비경구 또는 경구 투여, 예컨대 근육내, 피내, 정맥내, 복강내, 피하, 비강내뿐만 아니라 흡입 투여이다. 그러나, 화합물의 성질 및 작용 방식에 따라, 상기 면역원성 조성물은 다른 경로로도 투여될 수 있다. 면역원성 조성물이 근육내로 투여되는 것이 가장 바람직하다. 본 발명의 면역원성 조성물은 바람직하게는 약제학적으로 또는 수의학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다.
- [0364] 본원에 사용된 "약제학적으로 또는 수의학적으로 허용되는 담체"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 안정화제, 희석제, 보존제, 항세균제 및 항진균제, 등장화제, 흡착 지연제 등을 포함한다. 일부 바람직한 실시형태 및 특히 동결건조된 면역원성 조성물을 포함하는 실시형태에서, 본 발명에서 사용하기 위한 안정화제는 동결 건조 또는 동결-건조를 위한 안정화제를 포함한다.
- [0365] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 보조제(adjuvant)를 함유한다.

- [0366] 본원에 사용된 "보조제"는 수산화알루미늄 및 인산알루미늄, 사포닌, 예를 들어, Quil A, QS-21(Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100(Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), 유중수 에멀전, 수중유 에멀전, 수중유중수 에멀전을 포함할 수 있다. 에멀전은 특히 경질 액체 파라핀 오일(유럽 약전 유형); 스쿠알란 또는 스쿠알렌과 같은 이소프레노이드 오일; 알켄, 특히 이소부텐 또는 데센의 올리고머화로부터 생성된 오일; 선형 알킬기를 함유하는 산 또는 알코올의 에스테르, 보다 구체적으로 식물성 오일, 에틸 올레이트, 프로필렌 글리콜 디-(카프릴레이트/카프레이트), 글리세릴 트리-(카프릴레이트/카프레이트) 또는 프로필렌 글리콜 디올레이트; 분지형 지방산 또는 알코올의 에스테르, 특히 이소스테아르산 에스테르에 기반할 수 있다. 오일은 유화제와 함께 사용되어 에멀전을 형성한다. 유화제는 바람직하게는 비이온성 계면활성제, 특히 소르비탄의 에스테르, 만나이드의 에스테르(예를 들어, 안하이드로만니톨 올레이트), 글리콜의 에스테르, 폴리글리세롤의 에스테르, 프로필렌 글리콜의 에스테르, 및 임의로 에톡실화된 올레산, 이소스테아르산, 리시놀레산 또는 하이드록시스테아르산의 에스테르, 및 폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌 공중합체 블록, 특히 플루로닉(Pluronic) 제품, 특히 L121이다. 문헌[Hunter et al., The Theory and Practical Application of Adjuvants (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), JohnWiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) and Todd et al., Vaccine 15:564-570 (1997)]을 참조한다. 예시적인 보조제는 문헌["Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" edited by M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995]의 147페이지에 기재된 SPT 에멀전 또는 동일한 문헌의 183페이지에 기재된 에멀전 MF59이다.
- [0367] 보조제의 추가 예는 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체 및 말레산 무수물과 알케닐 유도체의 공중합체로부터 선택된 화합물이다. 유리한 보조제 화합물은 특히 당 또는 폴리알코올의 폴리알케닐 에테르와 가교결합된 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체이다. 이들 화합물은 카보머(carbomer)라는 용어로 알려져 있다(Phameuropa Vol. 8, No. 2, June 1996). 당업자는 또한 적어도 3개, 바람직하게는 8개 이하의 하이드록실기를 가지며 적어도 3개의 하이드록실기의 수소 원자가 적어도 2개의 탄소 원자를 갖는 불포화 지방족 라디칼로 대체되어 있는 폴리하이드록실화 화합물과 가교결합된 이러한 아크릴계 중합체를 기재하는 미국 특허 제2,909,462호를 참조할 수 있다. 바람직한 라디칼은 2개 내지 4개의 탄소 원자, 예를 들어 비닐, 알릴 및 기타 에틸렌성 불포화기를 함유하는 것들이다. 불포화 라디칼 자체는 메틸과 같은 다른 치환체를 함유할 수 있다. CARBOPOL®이라는 명칭으로 판매되는 제품; (BF Goodrich, 미국 오하이오주)이 특히 적합하다. 이들은 알릴 수크로스 또는 알릴 펜타에리트리톨과 가교결합되어 있다. 이들 중에서 카보폴(Carbopol) 974P, 934P 및 971P를 언급할 수 있다. CARBOPOL® 971P를 사용하는 것이 가장 바람직하다. 말레산 무수물과 알케닐 유도체의 공중합체 중에는, 말레산 무수물과 에틸렌의 공중합체인 공중합체 EMA(Monsanto)가 있다. 이들 중합체를 물에 용해시키는 것은 면역원성, 면역학적 또는 백신 조성물 자체가 혼입될 보조제 용액을 제공하기 위해, 바람직하게는 생리학적인 pH로 중화될 산성 용액을 유도한다.
- [0368] 보조제가 선택될 수 있는 추가의 적합한 보조제는 다른 많은 것들 중에서 RIBI 보조제 시스템(Ribi Inc.), 블록 공중합체(CytRx, 조지아주 애틀랜타), SAF-M(Chiron, 캘리포니아주 에머리빌), 모노포스포릴 지질 A, 아브리딘 지질-아민 보조제, 이. 콜라이로부터의 열-불안정 장독소(재조합체 또는 기타), 콜레라 독소, IMS 1314 또는 무라밀 디펩타이드, 또는 천연 발생 또는 재조합 사이토킨 또는 이의 유사체 또는 내인성 사이토킨 방출 자극제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0369] 보조제는 용량당 약 100 μ g 내지 약 10mg의 양, 바람직하게는 용량당 약 100 μ g 내지 약 10mg의 양, 보다 바람직하게는 용량당 약 500 μ g 내지 약 5mg의 양, 보다 더욱 바람직하게는 용량당 약 750 μ g 내지 약 2.5mg의 양, 및 가장 바람직하게는 용량당 약 1mg의 양으로 첨가될 수 있는 것으로 예상된다. 대안적으로, 보조제는 최종 생성물의 용적을 기준으로 약 0.01% 내지 50%의 농도, 바람직하게는 약 2% 내지 30%의 농도, 보다 바람직하게는 약 5% 내지 25%의 농도, 보다 더욱 바람직하게는 약 7% 내지 22%의 농도, 및 가장 바람직하게는 10% 내지 20% 농도일 수 있다.
- [0370] "희석제"는 물, 염수, 텍스트로스, 에탄올, 글리세롤 등을 포함할 수 있다. 등장화제는 특히 염화나트륨, 텍스트로스, 만니톨, 소르비톨 및 락토스를 포함할 수 있다. 안정화제는 특히 알부민 및 에틸렌디아민테트라아세트산의 알칼리 염을 포함한다.
- [0371] 특히 바람직한 양상에 따르면, 본 발명은 또한 면역원성 조성물, 특히 본 발명의 면역원성 조성물을 제공하며, 여기서 상기 면역원성 조성물은
- [0372] - 성분(i),

- [0373] - 성분(ii),
- [0374] - 약제학적으로 또는 수의학으로 허용되는 담체 또는 부형제,
- [0375] - 및 임의로 보조제
- [0376] 를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0377] 본 발명의 맥락에서 보조제는 바람직하게는 유화된 수중유 보조제 및 카보머로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0378] 용어 "면역원성 조성물"은 면역원성 조성물이 투여되는 숙주에서 면역학적 반응을 유도하는 적어도 하나의 항원을 포함하는 조성물을 지칭한다. 이러한 면역학적 반응은 본 발명에 따른 면역원성 조성물에 대한 세포 및/또는 항체-매개 면역 반응일 수 있다. 숙주는 "대상체"로도 기재된다. 바람직하게는, 본원에 기재되거나 언급된 임의의 숙주 또는 대상체는 동물이다.
- [0379] 본원에 사용된 용어 "동물"은 특히 포유동물, 바람직하게는 돼지(swine), 보다 바람직하게는 돼지(pig), 가장 바람직하게는 자돈(piglet)과 관련된다.
- [0380] 일반적으로, "면역학적 반응"은 하기 효과 중 하나 이상을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 본 발명의 면역원성 조성물에 포함된 항원 또는 항원들에 대해 특이적으로 유도되는 항체, B 세포, 헬퍼 T 세포, 억제 T 세포 및/또는 세포독성 T 세포 및/또는 감마-델타 T 세포의 생성 또는 활성화. 바람직하게는, 숙주는 보호 면역학적 반응 또는 치료 반응을 나타낼 것이다.
- [0381] "보호 면역학적 반응"은 감염된 숙주가 일반적으로 나타내는 하나 이상의 임상 징후의 감소 또는 결여, 더 빠른 회복 시간 및/또는 감염성 지속 시간의 감소 또는 감염된 숙주의 조직 또는 체액 또는 배설물의 병원체 역가의 감소로 입증될 것이다.
- [0382] 본원에 언급된 "병원체" 또는 "특정 병원체"는 특히 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편이 유래된 로타바이러스와 관련된다. 예를 들어, 본원에 언급된 바와 같은 병원체는 로타바이러스 A 또는 로타바이러스 C 이다.
- [0383] 숙주가 새로운 감염에 대한 저항성이 강화되고/되거나 질환의 임상적 중증도가 감소되도록 보호 면역학적 반응을 나타내는 경우, 면역원성 조성물은 "백신"으로서 기재된다.
- [0384] 본원에 기재된 바와 같은 "항원"은 이러한 항원 또는 이의 면역학적 활성 성분을 포함하는 관심 면역원성 조성물 또는 백신에 대해 숙주의 면역학적 반응을 유발하는 성분을 지칭하지만, 이에 제한되지 않는다. 특히, 본원에 사용된 용어 "항원"은 숙주에 투여되는 경우 숙주에서 면역학적 반응을 유발할 수 있는 단백질 또는 단백질 도메인을 의미한다.
- [0385] 용어 "치료 및/또는 예방"은 무리에서 특정 병원체 감염 발생률의 감소 또는 특정 병원체 감염에 의해 유발되거나 이와 관련된 하나 이상의 임상 징후의 중증도의 감소를 지칭한다. 따라서, 용어 "치료 및/또는 예방"은 또한 특정 병원체로 감염되는 무리 내의 동물 수의 감소(= 특정 병원체 감염 발생률의 감소) 또는 동물 그룹에서 병원체 감염에 의해 유발되거나 이와 정상적으로 관련된 하나 이상의 임상 징후의 중증도의 감소를 지칭하고, 이 동물은 본원에 제공된 면역원성 조성물을 투여받지 않은 동물의 그룹과 비교하여 본원에 제공된 면역원성 조성물의 유효량을 투여받은 동물이다.
- [0386] "치료 및/또는 예방"은 일반적으로 본 발명의 면역원성 조성물의 유효량을 이러한 치료/예방을 필요로 하거나 이로부터 이익을 얻을 수 있는 대상체 또는 대상체 무리에게 투여하는 것을 포함한다. 용어 "치료"는 대상체 또는 무리의 적어도 일부 동물이 이러한 병원체에 이미 감염되었고 이러한 동물이 이러한 병원체 감염에 의해 유발되거나 이와 관련된 일부 임상 징후를 나타낼 때 면역원성 조성물의 유효량을 투여하는 것을 의미한다. 용어 "예방"은 대상체가 병원체에 감염되기 전 또는 적어도 이러한 동물 또는 동물 그룹의 모든 동물이 이러한 병원체에 의한 감염에 의해 유발되거나 이와 관련된 하나 이상의 임상 징후를 나타내지 않는 경우에 대상체에게 투여하는 것을 의미한다.
- [0387] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 대상체에서 면역 반응을 유발하거나 유발할 수 있는 항원, 특히 본 발명의 폴리펩타이드(들)의 양을 의미하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 유효량은 무리에서 특정 병원체 감염의 발생을 감소시키거나 특정 병원체 감염의 하나 이상의 임상 징후의 중증도를 감소시킬 수 있다. 바람직하게는, 하나 이상의 임상 징후는, 본 발명 이전에 이용 가능했던 면역원성 조성물로 치료를 받지 않았거나 치료를 받았지만 이후에 특정 병원체로 감염된 대상체와 비교하여, 발생률 또는 중증도가 적어도 10%, 보다 바람직하게는 적어도

20%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 30%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 40%, 보다 더욱 더 바람직하게는 적어도 50%, 더욱 바람직하게는 적어도 60%, 더욱 바람직하게는 적어도 70%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 및 가장 바람직하게는 적어도 95% 감소된다.

- [0388] 본원에 사용된 용어 "임상 징후"는 특정 병원체로 인한 대상체의 감염 징후를 지칭한다. 감염의 임상 징후는 선택된 병원체에 따라 다르다. 이러한 임상 징후의 예에는 설사, 구토, 열, 복통 및 탈수가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0389] 대상체에서 특정 병원체 감염에 의해 유발되거나 이와 관련된 하나 이상의 임상 징후의 발생률 감소 또는 중증도 감소는 본 발명의 면역원성 조성물의 1회 이상의 용량을 대상체에게 투여함으로써 달성될 수 있다.
- [0390] 용어 "분변 배출 감소"는 대변 mL당 로타바이러스와 같은 병원성 바이러스의 RNA 카피 수 또는 대변의 데시리터당 플라크 형성 콜로니 수의 감소를 의미하지만, 이에 제한되지 않으며, 본 발명의 조성물을 투여받지 않고 감염되었을 수 있는 대상체와 비교하여 본 발명의 조성물을 투여받은 대상체의 대변에서 적어도 50% 감소된다. 보다 바람직하게는, 분변 배출 수준은 본 발명의 조성물을 투여받은 대상체에서 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 99.9%, 보다 바람직하게는 적어도 99.99%, 및 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99.999% 감소된다.
- [0391] 본원에 사용된 용어 "분변 배출"은 의학 및 바이러스학에서 일반적인 통상의 의미에 따라 사용되며 바이러스가 대상체의 세포로부터 생성되어 감염된 대상체의 대변을 통해 감염된 대상체의 환경으로 방출되는 것을 의미한다.
- [0392] 본 개시내용의 폴리펩타이드는 바람직하게는 재조합 단백질, 특히 재조합 배큘로바이러스(baculovirus) 발현된 단백질이다.
- [0393] 본원에 사용된 용어 "재조합 단백질"은, 특히 재조합 DNA 기술에 의해 생산되는 단백질을 지칭하며, 여기서 일반적으로 발현된 단백질을 코딩하는 DNA는 적합한 발현 벡터에 삽입되고, 이는 숙주 세포를 형질전환시키거나 바이러스 벡터의 경우 숙주 세포를 감염시켜 이중 단백질을 생산하는 데 사용된다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "재조합 단백질"은 특히 재조합 DNA 분자로부터 발현되는 단백질 분자를 지칭한다. 본원에 사용된 "재조합 DNA 분자"는 분자 생물학적 기술에 의해 함께 결합된 DNA 세그먼트로 구성된 DNA 분자를 지칭한다. 재조합 단백질의 생산에 적합한 시스템은 곤충 세포(예를 들어, 배큘로바이러스), 원핵생물 시스템(예를 들어, 에스케리키아 콜라이), 진균(예를 들어, 마이셀리오프토라 써모필(*Myceliophthora thermophila*), 아스페르길루스 오리제(*Aspergillus oryzae*), 우스틸라고 메이디스(*Ustilago maydis*)), 효모(예를 들어, 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)), 포유동물 세포(예를 들어, 차이니스 햄스터 난소, HEK293), 식물(예를 들어, 잇꽃), 해조류, 조류 세포, 양서류 세포, 어류 세포 및 무세포 시스템(예를 들어, 토끼 망상적혈구 용해물)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0394] 또 다른 양상에 따르면, 본 개시내용은 본 개시내용의 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하며, 여기서 이하에서 "본 개시내용에 따른 폴리뉴클레오타이드"로도 명명된 상기 폴리뉴클레오타이드는 바람직하게는 단리된 폴리뉴클레오타이드이다.
- [0395] 바람직하게는, 본 개시내용에 따른 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20 및 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0396] 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드의 제조는 당업계의 기술 범위 내에 있으며, 그 중에서도 문헌[Sam brook *et al.*, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Amusable, *et al.*, 2003, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Innis *et al.* (eds), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; and Erlich (ed), 1994, PCR Technology, Oxford University Press, New York]에 기재된 재조합 기술에 따라 수행될 수 있으며, 상기 문헌 모두는 본원에 참조로 인용된다.
- [0397] 또 다른 추가 양상에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0398] "벡터" 및 "본 개시내용의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 벡터"는, 본 발명의 목적상, 적합한 발현 벡터, 바람직하게는 배큘로바이러스 발현 벡터를 지칭하며, 이는 숙주 세포를 형질전환시

키거나 배콜로바이러스 발현 벡터의 경우 숙주 세포를 감염시켜 DNA에 의해 코딩되는 단백질 또는 폴리펩타이드를 생산하는 데 사용된다. 발현을 위한 벡터(또는 재조합체)의 제조 및/또는 사용을 위한 벡터 및 방법은 하기에 개시된 방법에 의해 만들거나 수행할 수 있거나 유사할 수 있다: 미국 특허 번호 4,603,112, 4,769,330, 5,174,993, 5,505,941, 5,338,683, 5,494,807, 4,722,848, 5,942,235, 5,364,773, 5,762,938, 5,770,212, 5,942,235, 382,425, PCT 공보 WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018; 문헌[Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update," PNAS USA 93: 11349-11353, October 1996; Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93: 11341-11348, October 1996; Smith et al.], US 특허번호 4,745,051 (재조합 배콜로바이러스); 문헌[Richardson, C. D. (Editor), Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.); Smith et al., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", Molecular and Cellular Biology, December, 1983, Vol. 3, No. 12, p. 2156-2165; Pennock et al., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector," Molecular and Cellular Biology March 1984, Vol. 4, No. 3, p. 406]; EPA0 370 573; 1986년 10월 16일자로 출원된 미국 출원번호 920,197; EP 특허 공개 번호 265785; 미국 특허 번호 4,769,331 (재조합 헤르페스바이러스); 문헌[Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93:11307-11312, October 1996; Andreansky et al., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93: 11313-11318, October 1996; Robertson et al., "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", PNAS USA 93: 11334-11340, October 1996; Frolov et al., "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications," PNAS USA 93: 11371-11377, October 1996; Kitson et al., J. Virol. 65, 3068-3075, 1991]; 미국 특허 번호 5,591,439, 5,552,143; WO 98/00166; 특허결정된 미국 출원번호 08/675,556 및 08/675,566 (둘 다 1996년 7월 3일에 출원)(재조합 아데노바이러스); 문헌[Grunhaus et al., 1992, "Adenovirus as cloning vectors," Seminars in Virology (Vol. 3) p. 237-52, 1993; Ballay et al. EMBO Journal, vol. 4, p. 3861-65, Graham, Tibtech 8, 85-87, April, 1990; Prevec et al., J. Gen Virol. 70, 42434; PCT WO 91/11525; Felgner et al. (1994), J. Biol. Chem. 269, 2550-2561, Science, 259: 1745-49, 1993; and McClements et al., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93: 11414-11420, October 1996]; 및 미국 특허 번호 5,591,639, 5,589,466 및 5,580,859 및 WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660; 문헌[Tang et al., Nature, and Furth et al., Analytical Biochemistry, relating to DNA expression vectors, inter alia]. 또한, WO 98/33510; Ju et al., Diabetologia, 41: 736-739, 1998 (렌티바이러스 발현 시스템); Sanford et al., 미국 특허 번호 4,945,050; Fischbach et al. (Intracel); WO 90/01543; Robinson et al., Seminars in Immunology vol. 9, pp. 271-283 (1997), (DNA 벡터 시스템); Szoka et al., 미국 특허 번호 4,394,448 (DNA를 살아있는 세포에 삽입하는 방법); McCormick et al., 미국 특허 번호 5,677,178 (세포변성 바이러스의 사용); 및 미국 특허 번호 5,928,913 (유전자 전달용 벡터); 및 여기에 인용된 다른 문헌도 참조한다.

[0399] 바람직한 바이러스 벡터는 특허 생산 세포가 곤충 세포인 경우 바콜로골드 (BaculoGold)(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)와 같은 배콜로바이러스를 포함한다. 배콜로바이러스 발현 시스템이 바람직하지만, 상기 기재된 것들을 포함하는 다른 발현 시스템도 본 발명의 목적, 즉 재조합 단백질의 발현을 위해 작동할 것이 당업자에 의해 이해된다.

[0400] 따라서, 본 개시내용은 또한 본 발명의 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 배콜로바이러스를 제공한다. 이하에서 "본 개시내용에 따른 배콜로바이러스"로도 명명된 상기 배콜로바이러스는 바람직하게는 단리된 배콜로바이러스이다.

[0401] 또한, 따라서 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드, 바람직하게는 발현 벡터를 제공한다. 이하에서 "본 개시내용에 따른 플라스미드"로도 명명된 상기 플라스미드 특허 단리된 플라스미드이다.

[0402] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 배콜로바이러스에 의해 감염되고/되거나 이를 함유하는 세포, 또는 본 개시내용의 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드, 바람직하게는 발현 벡터를 제공한다. 이하에서 "본

개시내용에 따른 세포"로도 명명된 상기 세포는 바람직하게는 단리된 세포이다.

- [0403] 단리된 세포의 맥락에서 사용될 때 용어 "단리된"은 사람의 손에 의해 이의 천연 환경과 떨어져 존재하고 따라서 자연의 산물이 아닌 세포를 의미한다.
- [0404] 또 다른 양상에서, 본 발명은 또한 약제, 바람직하게는 백신의 제조를 위한 본 발명의 면역원성 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0405] 이러한 맥락에서, 본 발명은 또한 본 발명의 면역원성 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 방법은 세포, 바람직하게는 곤충 세포를 본 발명에 따른 배칼로바이러스로 감염시키는 단계를 포함한다.
- [0406] 추가로, 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 폴리펩타이드를 제조하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 방법은 세포를 본 개시내용에 따른 플라스미드로 형질감염시키는 단계를 포함한다.
- [0407] 본 개시내용의 폴리펩타이드는 바람직하게는 백신접종에 사용될 수 있는 바이러스 유사 입자의 안정한 자가-어셈블리에 충분한 높은 양으로 발현된다.
- [0408] 본원에 사용된 용어 "백신접종" 또는 "백신접종하는"은 면역원성 조성물에 포함된 항원과 같은 항원을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 과정을 의미하지만, 이에 제한되지 않으며, 여기서 상기 항원, 예를 들어 본 개시내용의 폴리펩타이드는 상기 대상체에게 투여될 때 상기 대상체에서 보호 면역학적 반응을 유발하거나 유발할 수 있다.
- [0409] 본 발명은 또한 약제, 바람직하게는 백신으로서 사용하기 위한 본 발명의 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0410] 특히, 본 발명의 면역원성 조성물은 로타바이러스 감염에 의해 야기되는 하나 이상의 임상 징후 또는 질환을 감소시키거나 예방하는 방법에 사용하기 위해 제공되며, 여기서 로타바이러스는 바람직하게는 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 코딩하는 게놈을 갖는 그룹의 로타바이러스이다. 본 발명의 면역원성 조성물은 특히 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 분변 배출을 감소시키거나 예방하는 방법에 사용하기 위해 제공되며, 여기서 상기 바이러스는 바람직하게는 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 코딩하는 게놈을 갖는 그룹의 로타바이러스이다. 따라서, 특정 일례에서, 본원에 언급된 바와 같은 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편이 로타바이러스 A의 게놈에 의해 코딩되는 경우, 본 발명의 면역원성 조성물은 로타바이러스 A 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후, 사망률, 분변 배출 또는 질환을 감소시키거나 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다.
- [0411] 보다 구체적으로, 본 발명의 면역원성 조성물은 대상체에서 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후, 사망률 또는 분변 배출을 감소시키거나 예방하는 방법에 사용하기 위해 또는 대상체에서 로타바이러스 감염을 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위해 제공된다.
- [0412] 본원에서 언급된 바와 같은 로타바이러스 감염은 특히 로타바이러스 A 또는 로타바이러스 C에 의한 감염을 의미한다.
- [0413] 또한, 본 발명의 면역원성 조성물은 대상체에서 로타바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 사용하기 위해 제공된다.
- [0414] 본원에서 언급된 대상체는, 바람직하게는 돼지 또는 소와 같은 포유동물 또는 닭과 같은 조류이다. 특히, 대상체는 돼지이고, 여기서 돼지는 자돈 또는 모돈, 예컨대 임신한 모돈인 것이 바람직하다. 가장 바람직하게는, 대상체에서 로타바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 맥락에서, 상기 대상체는 임신한 모돈이다. 대상체에서 로타바이러스 감염에 의해 유발된 하나 이상의 임상 징후, 사망률 또는 분변 배출을 감소시키거나 예방하거나, 대상체에서 로타바이러스 감염을 치료 또는 예방하는 맥락에서, 상기 대상체는 가장 바람직하게는 자돈이다.
- [0415] 하나의 바람직한 양상에 따르면, 본 발명의 면역원성 조성물은 자돈에서 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후, 사망률 또는 분변 배출을 감소시키거나 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이며, 여기서 자돈은 면역원성 조성물이 투여된 모돈에 의해 수유될 것이다. 면역원성 조성물이 투여된 상기 모돈은, 바람직하게는 상기 모돈이 특히 상기 자돈을 임신한 동안 면역원성 조성물을 투여받은 모돈이다.
- [0416] 또한, 본 발명은 본 발명의 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 로타바이러스 감염의 치료 또는 예방, 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후, 사망률 또는 분변 배출의 감소, 예방 또는 치료, 또는 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료를 위한 방법에 관한 것이다.

- [0417] 또한, 바람직하게는 임신한 모돈에서 로타바이러스에 특이적인 항체의 생산을 유도하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 본 발명의 면역원성 조성물을 상기 모돈에 투여하는 것을 포함한다.
- [0418] 또한, 본 발명은 자돈에서 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후, 사망률 또는 분변 배출을 감소시키거나 예방하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 방법은
- [0419] - 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명에 따른 면역원성 조성물을 모돈에게 투여하는 단계, 및
- [0420] - 상기 모돈이 상기 자돈에게 수유하도록 허용하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 모돈은 바람직하게는 특히 상기 돼지를 임신한 모돈이다.
- [0421] 바람직하게는, 상기 두 가지 방법은
- [0422] - 본 발명의 면역원성 조성물을 상기 자돈을 임신한 모돈에게 투여하는 단계,
- [0423] - 상기 모돈이 상기 자돈을 출산하도록 하는 단계, 및
- [0424] - 상기 모돈이 상기 자돈에게 수유하도록 허용하는 단계
- [0425] 를 포함한다.
- [0426] 또한, 자돈에서 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후, 사망률 또는 분변 배출을 감소시키는 방법이 제공되며, 여기서 상기 자돈은 본 발명의 면역원성 조성물을 투여받은 모돈에 의해 수유된다.
- [0427] 본원에 언급된 바와 같은 하나 이상의 임상 징후는 바람직하게는
- [0428] - 설사,
- [0429] - 로타바이러스 콜로니화(colonization), 특히 장관의 로타바이러스 콜로니화,
- [0430] - 병변, 특히 육안적 병변, 및
- [0431] - 1일 평균 체중 증가량 감소
- [0432] 로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0433] 일례에 따르면, 본원에 언급된 하나 이상의 임상 징후는 장관, 특히 소장의 로타바이러스 콜로니화이다. 또 다른 예에 따르면, 본원에 언급된 하나 이상의 임상 징후는 장 병변, 특히 거시적 장 병변이다.
- [0434] 또 다른 특히 바람직한 양상에 따르면, 본 발명의 면역원성 조성물은 임의의 상기 기재된 방법에서 사용하기 위한 것이며, 여기서
- [0435] - 상기 로타바이러스 감염은 유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 의한 감염이거나,
- [0436] - 상기 로타바이러스에 의한 감염은 유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 의한 감염이거나,
- [0437] - 상기 로타바이러스에 대한 면역 반응은 유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 대한 면역 반응이거나,
- [0438] - 로타바이러스에 특이적인 상기 항체는 유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 특이적인 항체이고,
- [0439] 바람직하게는 본 발명의 상기 면역원성 조성물은 특히 서열번호 3의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 유전자형 P[7] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 포함하는 본원에 기재된 본 개시내용의 임의의 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0440] 하나의 특정 양상에서, 본원에 언급된 바와 같은 "유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 의한 감염"은 유전자형 P[23] 로타바이러스에 의한 감염이다.
- [0441] 다른 바람직한 양상에서, 본원에 언급된 바와 같은 "유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 의한 감염"은 유전자형 P[23] 로타바이러스 및 유전자형 P[7] 로타바이러스에 의한 감염이다.

- [0442] 특정 일 양상에서, 본원에 언급된 바와 같은 "유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 대한 면역 반응"은 유전자형 P[23] 로타바이러스에 대한 면역 반응이다.
- [0443] 다른 바람직한 양상에서, 본원에 언급된 바와 같은 "유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 대한 면역 반응"은 유전자형 P[23] 로타바이러스 및 유전자형 P[7] 로타바이러스에 대한 면역 반응이다.
- [0444] 한 특정 양상에서, 본원에 언급된 바와 같은 "유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 특이적인 항체"는 유전자형 P[23] 로타바이러스에 특이적인 항체이다.
- [0445] 또 다른 바람직한 양상에서, 본원에 언급된 바와 같은 "유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 특이적인 항체"는 유전자형 P[23]에 특이적인 항체 및 유전자형 P[7]에 특이적인 항체를 포함하거나 이러한 항체이다.
- [0446] 추가의 양상에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 동물, 바람직하게는 임신한 모돈에서 로타바이러스 C에 특이적인 항체의 생산을 유도하기 위해 투여된다. 바람직하게는 이러한 추가 양상에서, 본 발명의 상기 면역원성 조성물은 각각, 특히 서열번호 15의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편을 포함하는 본원에 기재된 본 개시내용의 임의의 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0447] 본 발명은 추가로 본 발명의 면역원성 조성물을 제조하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 방법은 세포를 본 발명의 플라스미드로 형질감염시키는 것을 포함한다.
- [0448] 추가로, 본 발명의 면역원성 조성물을 제조하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 방법은 세포, 바람직하게는 곤충 세포를 본 개시내용의 배클로바이러스로 감염시키는 것을 포함한다.
- [0449] 또한, 본 발명은 본 발명의 면역원성 조성물의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 방법은
- [0450] (a) 배양물 중의 감수성 세포를 본 개시내용의 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터로 감염되도록 허용하는 단계로서, 상기 폴리펩타이드는 상기 벡터에 의해 발현되는, 단계;
- [0451] (b) 이후 상기 폴리펩타이드를, 특히 상기 배양된 세포의 상청액 중에서 회수하는 단계로서, 바람직하게는 세포 파편은 바람직하게는 적어도 하나의 필터, 바람직하게는 2개의 필터를 통한 미세 여과를 포함하는 분리 단계를 통해 상기 폴리펩타이드로부터 분리되고, 상기 적어도 하나의 필터는 바람직하게는 약 $1\mu\text{m}$ 내지 약 $20\mu\text{m}$ 및/또는 약 $0.1\mu\text{m}$ 내지 약 $4\mu\text{m}$ 의 공극 크기를 갖는, 단계;
- [0452] (c) 단계(b)의 혼합물에 이원 에틸렌이민(BEI)을 첨가하여 상기 벡터를 불활성화시키는 단계;
- [0453] (d) 단계(c)로부터 생성된 혼합물에 티오황산나트륨을 첨가하여 BEI를 중화하는 단계; 및
- [0454] (e) 약 5 kDa 내지 약 100 kDa, 바람직하게는 약 10 kDa 내지 약 50 kDa의 분자량 컷오프를 갖는 필터 막을 갖는 필터를 사용하는 여과 단계에 의해 상기 혼합물로부터 액체의 일부를 제거함으로써 단계(d)로부터 생성된 혼합물 중에서 폴리펩타이드를 농축시키는 단계를 포함하고,
- [0455] 상기 방법은
- [0456] (f) 단계(e) 후에 잔류하는 혼합물을 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질과 혼합하는 단계; 및
- [0457] (g) 임의로 단계(f) 후에 잔류하는 혼합물을 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제, 희석제, 부형제 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 추가 성분과 혼합하는 단계
- [0458] 를 포함하거나,
- [0459] 상기 방법은
- [0460] (f) 단계(e) 후에 잔류하는 혼합물을 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제, 희석제, 부형제 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 추가 성분과 혼합하는 단계 및
- [0461] (g) 단계(f) 후에 잔류하는 혼합물을 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질과 혼합하는 단계

- [0462] 를 포함한다.
- [0463] 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질, 특히 본원에 기재된 임의의 것과의 상기 혼합을 위해,
- [0464] 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질, 또는
- [0465] 성분(ii)가
- [0466] 각각 사용된다.
- [0467] 상기 방법의 단계(a)에서, 상기 세포는 바람직하게는 곤충 세포이고 상기 벡터는 바람직하게는 본 개시내용의 배큘로바이러스이다.
- [0468] 상기 방법의 단계(b)에서, 상기 폴리펩타이드는 가장 바람직하게는 세포 내부로부터가 아니라 상기 배양된 세포의 상청액에서 회수된다.
- [0469] 또한, 본 발명은 본 발명의 면역원성 조성물, 및 본원에 기재된 임의의 방법에서의 상기 면역원성 조성물의 용도를 제공하며, 여기서 상기 면역원성 조성물은 진술한 본 발명의 면역원성 조성물의 제조 방법에 의해 수득 가능하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0470] 실시예
- [0471] 하기 실시예는 단지 본 개시내용을 설명하기 위한 것이다. 어떤 식으로든 청구범위를 제한하지 않는다.
- [0472] 실시예 1
- [0473] 융합 단백질의 설계, 제조 및 테스트:
- [0474] 작제물 설계:
- [0475] 로타바이러스 A VP4 서열은 원래 돼지 분변 샘플에서 수득하였고, 이는 GenBank 서열 JX971567.1과 가장 근접하게 일치하며 P[7] 유전자형으로서 분류된다. 이하에서 "AVP8"로도 명명된 VP4 아미노산 57-224(서열번호 3)를 사용하였고, 이는 P8 단백질의 렉틴-유사 도메인에 상응하지만 8개의 아미노산 잔기만큼 연장된 N-말단을 갖는다. 링커 모이어티는 Gly-Gly-Ser(서열번호 9)이다. 돼지 IgG Fc 서열(서열번호 7)은 IgG 중쇄 불변 전구체(GenBank 서열 BAM75568.1)의 아미노산 242-470과 일치한다. AVP8, Gly-Gly-Ser 링커 및 돼지 IgG Fc 서열을 코딩하고 모든 코돈에 대해 최적화된 IDT Gblock을 수령하였고(서열번호 17), 본원에서 AVP8-IgG Fc로 명명하였다. AVP8-IgG Fc에 의해 코딩된 단백질(서열번호 12)은 본원에서 "AVP8-IgG Fc 단백질"로도 명명된다.
- [0476] 클로닝, 발현 및 정제:
- [0477] AVP8-IgG Fc를 TOPO 클로닝하고 이어서 BamHI 및 NotI 제한 부위를 사용하여 배큘로바이러스 전달 플라스미드 pVL1393에 삽입한 다음, BaculoGold와 함께 Sf9 세포에 공동 형질감염시켜 재조합 배큘로바이러스를 생성하였다. AVP8-IgG Fc 단백질의 생산은 하기와 같이 수행하였다: 3L 스피너 플라스크 내의 1L의 Sf+ 세포를 4DPI 수거된 소모 배지로 0.2MOI에서 감염시키고, 15,000g에서 20분 동안 원심분리하고, 0.2 μ m 여과하였다. 1mL의 MabSelect SuRE LX 수지 슬러리(GE Healthcare, cat# 17-5474-01)를 첨가하고 적당히 교반하면서 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 수지를 여과에 의해 재포획하고, 4x10mL Gentle Binding Buffer(Pierce, cat# 21012)로 세척하고, 7x5mL 용적의 Gentle Elution Buffer(Pierce, cat# 21027)로 용출하였다. 분획들을 합하고 4℃에서 1회 완충액 교환으로 3.5L TBS에 대해 투석하였다. BCA 검정(Thermo Scientific, cat# 23227)을 수행하여 농도(80 μ g/mL)를 결정하였다.
- [0478] 혈청학 연구:
- [0479] 단백질-A 정제된 AVP8-IgG Fc 단백질을 87.5% 항원 및 12.5% 보조제와 함께 에멀시젠 D를 이용하여 제형화하였다. 생후 약 7주령의 돼지는 2mL 용량을 목 옆에 IM으로 투여받았고, 21일 후에 부스트를 투여받았다. 혈청 샘플을 7주 동안 매주 수집하였다. AVP8-IgG Fc 단백질로 백신접종된 돼지의 혈청을, 하기("ELISA를 위한 프로토콜") 기재된 바와 같은 ELISA(도 1) 및 하기("바이러스 중화 검정을 위한 프로토콜") 기재된 바와 같은 바이러스 중화 검정(도 2)에 의해 평가하였다. 비관련 백신 대조군과 비교하여, AVP8-IgG Fc 단백질로 백신접종된 돼지의 IgG ELISA 결과는 SP 비의 증가가 14일차에 정점에 이르렀고 21일차에 부스트 후 다시 증가하였음을 보여

주었다. 바이러스 중화 역가도 유사하게 7일 및 14일차에 증가를 나타낸 후, 21일차 부스트 후 28일차에 제2 정점에 이르렀다.

[0480] *ELISA를 위한 프로토콜*

[0481] IgA ELISA의 경우, 중간 단백질 결합 96웰 ELISA 플레이트를 1x PBS에 1:16 희석된 전체 로타바이러스 항원으로 코팅하였다. 플레이트를 4℃의 온도에서 밤새 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 1x PBST를 사용하여 세척한 다음, 37℃에서 1시간 동안 카제인 차단 용액으로 차단하였다. 세척 후, 차단 완충액에 1:40의 최종 희석비까지 희석된 100 μ L의 1차 항체를 플레이트에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 웰을 홀스-래디쉬 퍼옥시다제(HRP)-접합된 염소-항-돼지-IgA의 1:3200 희석액 100 μ L로 코팅하고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 플레이트를 실온에서 15분 동안 3,5,3',5'-테트라메틸벤지딘으로 발색시키고 450nm에서 광학 밀도(OD) 측정 전에 1N HCl로 반응을 정지시켰다. 양성 및 음성 대조군을 포함하는 샘플을 중복 웰에서 실행하고 결과를 (샘플 - 음성 대조군)-대-(양성 - 음성 대조군) 비(S-N)/(P-N)의 평균으로서 보고하였다.

[0482] IgG ELISA의 경우, 중간 단백질 결합 96웰 ELISA 플레이트를 1x PBS에 1:8 희석된 전체 로타바이러스 항원으로 코팅하였다. 플레이트를 4℃의 온도에서 밤새 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 1x PBST를 사용하여 세척한 다음, 37℃에서 1시간 동안 블로팅 등급 차단 용액으로 차단하였다. 세척 후, 차단 완충액에 1:625의 최종 희석비까지 희석된 100 μ L의 1차 항체를 플레이트에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 웰을 홀스-래디쉬 퍼옥시다제(HRP)-접합된 염소-항-돼지-IgG의 1:8000 희석액 100 μ L로 코팅하고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 플레이트를 실온에서 10분 동안 3,5,3',5'-테트라메틸벤지딘으로 발색시키고 450nm에서 광학 밀도(OD) 측정 전에 1N HCl로 반응을 정지시켰다. 양성 및 음성 대조군을 포함하는 샘플을 중복 웰에서 실행하고 결과를 (샘플 - 음성 대조군)-대-(양성 - 음성 대조군) 비(S-N)/(P-N)의 평균으로서 보고하였다.

[0483] *바이러스 중화 검정을 위한 프로토콜*

[0484] 모든 혈청 및 모유 샘플을 56℃에서 30분 동안 열 불활성화시켰다. 샘플을 로타바이러스 성장 배지(MEM + 2.5% HEPES + 0.3% 트립토스 포스페이트 브로스 + 0.02% 효모 + 10 μ g/mL 트립신)에 1:40 내지 1:2,560까지 연속 희석하였다. 로타바이러스 A 단위물(역가 7.0 log TCID₅₀/mL)을 로타바이러스 성장 배지에 1:25,000 희석하였다. 총 200 μ L의 희석된 혈청을 200 μ L의 희석된 바이러스에 첨가하였다; 상기 혼합물을 37℃ $\pm$ 5% CO₂에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 성장 배지는 MA104 세포가 식종(planting)된 3 내지 4일 된 96웰 플레이트로부터 무균적으로 제거하였다. 인큐베이션 후, 200 μ L의 바이러스-혈청 혼합물을 세포 배양 플레이트로 옮겼다. 세포를 37℃ $\pm$ 5% CO₂에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 스톱 및 희석된 바이러스를 사용 당일에 적정하여 검정에서 사용된 희석비를 확인하였다. 인큐베이션 후, 상청액을 폐기하고 플레이트를 200 μ L/웰 1X PBS로 1회 세척하였다. 고정을 위해, 100 μ L/웰의 50%/50% 아세톤/메탄올을 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 15분 동안 인큐베이션하고, 공기 건조시킨 다음, 100 μ L/웰 1X PBS로 재수화시켰다. 1차 항체(토끼 항-로타바이러스 A 폴리클로날 혈청, 내부적으로 생성됨)를 1X PBS에 1:1000 희석하였다. 100 μ L/웰의 희석된 1차 항체를 첨가하고 플레이트를 37℃ $\pm$ 5% CO₂에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 100 μ L/웰의 1X PBS로 2회 세척하였다. 2차 항체(Jackson ImmunoResearch FITC 표지된 염소-항-토끼 IgG cat# 111-095-003)를 1X PBS에 1:100 희석하였다. 100 μ L/웰의 희석된 2차 항체를 첨가하고 플레이트를 37℃ $\pm$ 5% CO₂에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 100 μ L/웰의 1X PBS로 2회 세척하였다. 플레이트를 자외선 현미경을 사용하여 형광의 존재에 대해 판독하였다. 검정은 희석된 바이러스의 역가(Reed-Muench 방법을 사용하여 생성됨)가 2.8 $\pm$ 0.5 log TCID₅₀/mL인 것으로 밝혀진 경우 유효한 것으로 간주되었다. 또한, 기지의 양성 및 음성 샘플을 각 분석에 대조군으로서 포함시켰다. 혈청 역가는 염색이 관찰되지 않은 가장 높은 희석비로서 보고하였다.

[0485] **실시예 2**

[0486] 시험감염 연구:

[0487] 본 연구의 주요 목적은 AVP8-IgG Fc 단백질(서열번호 12)을 포함하는, 본원에서 "IgG:AVP8"로도 명명된 프로토타입 백신 및 본원에서 "위약"으로 명명된 비관련 대조군 백신을 통상의 모돈에게 투여하는 것이 병독성 로타바이러스 A 시험감염에 대한 수동 보호를 돼지에게 부여하는지 여부를 평가하는 것이었다. 또한, 비교를 위해, 본원에서 "상업적 제품" 또는 "상업적 백신"으로도 명명된 시판 MLV 로타바이러스 백신(ProSystem® Rota, Merck

Animal Health)을 본 연구에 사용하였다. 프로토타입 백신은 상기 실시예 1에 기재된 제조와 유사하게 제조되었지만, 하기 "IgG:AVP8의 제조" 섹션에 기재된 바와 같이 감염에 사용된 상이한 용적 및 더 긴 인큐베이션 기간이 사용되었다. 상업적 제품은 백신 ProSystem® TGE/Rota용으로 제조업체가 제공한 라벨 지침서(용량 및 사용법뿐만 아니라 돼지의 경구 백신접종을 위한 권장 방법)에 따라 사용하였다.

[0488] 총 16마리의 모돈이 연구에 포함되었다. 모돈은 하기 표 1에 기재된 바와 같이 3개의 처리군 및 1개의 엄격한 대조군으로 무작위 배정하였다. T02 및 T04의 모돈은 3개의 방 사이에 섞어 놓았다. T06 및 T07의 모돈은 2개의 별도의 방에 수용하였다. 모든 모돈은 표 1에 열거된 적절한 경로를 통해 적절한 물질로 백신접종하였다. T07의 모돈은 비-백신접종된 상태로 유지되었다(엄격한 대조군). 백신접종 기간 전반에 걸쳐 주기적으로 모돈로부터 혈청을 수집하고 혈청전환의 증거에 대해 검정하였다. 분만 전에 분변 샘플을 수집하고 RT-qPCR로 스크리닝하여 어미(dam)가 분만 전에 활발하게 로타바이러스를 배출하지 않았는지 확인하였다. 전반적 건강 관찰을 각 모돈에 대해 매일 기록하였다. 분만은 모돈이 임신 114일에 도달할 때까지 자연적으로 발생하도록 허용하였다. 이 시간 이후에는 분만을 유도하였다. 자돈은 분만 시 시험에 등록하였다. 출생 시 건강한 자돈에만 태그를 달고, 시설 표준 운영 절차에 따라 처리하고, 시험에 포함시켰다. 돼지가 생후 0 내지 5일령일 때, 채혈하고, 분변 샘플을 수집하고, 돼지를 시험감염시켰다(T07 제외). 시험감염 시점에, 돼지에게 위내 5mL 용량의 중탄산나트륨을 투여한 다음, 위내 5mL 용량의 시험감염 물질을 투여하였다. 시험감염 기간 내내, 모든 동물은 장 질환(설사 및 행동 변화)의 존재에 대해 매일 모니터링하였다. 분변 샘플을 시험감염 기간 전반에 걸쳐 주기적으로 수집하였다. 시험감염 2일 후(DPC 2), 각 동물자로부터의 자돈의 약 1/3을 안락사시켰다. 안락사 후, 부검을 수행하고 돼지를 육안적 병변에 대해 평가하였다. 현미경 및 면역조직학적 평가를 위해 장관 절편을 수집하였다. RT-qPCR 평가를 위해 장관 샘플을 수집하였다. DPC 21에서, 나머지 모든 돼지를 청량하고 채혈하고 분변 샘플을 수집하였다. 샘플 수집 후, 돼지를 안락사시켰다. 돼지를 육안적 병변에 대해 평가하고 장관 샘플을 수집하였다.

표 1

표 1: 연구 설계

그룹	N (모돈)	N (자돈)	방	모돈 백신접종 (분만 6 주 전 및 2 주 전)		자돈 시험감염 (DPC0; 생후 0 내지 5 일령)	부검
				설명	경로/용량*		
T02	6	57	방 115, 116 및 117 사이에 섞임	위약	2mL IM + 2mL IN	조직 균질물 1:2 희석액 위내 1 mL 용량	DPC2에서 부검한 1/3 마리 돼지; DPC21에서 잔류 돼지
T04	5	46		IgG:AVP8	2mL IM		
T06	2	22	118	상업적 백신	분만 5 주 전 및 2 주 전에 경구 2mL + 분만 1 주 전에 2mL IM		
T07	3	27	114	엄격한 대조군	해당 없음	없음	해당 없음

* IM= 근육내, IN= 비강내

연구 전반에 걸쳐, T07(엄격한 대조군)의 모돈의 혈청 VN 역가는 일정한 또는 저하된 상태를 유지하였으며, 이는 노출 부족 및 유효한 연구를 나타낸다(바이러스 증화는 실시예 1("바이러스 증화 검정에 대한 프로토콜")에

기재된 바와 같이 평가하였으며, 결과는 도 3에 도시한다). 백신접종 단계 동안, 혈청 중 가장 높은 중앙값 VN 역가는 IgG:AVP8(T04) 프로토타입 백신으로 백신접종된 모돈에서 관찰되었다. 상기 그룹에서, 분만 6주 전에 투여된 1회 용량은 D14까지 T04(IgG:AVP8)의 3/5마리 동물에서 4배 이상 증가된 역가를 초래하였다. 돼지 시험감염 시기 전에, T04(IgG:AVP8)의 5/5마리 동물은 역가가 4배 이상 증가하였다. 위약 그룹(T02)의 모돈은 백신접종 단계 동안 혈청 VN 역가의 유의미한 증가(< 2배)가 없었다. T06(상업적 백신)의 모돈은 D35까지 혈청 VN 역가에서 유의미한 증가(< 2배)가 없었다. 돼지 시험감염 시기 전에, T06(상업적 백신)의 두 마리 모돈 모두는 역가가 4배 증가하였다. 시험감염 물질에 대한 측면 노출 후, T02(위약) 및 T06(상업적 백신)의 모돈에서 VN 혈청 역가가 증가하였다. 반대로, T04(IgG:AVP8)의 모돈에서 VN 혈청 역가는 4/5마리 모돈에서 일정하거나 감소된 상태를 유지하였다. 초유 및 모유 VN 역가와 관련하여, 그룹 T04(IgG:AVP8)에서 VN 역가는 분만 시 가장 높았고, 시험감염 전 샘플에서 감소했으며, 시험감염 후 샘플에서 더욱 감소하였다. 위약 그룹(T02)에서, VN 역가는 분만 및 시험감염 전에서 낮았지만 시험감염 물질에 대한 측면 노출 후에는 증가하였다.

[0492] 시험감염 전 돼지 혈청 중의 VN 역가는 T04(IgG:AVP8)의 대부분의 돼지에서 높았으며(>1280), 이는 모돈에서 돼지로의 수동 면역 전달을 나타낸다. 반대로, T02(위약) 및 T06(상업적 백신)의 돼지에서 대부분의 역가는 낮았다(<1280).

[0493] 시험감염 단계 내내, T02(위약)에서 가장 높은 사망률이 관찰되었으며 8/57마리(14.0%)의 돼지가 사망하였다. 반대로, T04(IgG:AVP8)에서는 1/46마리(2.2%)의 돼지만이 사망하였고, T06(상업적 백신)에서는 1/22마리(4.5%)의 돼지가 사망하였으며, T07(엄격한 대조군)에서는 1/27마리(3.7%)의 돼지가 사망하였다. 연구 전반에 걸쳐 T07(엄격한 대조군)의 돼지에서 설사의 임상 징후는 관찰되지 않았다. T02(위약)의 돼지에서 설사의 임상 징후는 시험감염 후(DPC) 1일 또는 2일에 시작하였고 대부분의 동물에서 DPC10까지 해결되었다. 전반적으로, 설사의 임상적 징후는 T02(위약)의 동물의 44/57마리(77.2%)에서 연구 동안 적어도 1회 관찰되었다. 이들 44마리 동물 중, 29마리(65.9%)의 동물에서 설사가 심각한 것으로 간주되었다. 대조적으로, 설사의 임상 징후는 T04(IgG:AVP8)의 돼지에서 감소되었다. 하기 표 2의 그룹별 임상 설사 결과의 요약을 참조한다.

표 2

표 2: 그룹별 비정상적 설사가 있는 동물의 백분율(지금까지)

그룹	지금까지의 비정상 *	지금까지의 중증도 **
T02- 위약	44/57 (77.2%)	29/44 (65.9%)
T04- IgG:AVP8	15/46 (32.6%)	8/15 (53.3%)
T06- 상업적 백신	13/22 (59.1%)	10/13 (76.9%)
T07- 엄격한 대조군	0/27 (0.0%)	해당 없음

[0494]

[0495] *연구 동안 적어도 1회 1점 또는 2점을 받은 돼지를 그룹당 돼지의 총 수로 나눈 값을 포함한다

[0496] **연구 동안 적어도 1회 2점을 받은 돼지를 지금까지 비정상인 돼지의 총 수로 나눈 값을 포함한다

[0497] 시험감염 전에, RT-qPCR에 의한 로타바이러스 A RNA의 검출이 없었으며, 이는 유효한 연구를 나타낸다. 또한, 연구 전반에 걸쳐 T07(엄격한 대조군)의 모돈 또는 돼지에서 RT-qPCR에 의한 로타바이러스 A RNA의 검출이 없었다. 시험감염 후 돼지에서, 배출은 T02(위약)에서 가장 만연하였다. 대부분의 돼지에서, 배출은 DPC1-3에서 시작하여 DPC14까지 계속되었다. 가장 흥미로운 것은 T02(위약) 및 T06(상업적 백신)과 비교하여 T04(IgG:AVP8)에서 관찰된 배출의 감소였다. 배출 백분율 및 검출된 RNA의 중앙값 양은 둘 다 감소하였다(연구일별 분변 중 그룹 중앙값 log 로타바이러스 A RNA 게놈 카피(gc)/mL에 대해서는 도 4를 참조한다); 테스트는 하기 기재된 바와 같이 수행하였다("로타 A qRT-PCR를 위한 프로토콜").

[0498] 각 그룹으로부터 무작위로 선택된 돼지 하위세트를 안락사시키고 DPC2에 부검하였다. 육안적 장 병변(얇은 벽,

가스 팽창된 소장, 순수한 액체 함량 등), 현미경적 병변(위축성 장염) 및 면역조직화학(IHC)에 의한 로타바이러스 A 특이적 염색의 존재에 대해 돼지를 평가하였다. 하기 표 3은 부검 시 장 병변이 있는 돼지의 수를 그룹별로 제시한다. 위약 그룹(T02)의 돼지 중 84.2%(16/19)가 육안적 병변을 갖고 그 중 63.2%(12/19)가 염색되었기 때문에 시험감염은 성공적인 것으로 간주되었다. 가장 흥미로운 것은 T04(IgG:AVP8)의 1/15마리 돼지에서만 동물에서 로타바이러스 A 염색의 결여였다. 또한, T04(IgG:AVP8)에서는 T02(위약) 및 상업적 제품(T06)과 비교하여 육안적 병변이 있는 돼지의 백분율이 감소되었다.

표 3

표 3. 그룹별 부검 시 장 병변 및 IHC 염색이 있는 동물의 백분율.

그룹	DPC2 에서 장 병변*	DPC2 에서 IHC 염색**			
		% 양성	1 점 마릿수	2 점 마릿수	3 점 마릿수
T02- 위약	16/19 (84.2%)	12/19 (63.2%)	2/12 (16.7%)	2/12 (16.7%)	8/12 (66.6%)
T04- IgG:AVP8	4/15 (26.7%)	1/15 (6.7%)	0/1 (0.0%)	0/1 (0.0%)	1/1 (100.0%)
T06- 상업적 백신	4/8 (50.0%)	4/8 (50.0%)	3/4 (75.0%)	1/4 (25.0%)	0/4 (0.0%)
T07- 엄격한 대조군	해당 없음 [§]	해당 없음 [§]			

[0499]

[0500] *DPC2에서 장 병변이 있는 돼지의 수를 DPC2에서 부검한 총 돼지 수로 나눈 값을 나타냄

[0501] ** 점수 1 = 용모의 <10%가 항원을 함유, 점수 2 = 용모의 10% 내지 50%가 항원을 함유, 점수 3 = 용모의 >50%가 항원을 함유

[0502] [§] T07의 돼지는 부검되지 않았으므로 해당 없음

[0503] 평균 1일 체중 증가량은 생존한 돼지에 대해 계산하였으며(kg) 하기 표 4에 제시한다. T04(IgG:AVP8)의 돼지에서 ADWG의 가장 높은 수치적 이점이 관찰되었다. 백신접종 후 ADWG의 증가는 T02(위약)와 비교하여 유의미하게 상이하였다.

표 4

표 4.그룹별 평균 1 일 평균 체중 증가량(kg)(표준 편차).

그룹	ADWG (kg) 평균 (표준 편차)
T02- 위약	0.15 (0.13)
T04- IgG:AVP8	0.25 (0.08)
T06- 상업적 백신	0.22 (0.11)
T07- 엄격한 대조군	0.23 (0.07)

[0504]

[0505]

결론적으로, 분만 6주 전 및 2주 전에 통상의 모돈을 IgG:AVP8 프로토타입 백신(서열번호 12의 폴리펩타이드 포함)으로 백신접종하는 것은 모돈 혈청 및 초유에서 높은 중화 항체 역가를 유도한다. 이러한 중화 항체는 백신 접종된 모돈의 돼지 혈청에서 높은 역가(>1280)의 검출에 의해 입증된 바와 같이 출생 후 돼지에게 수동 전달되었다. 돼지에서 높은 중화 항체 역가의 존재는 임상적 보호를 유도한다. 특히, 백신접종된 모돈에서 태어난 돼지는 위약 대조군 및 시판 백신에서 태어난 돼지에 비해 로타바이러스 A RNA의 분변 배출이 감소되고, 사망률이 감소되고, 설사의 임상 징후가 감소되고, DPC2에서 로타바이러스 A 콜로니화가 감소되고, DPC2에서 육안적 병변이 감소되고 ADWG이 증가되었다.

[0506]

로타 A qRT-PCR를 위한 프로토콜

[0507]

분변 샘플에서 로타바이러스 A RNA를 결정하기 위해, 정량적 1단계 RT-PCR 키트(iTaq Universal One-Step RT-PCR 키트; BioRad, 카탈로그 번호 1725140)를 검정을 위해 사용하였다. 프라이머 및 프로브 정보에 대해서는 하기 표 5를 참조한다.

표 5

표 5: 프라이머 (F/R) 및 프로브 (Pr1/Pr2) 정보

명칭	서열	크기	위치
RVA F	5'-GCT AGG GAY AAA ATT GTT GAA GGT A-3' (SEQ ID NO:22)	25	40..64
RVA R	5'-ATT GGC AAA TTT CCT ATT CCT CC-3' (SEQ ID NO:23)	23	145..167
RVA Pr1	5'-FAM-ATG AAT GGA AAT GAY TTT CAA AC-MGB-3' (SEQ ID NO:24)	23	121..143
RVA Pr2	5'-FAM-ATG AAT GGA AAT AAT TTT CAA AC-MGB-3' (SEQ ID NO:25)	23	121..143

[0508]

[0509]

실시간 RT-PCR을 5 µl의 추출된 총 핵산, 1 µl의 각 프로브(5 µM), 1 µl의 각 프라이머(10 µM), 10 µl의 2X RT-PCR 믹스, 0.5 µl의 iScript 역전사 효소 및 0.5 µl의 DEPC-처리된 물을 포함하는 20 µl 반응에서 수행하였다. 상기 반응은 하기 조건 하에 CFX96 실시간 PCR 검출 시스템(BioRad)을 사용하여 수행하였다: 50℃에서 10분

동안 초기 역전사 후, 95℃에서 3분 동안 초기 변성, 95℃에서 15초 동안 40사이클의 변성 및 60℃에서 45초 동안 어닐링 및 연장. 상대적 정량 데이터를 생성하기 위해, 2개의 로타바이러스 A g-블록의 연속 희석액을 각 실행에 포함시켰다. 동일한 양의 각 g-블록을 시작 농도로서 5.0×10^7 게놈 카피/ μL 를 사용하여 실행에 포함시켰다. 광학 데이터는 CFX Manager 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 각 결정에 대해, 사이클 임계값(C_t) 결정 모드에 대한 회귀 설정을 사용하여 임계값 라인이 자동으로 계산되었다. 기준선 차감(subtraction)은 기준선 차감 모드를 사용하여 자동으로 수행되었다. 기준선 종결 값이 10 미만인 곡선은 수동으로 보정되었다.

[0510] *IgG:AVP8의 제조*

[0511] 5L 진탕기 플라스크에서 약 1×10^6 세포/mL의 농도의 2L의 Sf+(스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)) 세포를 로타바이러스 A VP8 코어-돼지 IgG Fc 융합 단백질(BaculoGold(BG))/pVL1393-AVP8-IgG; 1.18×10^8 TCID₅₀/mL)를 함유하는 1.7mL의 재조합 배칼로바이러스 스톡으로 감염시켰다. 상기 진탕기 플라스크를 $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 90rpm에서 일정하게 교반하면서 5일 동안 인큐베이션하였다. 세포 및 배지를 3x1L 원심분리기 병으로 무균적으로 옮기고 세포를 4℃에서 20분 동안 10,000g으로 펠렛화하였다. 생성된 상청액을 0.2 μm 필터(Thermo Scientific, cat# 567-0020)에 통과시킨 다음, 2.5mL의 MabSelect SuRe LX 단백질 A 수지(GE Healthcare cat# 17-5474-01)와 함께 적당히 교반하면서 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 수지를 0.2 μm 여과(Thermo Scientific, cat# 567-0020)로 회수한 다음, 12x10mL 용적의 Gentle Ag/Ab Binding Buffer(Thermo Scientific, cat# 21012)으로 세척하였다. AVP8-IgG는 7x10mL 용적의 Gentle Ag/Ab Elution Buffer(Thermo Scientific, cat# 21027)을 사용하여 수지로부터 용출시켰다. AVP8-IgG는 1회의 완충액 교환으로 3.5L의 20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl에 대해 투석하였다. 잔류 배칼로바이러스를 37℃에서 24시간 동안 5mM BEI로 불활성화시켰다. 생성된 물질을 1x PBS(Gibco cat# 10010-023)에서 목표 농도 70 $\mu\text{g/mL}$ 까지 희석하였다. 희석된 물질을 12.5% 에멀시젠 D로 제형화하였다.

[0512] **실시예 3**

[0513] 혈청학 연구:

[0514] 본 연구의 주요 목적은 AVP8-IgG Fc 단백질 (서열번호 12)을 포함하는 프로토타입 백신 및 본 명세서에서 "위약"으로 명명된 대조군 백신을 통상의 모돈에게 투여하는 것이 로타바이러스 A에 대한 혈청학적 반응을 생성하는지 여부를 평가하는 것이었다. 본원에서 "IgG-AVP8"로도 명명된 프로토타입 백신(보조제로서 에멀시젠 D 또는 카보폴(Carbopol)을 포함함, 하기 표 7A 및 7B 참조)은 상기 실시예 1 및 2에 기재된 제조와 유사하게 제조되었지만, 하기 "백신 제조: *IgG-AVP8*" 섹션에 기재된 바와 같이 감염에 사용된 상이한 용적 및 더 긴 인큐베이션이 사용되었다.

[0515] 총 20마리의 모돈이 연구에 포함되었다. 모돈을 하기 표 6에 기재된 바와 같이 4개의 처리군으로 무작위 배정하였다. 모돈은 연구 전반에 걸쳐 섞여 놓았다. 모든 모돈은 표 4에 열거된 바와 같이 D0 및 D21에 적절한 물질로 근육내로 백신접종하였다. 혈청을 연구 전반에 걸쳐 주기적으로 모돈로부터 수집하고 바이러스 중화 검정에 의해 혈청전환의 증거에 대해 검정하였다. 전반적 건강 관찰을 각 모돈에 대해 매일 기록하였다. 연구는 D42에 종료하였다.

표 6

표 6: 연구 설계

그룹	N	D0 및 D21 에 IM* 백신접종에 사용되는 재료	혈액 수집 날짜	연구 종료
T02	8	IgG-AVP8 / 에멀시젠 D	D0, 7, 14, 21, 28, 35, 42	D42
T03	8	IgG-AVP8 / 카보폴		
T06	2	위약 / 에멀시젠 D		
T07	2	위약 / 카보폴		

*IM = 근육내

연구 전반에 걸쳐, T06 및 T07(위약 그룹)의 모돈에서 혈청 VN 역가는 일정한 또는 저하된 상태를 유지하였으며, 이는 노출 부족 및 유효한 연구를 나타낸다(바이러스 중화는 증가된 희석이 1:40 내지 1:40,960 까지로 평가된 변형으로 실시예 1("바이러스 중화 검정을 위한 프로토콜")에 기재된 바와 같이 평가됨). 백신접종 단계 동안, IgG-AVP8/에멀시젠 D(T02) 및 IgG-AVP8/카보폴(T03) 프로토타입 백신으로 백신접종된 모돈은 역가가 상당히 증가하였다(> 4배). 두 그룹(T02 및 T03)의 경우, 그룹 평균 역가는 1회 백신접종 후 640 이상이었고 연구 기간 전반에 걸쳐 640 이상을 유지하였다. 대조적으로, 위약 그룹(T06 및 T07)의 모돈은 연구 전반에 걸쳐 혈청 VN 역가에서 유의미한 증가(< 2배)를 나타내지 않았다.

결론적으로, 분만 6주 전 및 2주 전에 통상의 모돈을 IgG-AVP8 프로토타입 백신(서열번호 12의 폴리펩타이드 포함)으로 백신접종하면 모돈 혈청에서 높은 중화 항체 역가가 유도된다.

백신 제조: IgG-AVP8

10L 자르토리우스 비오슈타트(Sartorius Biostat) B 유리 재킷 용기에서 1.00×10^6 세포/mL의 Sf+ 세포 8L를 MOI 0.22에 대해 15mL의 BG/pVL1393-AVP8-IgG, 1.19×10^8 TCID₅₀/mL로 감염시켰다. 생물반응기는 27°C에서 100 rpm 교반 및 0.3 slpm의 살포된 산소를 이용하여 작동시켰다. 용기를 6 DPI에서 수거하고 10,000g 및 4°C에서 20분 동안 원심분리하고, 상청액을 0.8/0.2μm 여과하였다(GE Healthcare, cat# 6715-7582). 2750mL의 정화된 상청액을 27°C에서 5일 동안 5mM BEI로 불활성화시켰다. 잔류 BEI를 티오황산나트륨으로 중화한 후, 2750mL를 약 12회 10kDa 중공 섬유 필터(GE, cat# UFP-10-C-4MA)를 사용하여 225 mL까지 농축시켰다. 농도는 255μg/mL로 측정되었다.

[표 7A]

표 7 A. 백신 제형

성분	목적	용적	농도
AVP8-IgG 단백질	항원	16.5 mL	27.5%
PBS	희석제	31.5 mL	52.5%
카보폴	보조제	12 mL	20%

[0524] [표 7B]

표 7 B. 백신 제형

성분	목적	용적	농도
AVP8-IgG 단백질	항원	16.5 mL	27.5%
PBS	희석제	36 mL	60%
에멀시젠 D	보조제	7.5 mL	12.5%

[0525]

[0526] 실시예 4

[0527] 본 연구의 주요 목적은 IgG-AVP8 (AVP8-IgG Fc 단백질 (서열번호 12) 포함)로 백신접종된 동물이 AVP8-IgG Fc 단백질이 설계되는 P[7] 외에 다양한 G 및 P형의 다양한 로타바이러스 A 혈청형/유전자형을 교차 중화할 수 있는지 여부를 평가하는 것이었다. 이것은 AVP8-IgG Fc 단백질 (서열번호 12)이 다른 단리물에 대해 보호될 수 있는 능력을 나타낼 것이다.

[0528] 간단히 설명하면, IgG-AVP8로 백신접종한 돼지의 열 불활성화 혈청을 A행에서 G행까지의 희석 블록의 MEM에서 1:200부터 시작하여 2배 희석하였다. H행은 혈청을 함유하지 않았다. 별도의 희석 블록에서, 다양한 G형 및 P형의 로타바이러스 A를 컬럼 1에서 컬럼 11까지 6.0 Log₁₀ TCID₅₀/mL에서 시작하여 희석 플레이트에 걸쳐 1.5배 희석하였다. 컬럼 12는 바이러스를 함유하지 않았다. 상응하는 웰의 바이러스 250 µL와 혈청 250 µL를 합치고 37 °C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 1시간 인큐베이션 후, 100 µL의 바이러스-혈청 혼합물을 MA104 세포의 단일층에 오버레이하고 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하고 IFA로 염색하고 바이러스의 존재에 대해 관독하였다. 바이러스의 존재는 플레이트에 '+'로 기록하고 바이러스의 부재는 '0'으로 기록하였다. 그 다음, 이러한 결과를 표 8로 옮겼다.

[0529] 하기 6개의 로타바이러스 A 단리물을 본 검정에서 비교하였다; G9P[7], G9P[23], G4P[23], G3P[7], G5P[7] 및 G4P[7]. 표 1의 결과는 P형 P[23]이 P[7]을 교차 중화한다는 것을 나타낸다. P[7] 또는 P[23]을 포함한 모든 G형도 중화되었으며, 이는 본 검정에서 G형이 바이러스의 중화에서 유의미하지 않았음을 나타낸다.

표 8

표 8: 연구 설계 및 결과

G9P[7]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
혈청 @ 1:200 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:400 B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @1:800 C	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:1600 D	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:3200 E	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:6400 F	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:12800 G	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0
혈청 없음 H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
바이러스 희석	100	150	225	338	506	759	1139	1709	2563	3844	5767	바이러스 없음
G9P[23]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
혈청 @ 1:200 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:400 B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @1:800 C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:1600 D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:3200 E	+	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:6400 F	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
혈청 @ 1:12800 G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
혈청 없음 H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
바이러스 희석	100	150	225	338	506	759	1139	1709	2563	3844	5767	바이러스 없음
G4P[23]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
혈청 @ 1:200 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:400 B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @1:800 C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:1600 D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:3200 E	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:6400 F	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:12800 G	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
혈청 없음 H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0
바이러스 희석	100	150	225	338	506	759	1139	1709	2563	3844	5767	바이러스 없음
G3P[7]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
혈청 @ 1:200 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:400 B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[0530]

혈청 @1:800 C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:1600 D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:3200 E	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:6400 F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:12800 G	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
혈청 없음 H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
바이러스 희석	100	150	225	338	506	759	1139	1709	2563	3844	5767	바이러스 없음
G5P[7]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
혈청 @ 1:200 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:400 B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @1:800 C	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:1600 D	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:3200 E	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:6400 F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
혈청 @ 1:12800 G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
혈청 없음 H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
바이러스 희석	100	150	225	338	506	759	1139	1709	2563	3844	5767	바이러스 없음
G4P[7]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
혈청 @ 1:200 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:400 B	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @1:800 C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:1600 D	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:3200 E	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:6400 F	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
혈청 @ 1:12800 G	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
혈청 없음 H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
바이러스 희석	100	150	225	338	506	759	1139	1709	2563	3844	5767	바이러스 없음

[0531]

[0532]

결론적으로, IgG-AVP8 (AVP8-IgG Fc 단백질(서열번호 12) 포함)로 백신접종된 동물은 로타바이러스 유전자형 P[7] 및 P[23]을 교차 중화할 것이다. G형은 바이러스의 중화에서 유의미한 역할을 하지 않았다.

[0533]

실시예 5

[0534]

돼지에서의 개념 증명 실험:

[0535]

총 40마리의 동물이 본 연구에 사용되었다. 돼지는 그룹당 돼지 10마리씩 4개의 처리군으로 무작위 배정하였다. 돼지는 연구 전반에 걸쳐 섞어 놓았다. 전반적 건강 관찰, 사전 스크리닝 혈청 샘플 및 사전 스크리닝 분변 샘플을 처리 전에 수행하여, 동물의 건강을 확인하고, 로타바이러스 A에 대한 기준선 혈청학적 반응을 결정하고, 백신접종 전 또는 백신접종 시에 활성 로타바이러스 A 감염이 없음을 확인하였다. 연구 0(D0)에서, 동물은 하기 물질로 근육내로 백신접종된다: T01: IgG-P[7]AVP8 백신(서열번호 12의 폴리펩타이드 포함), T02: IgG-P[13]AVP8 백신(서열번호 14의 폴리펩타이드 포함), T03: P[7]AVP8-IgG-P[13]AVP8 백신(서열번호 16의 폴리펩타이드 포함), T04: 위약. 연구 0, 7, 14, 21, 28, 36, 42 및 49일차에 혈청 샘플이 채취된다. 모든 동물은 연구 D49에서 부검 시 인도적으로 안락된다. 혈청 샘플은 시간 경과에 따른 백신 프로토타입에 대한 혈청학적 반응을 결정하기 위해 바이러스 중화 검정으로 테스트된다. T01로 백신접종된 동물은 로타바이러스 유전자형 P[7] 및 P[23]을 중화하는 항체를 갖고, T02로 백신접종된 동물은 로타바이러스 유전자형 P[13]를 중화하는 항체를 갖고, T03으로 백신접종된 동물은 로타바이러스 유전자형 P[7], P[13] 및 P[23]을 중화하는 항체를 갖는다.

[0536]

실시예 6

[0537]

SDS PAGE:

- [0538] DTT가 있거나 없는 단백질 A 정제된 AVP8-IgG Fc 단백질(서열번호 12) 생성물의 SDS-PAGE (도 5A): SDS-PAGE 이미지를 위한 샘플을 생성하는 방법은 간략하게 하기와 같다: 배큘로바이러스 수거 상청액을 37℃에서 36시간 동안 10mM BEI로 불활성화시킨 다음, 중화하였다. 그 다음, 단백질 A 수지를 사용하여 샘플을 정제하였다. 그 다음, 모든 샘플을 25mM DTT(최종) 또는 동일한 용적의 물을 갖는 NuPAGE 4x LDS 샘플 완충액(Invitrogen cat# NP0007)을 사용하여 변성시키고 95℃에서 10분 동안 가열하였다. 샘플을 4-12% SDS-PAGE 겔(Invitrogen cat# NP0335BOX)에서 180V에서 45분 동안 실행하고 염색하였다(eStain L1, GenScript cat# M00548-1; destain cat# M00549-1).
- [0539] 그 결과, 환원된(+DTT(디티오프레이톨)) 샘플이 실행된 레인에서는 주로 하나의 밴드(모노머 AVP8-IgG Fc 단백질, 이는 하기 기재된 웨스턴 블롯의 결과와 함께 고려됨)가 확인되었다. 비-환원된 샘플(-DTT)이 실행된 레인에서는 추가 밴드가 나타났다. 추가 밴드는 각각 단량체의 배수인 분자량 범위 내에 있었다.
- [0540] 웨스턴 블롯:
- [0541] 항-돼지 IgG Fc 단편 웨스턴 블롯(도 5B): 생물반응기에서 생성된 AVP8-IgG Fc 단백질(서열번호 12) 생성물을 BEI 첨가 전에 1mL 샘플로 수거하였다. 샘플을 20,000g 및 4℃에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 새 튜브로 옮기고, 펠렛 및 상청액 둘 다를 -70℃에 보관하였다. 펠렛 및 상청액을 해동하고, 펠렛을 1mL의 8M 우레아에 재현탁한 다음, 동량의 펠렛 및 상청액을 환원 조건(+DTT) 하에 SDS-PAGE에서 실행하고, PVDF 막으로 옮겼다. 웨스턴 블롯을 HRP 접합된 염소 항-돼지의 1:1000 희석액으로 프로빙하여 돼지 IgG Fc 단편을 검출하였다.
- [0542] 그 결과, 예기치 않게 세포 펠렛 샘플에서 AVP8-IgG Fc 단백질은 보이지 않았다. 대신 모든 AVP8-IgG Fc 단백질(서열번호 12)이 유리하게는 세포 배양 상청액 샘플에서 발견되었다.
- [0543] **실시예 7**
- [0544] 컨센서스 서열의 생성:
- [0545] 서열번호 4(유전자형 P[6] 로타바이러스 VP8 단백질에 기반) 및 서열번호 5(유전자형 P[13] 로타바이러스 VP8 단백질에 기반)의 컨센서스 서열을 하기에 기재한 바와 같이 생성하였다:
- [0546] 서열은 NCBI 바이러스 변이 데이터베이스로부터 공개적으로 이용가능한 돼지 로타바이러스 VP4 뉴클레오타이드 서열 및 내부적으로 유도된 로타바이러스 단리 서열로부터 컴파일링하였다. 단리물 명칭, 단리물 P-유형, 지리적 기원 및 가능한 경우 단리 날짜에 대한 메타데이터를 포함하는 서열에 대한 추가 메타데이터도 컴파일링하였다. 뉴클레오타이드 서열을 단백질 서열로 번역하고, MUSCLE 서열 정렬 소프트웨어 UPGMB 클러스터링 및 디폴트 갭 페널티 파라미터를 사용하여 공지된 VP8 단백질에 대해 정렬하였다. 정렬되지 않은 VP5 아미노산은 트리밍하고 폐기하였다. VP8 정렬된 단백질 서열을 계통발생학적 분석을 위해 MEGA7 소프트웨어로 가져오고 VP8 단백질 서열에 기반하여 이웃 결합 계통발생 재구성을 생성하였다. 최적의 트리를 계통발생의 부트스트랩 테스트와 함께 포아송 보정 방법을 사용하여 컴퓨터 계산하고(n=100) 총 170개의 위치에 걸쳐 부위당 아미노산 치환 단위의 진화 거리와 동일한 가지 길이로 축척에 따라 그렸다. 부트스트랩 클러스터 연관이 70% 초과인 노드는 유의미한 것으로 간주하였다. 거리가 약 10%이고 부트스트랩 클러스터 연관이 70% 초과인 노드를 클러스터로서 지정하였다. 큰 클러스터에 피팅(fitting)되지 않는 이상값 서열을 서열 품질 및 P형 기원에 대해 개별적으로 평가하였다. 의심되는 낮은 품질의 서열은 분석으로부터 제거하였지만, 돼지 로타바이러스에서 거의 관찰되지 않는 P-유형의 서열이 유지되었다. 컨센서스 서열을 생성하는 데 사용되는 클러스터는 원하는 생성물 보호 프로파일 및 체외 혈청 교차 중화 연구에 기반하여 선택하였다. 컨센서스 서열은 정렬된 위치당 최대 빈도로 생성되었으며, 동일한 비율의 아미노산이 정렬된 위치에서 관찰된 경우, 아미노산 잔기는 생성물 보호 프로파일과 함께 보고된 역학 데이터에 기반하여 선택하였다.
- [0547] **실시예 8**
- [0548] 시험감염 연구:
- [0549] 본 연구의 주요 목적은 AVP8-IgG Fc 단백질(서열번호 12)을 포함하는, 본원에서 "IgG#AVP8"로도 명명된 프로토타입 백신 및 본원에서 "위약"으로 명명된 비관련 대조군 백신을 통상의 어미에게 투여하는 것이 병독성 로타바이러스 A 시험감염에 대한 수동 보호를 돼지에게 부여하는지 여부를 평가하는 것이었다. 프로토타입 백신은 상기 실시예 1에 기재된 제조와 유사하게 제조되었지만, 하기 "IgG#AVP8의 제조" 섹션에 기재된 바와 같이 감염에 사용된 상이한 용적 및 상이한 정제 방법이 사용되었다.
- [0550] 총 20마리의 어미가 연구에 포함되었다. 어미는 하기 표 9에 기재된 바와 같이 2개의 처리군 및 1개의 엄격한

대조군으로 무작위 배정하였다. T01 및 T03의 어미는 3개의 방 사이에 섞어 놓았다. T07의 어미는 별도의 방에 수용하였다. 모든 어미는 표 9에 열거된 적절한 경로에 의해 적절한 물질로 백신접종하였다. T07의 어미는 비-백신접종된 상태로 유지하였다(엄격한 대조군). 백신접종 기간 전반에 걸쳐 주기적으로 어미로부터 혈청을 수집하고 혈청전환의 증거에 대해 검정하였다. 분만 전에 분변 샘플을 수집하고 RT-qPCR로 스크리닝하여 어미가 분만 전에 활발하게 로타바이러스를 배출하지 않았음을 확인하였다. 전반적 건강 관찰을 각 어미에 대해 매일 기록되었다. 분만은 모돈이 임신 114일에 도달할 때까지 자연적으로 발생하도록 허용하였다. 이 시간 이후에는 분만을 유도하였다. 자돈은 분만 시 시험에 등록하였다. 출생 시 건강한 자돈에만 태그를 달고, 시설 표준 운영절차에 따라 처리하고 시험에 포함시켰다. 돼지가 생후 0 내지 5일령일 때, 채혈하고, 분변 샘플을 수집하고, 돼지를 시험감염시켰다(T07 제외). 시험감염 시점에 돼지에게 위내 5mL 용량의 중탄산나트륨을 투여한 다음, 위내 1mL 용량의 시험감염 물질을 투여하였다. 시험감염 기간 전반에 걸쳐, 모든 동물을 장 질환(설사 및 행동 변화)의 존재에 대해 매일 모니터링하였다. 시험감염 1일 후(DPC1) 분변 샘플을 수집하였다. DPC2에, T01 및 T03의 모든 돼지를 안락사시켰다. 현미경 및 면역조직학적 평가를 위해 장관 절편을 수집하였다.

표 9

표 9: 연구 설계

그룹	N (어미)	N (자돈)	방	모든 백신접종 (분만 6 주 전 및 2 주 전)		자돈 시험감염 (DPC0; 생후 1 내지 5 일령)	부검
				설명	경로/용량*		
T01	8	67	방 CC1, CC2, CC3 사이에 섞임	위약	2mL IM	로타바이러스 A P[7] 조직 균질물 1:2 희석 위내 1mL 용량	DPC2
T03	8	72		IgG#AVP8	2mL IM		
T07	4	35	CB8	엄격한 대조군	해당 없음	없음	해당 없음

[0551]

[0552]

*IM = 근육내

[0553]

연구 전반에 걸쳐, T07(엄격한 대조군)의 어미에서 혈청 VN 역가는 4배 미만으로 증가하였고, 이는 노출 부족 및 유효한 연구를 나타낸다(바이러스 중화는 실시예 1("바이러스 중화 검정을 위한 프로토콜")에 기재된 바와 같이 평가하고, 결과는 표 10 및 도 6에 나타낸다). 백신접종 단계 동안, 프로토타입 백신 IgG#AVP8로 백신접종된 어미(그룹 T03)에서 혈청 중 가장 높은 평균 VN 역가가 관찰되었다. 상기 그룹에서, 분만 6주 전에 투여된 1회 용량은 D14까지 T03(IgG#AVP8)의 6/8마리 동물에서 4배 이상 증가된 역가를 초래하였다. 그룹 T01(위약)의 어미 중 어느 것에서도 백신접종 단계 동안 혈청 VN 역가가 유의미하게 증가하지 않았다(< 2배). 어미 초유 VN 역가: 그룹 T03(IgG#AVP8)의 어미는 그룹 T01(위약)의 어미와 비교하여 더 높은 평균 VN 역가를 가졌다.

표 10

표 10: VN 결과

그룹	어미	혈청					초유
		D0	D14	D21	D28	DPC0	DOF*
T01	887	160	320	320	453	320	160
	7768	320	160	320	320	320	1280
	7777	320	320	640	640	640	226
	7785	320	640	905	905	1810	640
	7795	160	80	640	640	640	1280
	7802	320	113	453	320	640	1280
	7813	320	640	640	905	453	905
	7821	160	320	320	160	113	320
T03	1051	320	1280	320	1280	320	640
	7767	160	640	1280	905	1280	2560
	7772	160	1280	1280	1280	2560	2560
	7774	160	1280	1280	1280	2560	1280
	7781	320	640	905	640	640	453
	7783	160	640	1280	905	2560	2560
	7798	113	226	640	640	1280	453
	7807	160	1280	1280	453	1280	2560
T07	886	226	80	160	1280	320	320
	889	160	320	320	320	453	1280
	7770	226	113	320	226	320	1280
	7778	226	453	320	320	640	80

[0554]

[0555]

*DOF = 분만일

[0556]

시험감염 전 돼지 혈청 중의 VN 역가는 그룹 T03(IgG#AVP8)의 대부분의 돼지에서 높았으며(>1280) 면역력이 어미에서 돼지로 수동적으로 전이되었음을 나타낸다. 반대로, T02(위약)의 돼지에서 대부분의 역가는 낮았다(<1280).

[0557]

그룹 T01(위약) 및 T03(IgG#AVP8)에서 돼지는 면역조직화학(IHC)에 의해 적어도 하나의 장관 섹션에서 로타바이러스 항원이 검출되고 동물이 시험감염 후 적어도 하루 동안 비정상 분변 점수를 갖는 경우, 이환된 것으로 정의되었다. 빈도 분포는 하기 표 11에 열거되어 있다. 이러한 사례 정의의 사용에 기반하여, 프로토타입 백신 IgG#AVP8(그룹 T03)로 분만 6주 전 및 2주 전에 어미를 백신접종하는 것은 이중 로타바이러스 AP[7] 시험감염 물질로 시험감염한 후 돼지의 로타바이러스 관련 질환을 예방하였다; 예방 분율 0.926, 95% 신뢰구간 0.734, 0.979.

표 11

표 11. 사례 정의의 빈도 분포

그룹	총	사례 정의*			
		0		1	
		N	%	N	%
T01	67	42	62.7	25	37.3
T03	72	70	97.2	2	2.8

[0558]

[0559]

*사례 정의: 돼지는 시험감염 후 어느 날 회장 및 공장 조직 샘플 중 하나 이상이 로타바이러스 A에 대해 IHC 양성(점수>0)이고 적어도 하나의 비정상적 분변 점수를 갖는 경우 돼지는 이환된 것으로 간주된다. 점수 0 = 이환되지 않음; 1 = 이환됨

[0560]

결론적으로, 분만 6주 전 및 2주 전에 통상의 어미에 프로토타입 백신 IgG#AVP8(서열번호 12의 폴리펩타이드를 포함)으로 백신접종하는 것은 모돈 혈청 및 초유에서 높은 중화 항체 역가를 유도하였다. 이러한 중화 항체는 백신접종된 어미로부터의 돼지의 혈청에서 높은 역가(>1280)의 검출에 의해 입증된 바와 같이 출생 후 돼지에게 수동적으로 전달되었다. 돼지에서 높은 중화 항체 역가의 존재는 임상적 보호를 유도하였다. 구체적으로, 위약 대조군에서 태어난 돼지에 비해 백신접종된 어미에서 태어난 돼지 중 이환된 것으로 간주되는 돼지의 수가 적었다.

[0561]

IgG#AVP8의 제조

[0562]

2개의 10L 자르토리우스 비오쉬타트 B 유리 재킷 용기에 1.00x10⁶ 세포/mL의 Sf+ 세포 3L를 접종하였다. 식종 3일 후, 각 용기를 0.1의 MOI로 감염시키고 각 용기의 용적을 Ex-cell 420 무혈청 배지(SAFC cat# 14420C-1000mL)를 사용하여 8L로 조정하였다. 생물반응기는 27°C에서 100 rpm 교반, 40% 이상으로 설정된 용존 산소, 및 1.3slpm의 CCA 오버레이를 이용하여 작동시켰다. 용기를 접종 7일 후 수거하고; 유체를 10,000g에서 4°C에서 20분 동안 원심분리하고, 상청액을 0.8/0.2µm 여과하였다(GE Healthcare, cat# 6715-7582). 정화된 상청액(8L/용기)을 자르토리우스 비오쉬타트 B 유리 재킷 용기에서 37°C에서 3일 동안 5mM BEI로 불활성화시켰다. 불활성화 후, 잔류 BEI를 티오황산나트륨으로 중화하였다. 중화 후, 7000mL를 약 10회 10kDa 중공 섬유 필터(GE, cat# UFP-10-C-5A)를 사용하여 700 mL까지 농축시켰다. 농축된 물질을 5용적(3500mL)의 1x PBS로 투석여과하였다. 백신은 12.5% 에멀시젠 D, 28% 농축 물질 및 59.5% 1x PBS(용적:용적)로 제형화되었다.

[0563]

실시예 9

[0564]

돼지에서의 개념 증명 실험:

[0565]

총 20마리의 동물이 본 연구에 사용된다. 돼지는 그룹당 돼지 10마리씩 2개의 처리군으로 무작위 배정된다. 돼지는 연구 전반에 걸쳐 섞여진다. 동물의 건강을 확인하고, 로타바이러스 C에 대한 기준선 혈청학적 반응을 결정하고, 백신접종 전 또는 백신접종 시에 활성 로타바이러스 C 감염이 없음을 확인하기 위해 전반적 건강 관찰, 사전 스크리닝 혈청 샘플 및 사전 스크리닝 분변 샘플을 처리 전에 채취한다. 연구 0일(D0) 및 D28일차에, 동물은 하기 물질이 근육내로 백신접종된다: T01: IgG-CVP8 백신(서열번호 15의 폴리펩타이드 포함), T02: 위약. 연구 0, 7, 14, 21, 28, 36 및 42일차에 혈청 샘플이 채취된다. 모든 동물은 연구 D42에서 부검 시 인도적으로 안락사된다. 혈청 샘플은 시간 경과에 따른 백신 프로토타입에 대한 혈청학적 반응을 결정하기 위해 ELISA에 의해 테스트된다. T01로 백신접종된 동물은 역가가 증가하지 않은 T02로 백신접종된 동물보다 로타바이러스 C에 대한 평균 항체 수준이 더 높다.

[0566]

실시예 10

[0567] 돼지에서의 개념 증명 실험:

[0568] 본 연구의 주요 목적은, 통상의 어미에게 3가지 AVP8-IgG Fc 단백질(서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14)을 포함하는, 본원에서 "IgG:AVP8 P[6,7,13]"로도 명명된 프로토타입 백신 및 본원에서 위약이라 명명된 비관련 대조군 백신의 투여가 병독성 로타바이러스 A 감염에 대한 수동 보호를 돼지에게 부여하였는지 여부를 평가하는 것이다. 프로토타입 백신의 성분은 상기 실시예 1에서 기재한 생산과 유사하게 생산하고, 후속적으로 하기 "IgG:AVP8 P[6,7,13] 생산" 섹션에서 기재된 바와 같이 혼합하였다.

[0569] 총 32마리의 어미가 연구에 포함되었다. 어미는 하기 표 12에 기재된 바와 같은 2개의 처리군 및 1개의 엄격한 대조군으로 무작위 배정하였다. T01 및 T03의 어미는 7개의 방 사이에서 섞여진다. T04의 어미는 별도의 방에 수용하였다. 모든 어미는 표 12에 열거된 바와 같은 적절한 경로를 통해 적절한 물질로 백신접종을 받았다. T04의 어미는 비-백신접종된 상태로 유지되었다(엄격한 대조군). 백신접종 기간 전반에 걸쳐 주기적으로 어미로부터 혈청을 수집하였고 바이러스 중화(VN) 및 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA)에 의해 혈청전환의 증거에 대해 검정하였다. 분만 전에 분변 샘플을 수집하고 RT-qPCR로 스크리닝하여 모돈이 분만 전에 로타바이러스를 활발하게 배출하지 않았음을 확인하였다. 본 연구 내에서, RT-qPCR은 상기 실시예 2("로타 A qRT-PCR을 위한 프로토콜")에서 기재한 바와 같이 수행하였다. 전반적 건강 관찰을 각 모돈에 대해 매일 기록하였다. 분만은 모돈이 임신 115일에 도달할 때까지 자연적으로 발생하도록 허용되었다. 이 시간 이후에는, 분만을 유도하였다. 자돈은 분만 시 시험에 등록하였다. 출생 시 건강한 자돈에만 태그를 달고, 시설 표준 운영 절차에 따라 처리하고 시험에 포함시켰다. 돼지가 생후 0 내지 5일령일 때, 채혈하고, 분변 샘플을 수집하고, 돼지를 시험감염시켰다(T04 제외). 시험감염 시점에, 돼지에게 위내 5mL 용량의 중탄산나트륨을 투여한 다음, 위내 1mL 용량의 시험감염 물질을 투여하였다. 시험감염 기간 내내, 모든 동물을 장 질환(설사 및 행동 변화)의 존재에 대해 매일 모니터링하였다. 시험감염 1일 후(DPC1) 및 DPC3에 분변 샘플을 수집하였다. DPC3에서, T01 및 T03의 모든 돼지를 안락사시켰다. 현미경 및 면역조직학적 평가를 위해 장 절편을 수집하였다.

표 12

표 12: 연구 설계

그룹	N (어미)	어미 백신접종 (분만 6 주 전 및 2 주 전)		자돈 시험감염 (DPC0; 생후 2 내지 5 일령)	부검
		설명	경로/용량*		
T01	14	위약	2mL IM	로타바이러스 A P[7] 조직 균질물 1:2 희석 위내 1mL 용량	DPC3
T03	14	IgG:AVP8 P[6,7,13]	2mL IM		
T04	4	엄격한 대조군	해당 없음	없음	해당 없음

[0570]

[0571] *IM = 근육내

[0572] 연구 전반에 걸쳐, T04(엄격한 통제)의 어미의 혈청 VN 역가는 4배 이하로 증가하였으며, 이는 노출 부족 및 유효한 연구를 나타낸다(바이러스 중화는 하기("바이러스 중화 검정을 위한 프로토콜")에 기재된 바와 같이 평가하였으며, 결과는 표 13 및 도 7에 도시된다). 그룹 T01(위약)의 모돈 중 어느 것에서도 백신접종 기간 동안 혈청 VN 역가가 유의미하게 증가하지 않았다(≤ 2 배). 프로토타입 백신 IgG:AVP8 P[6,7,13](그룹 T03)으로 백신접종된 어미로부터의 혈청 중 VN 역가는 D14, D21, D27 및 D47에서 위약으로 백신접종된 어미(그룹 T01)보다 유의미하게 높았다($p < 0.01$). 그룹 T03(IgG:AVP8 P[6,7,13])의 어미로부터의 평균 초유 VN 역가도 그룹 T01(위약)의

어미와 비교하여 유의미하게 높았다.

표 13

표 13: VN 결과

그룹	어미	혈청					초유 DOF*
		D0	D14	D21	D28	D47	
T01	1054	226	320	226	226	160	320
	1154	80	80	160	160	113	320
	1155	113	113	160	226	160	320
	1160	113	453	226	226	80	226
	1162	226	320	640	320	320	640
	1163	160	226	226	160	320	1280
	8093	80	80	160	130	160	453
	8101	320	160	320	320	320	320
	8105	320	1280	453	905	453	640
	8107	160	320	320	320	226	40
	8120	226	320	226	320	320	640
	8121	226	320	160	640	226	320
	8127	160	160	320	226	160	160
	8131	320	320	453	453	640	640
T03	1045	1280	1280	1280	1280	2560	640
	1053	320	2560	1280	1280	1280	2560
	1055	320	905	1280	1280	640	3620
	1158	320	453	905	1280	640	2560
	1159	160	320	905	640	1810	5120
	1161	320	320	640	320	1280	1280
	8100	226	2560	1810	622	10240	14482
	8102	320	640	905	640	5120	3620
	8103	320	1280	640	453	1280	1810
	8108	320	1810	1280	640	1280	2560
	8117	453	320	640	905	640	2560
	8118	320	905	1280	640	1280	905
	8122	160	320	640	320	1280	640
	8130	113	640	640	905	1280	10240
T04	1046	320	640	640	640	1280	453
	1164	320	320	226	320	320	1280
	8123	640	640	1280	640	905	640
	8126	226	320	640	320	640	2560

[0573]

[0574]

시험감염 전 돼지 혈청 중의 VN 역가는 그룹 T03(IgG:AVP8 P[6,7,13])의 대부분 돼지에서 높았으며(>1280), 이는 어미로부터 돼지로의 수동 전달을 나타낸다. 반대로, T01(위약)의 돼지 중 어느 것에서도 VN 역가가 높지 않았다(>1280).

[0575]

VN 데이터와 유사하게, IgG:AVP8 P[6,7,13] 프로토타입(그룹 T03)으로 백신접종된 어미에서 D47까지 항-로타바이러스 AVP8 P[6] 및 항-로타바이러스 AVP8 P[13] 항체의 양의 증가가 검출되었지만, 위약(그룹 T01)으로 백신접종된 암컷에서는 검출되지 않았다. 이러한 검정은 하기(각각 "IgG:AVP8 P[13] ELISA를 위한 프로토콜" 및 "IgG:AVP8 P[6] ELISA를 위한 프로토콜")에 기재된 바와 같이 수행하였다. 결과는 도 8 및 도 9에 도시되어 있다.

[0576]

그룹 T01(위약) 및 T03(IgG:AVP8 P[6,7,13])에서, 적어도 하나의 장 절편에서 면역조직화학(IHC)에 의해 로타바이러스 항원이 검출되고 동물이 시험감염 후 적어도 1일 동안 비정상적 분변 점수를 보이는 경우, 돼지는 이환된 것으로 정의되었다. 빈도 분포는 하기 표 14에 열거되어 있다. 상기 사례 정의의 사용에 기반하여, 분만 6주

전 및 2주 전에 어미에게 프로토타입 백신 IgG:AVP8 P[6,7,13](그룹 T03)을 백신접종하는 것은 이중 로타바이러스 A P[7] 시험감염 물질로 시험감염 후 돼지에서 로타바이러스 관련 질환을 예방하였다: 예방적 분율 0.567, 95% 신뢰 구간 -0.086, 0.827.

표 14

표 14. 사례 정의의 빈도 분포

그룹	사례 정의 *				총
	0		1		
	N	%	N	%	
T01	78	60.9	50	39.1	128
T03	113	83.1	23	16.9	136

*사례 정의: 시험감염 후 어느 날에 회장 또는 공장 조직 샘플 중 하나 이상이 로타바이러스 A에 대해 IHC 양성(점수 > 0)이고 적어도 하나의 비정상적 분변 점수를 갖는 경우, 돼지는 이환된 것으로 간주되었다. 점수 0 = 이환되지 않음; 1 = 이환됨

결론적으로, 분만 6주 전 및 2주 전에 통상의 어미에게 프로토타입 백신 IgG:AVP8 P[6,7,13](서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14의 폴리펩타이드 포함)으로 백신접종하는 것은 모든 혈청 및 초유에서 높은 중화 항체를 유도하였다. 이러한 중화 항체는 백신접종된 어미의 혈청에서 높은 역가(>1280)가 검출된 것으로 입증된 바와 같이 출생 후 돼지에게 수동 전달되었다. 돼지에서 높은 중화 항체의 존재는 임상적 보호를 유도하였다. 구체적으로, 위약 대조군에서 태어난 돼지에 비해 백신접종된 어미에서 태어난 돼지 중 이환된 것으로 간주되는 돼지의 수가 적었다.

IgG:AVP8 P[6,7,13]의 생산

프로토타입 백신은 3개의 분획을 함유하였다. 각 분획의 생산은 별도로 수행되었으며 하기에 기재되어 있다. 백신은 12.0% 에멀시젠 D(Emulsigen D), 7% IgG:AVP8 P[7] 분획, 4.4% IgG:AVP8 P[6] 분획, 1.8% IgG:AVP8 P[13] 분획, 47.8% 1x PBS(용적:용적)로 제형화하였다.

IgG:AVP8 P[7] 분획: 1개의 10L 자르토리우스 비오쉬타트 B 유리 재킷 용기에 3L의 Sf+ 세포를 0.75×10^6 세포/mL에서 시딩하였다. 식중 2일 후, 용기를 0.1의 MOI로 감염시키고 용기의 용적을 Ex-cell 420 무혈청 배지(SAFC cat# 14420C-1000mL)를 사용하여 8L로 조정하였다. 생물반응기는 27°C에서 100 rpm 교반 및 40% 이상으로 설정된 용존 산소 및 1.3slpm의 CCA 오버레이를 이용하여 작동시켰다. 용기를 접종 7일 후 수거하고; 유체를 10,000g에서 4°C에서 20분 동안 원심분리하고, 상청액을 0.8/0.2 μ m 여과하였다(GE Healthcare, cat# 6715-7582). 정화된 상청액(8L/용기)을 자르토리우스 비오쉬타트 B 유리 재킷 용기에서 37°C에서 3일 동안 5mM BEI로 불활성화시켰다. 불활성화 후, 잔류 BEI는 티오황산나트륨으로 중화하였다. 중화 후, 약 7000mL를 약 10회 10kDa 중공 섬유 필터(GE, cat# UFP-10-C-5A)를 사용하여 700 mL까지 농축시켰다. 농축된 물질을 5용적(3500mL)의 1x PBS로 투석여과하였다.

IgG:AVP8 P[6] 분획: 1개의 10L 자르토리우스 비오쉬타트 B 유리 재킷 용기에 3L의 Sf+ 세포를 0.75×10^6 세포/mL에서 시딩하였다. 식중 2일 후, 용기를 0.1의 MOI로 감염시키고 용기의 용적을 Ex-cell 420 혈청 무함유 배지(SAFC cat# 14420C-1000mL)를 사용하여 8L로 조정하였다. 생물반응기는 27°C에서 100 rpm 교반, 40% 이상으로 설정된 용존 산소 및 1.3slpm의 CCA 오버레이를 이용하여 작동시켰다. 용기를 접종 8일 후에 수거하고, 유체를 10,000g에서 4°C에서 20분 동안 원심분리하고, 상청액을 0.8/0.2 μ m 여과하였다(GE Healthcare, cat# 6715-

7582). 정화된 상청액(8L/용기)을 자르토리우스 비오쉬타트 B 유리 재킷 용기에서 37℃에서 3일 동안 10mM BEI로 불활성화시켰다. 불활성화 후, 잔류 BEI를 티오황산나트륨으로 중화하였다. 중화 후, 약 7000mL를 약 10회 10kDa 중공 섬유 필터(GE, cat# UFP-10-C-5A)를 사용하여 600 mL까지 농축시켰다. 농축된 물질을 5용적(3500mL)의 1x PBS로 투석여과하였다.

[0584] IgG:AVP8 P[13] 분획: 1개의 10L 자르토리우스 비오쉬타트 B 유리 재킷 용기에 3L의 Sf+ 세포를 0.75×10^6 세포/mL에서 시딩하였다. 식중 2일 후, 용기를 0.1의 MOI로 감염시키고 용기의 용적을 Ex-cell 420 무혈청 배지(SAFC cat# 14420C-1000mL)를 사용하여 8L로 조정하였다. 생물반응기는 27℃에서 100 rpm 교반, 40% 이상으로 설정된 용존 산소 및 1.3slpm의 CCA 오버레이를 이용하여 작동시켰다. 용기를 접종 7일 후 수거하고; 유체를 10,000g에서 4℃에서 20분 동안 원심분리하고, 상청액을 0.8/0.2 μ m 여과하였다(GE Healthcare, cat# 6715-7582). 정화된 상청액(8L/용기)을 자르토리우스 비오쉬타트 B 유리 재킷 용기에서 37℃에서 24시간 동안 10mM BEI로 불활성화시켰다. 불활성화 후, 잔류 BEI를 티오황산나트륨으로 중화하였다. 중화 후, 약 7000mL를 약 10회 10kDa 중공 섬유 필터(GE, cat# UFP-10-C-5A)를 사용하여 750 mL까지 농축시켰다. 농축된 물질을 5용적(3500mL)의 1x PBS로 투석여과하였다.

[0585] IgG:AVP8 P[13] ELISA를 위한 프로토콜:

[0586] Nuc MaxiSorb 96웰 ELISA 플레이트(Thermo)를 1x PBS에 1:10 희석된 로타바이러스 A VP8 P[13] 정제 단백질로 코팅하였다. 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 1x PBST로 세척한 다음, 37℃에서 1시간 동안 PBST 중의 3%BSA로 차단하였다. 세척 후, 100 μ L의 테스트 혈청을 1x PBS 중의 1:512의 최종 희석비까지 희석하고 플레이트에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 웰을 호스래디시 퍼옥시다아제(HRP)-접합된-염소-항-돼지-IgG 항체(Jackson ImmunoResearch)의 1:25,000 희석액 100 μ L로 코팅하고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 플레이트를 실온에서 10분 동안 3,5,3',5'-테트라메틸벤지딘(1-Step Ultra TMB-ELISA, Thermo)으로 발색시키고, 450nm에서 광학 밀도(OD)를 측정하기 전에 정지 용액(Sigma)으로 반응을 정지시켰다. 양성 및 음성 대조군을 포함하는 샘플을 중복 웰에서 실행하고 결과를 (샘플 - 음성 대조군) 대 (양성 - 음성 대조군) 비 (S-N)/(P-N)의 평균으로 보고하였다.

[0587] IgG:AVP8 P[6] ELISA를 위한 프로토콜:

[0588] Nuc MaxiSorb 96웰 ELISA 플레이트(Thermo)를 1x PBS에 1:10 희석된 로타바이러스 A VP8 P[6] 정제 단백질로 코팅하였다. 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 1x PBST로 세척한 다음, 37℃에서 1시간 동안 PBST 중의 3%BSA로 차단하였다. 세척 후, 1x PBS 중의 1:512의 최종 희석율까지 희석된 100 μ L의 테스트 혈청을 플레이트에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 웰을 호스래디시 퍼옥시다아제(HRP)-접합된-염소-항-돼지 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch)의 1:25,000 희석액 100 μ L로 코팅하고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 플레이트를 실온에서 10분 동안 3,5,3',5'-테트라메틸벤지딘(1-Step Ultra TMB-ELISA, Thermo)으로 발색시키고, 450nm에서 광학 밀도(OD)를 측정하기 전에 정지 용액(Sigma)으로 반응을 정지시켰다. 양성 및 음성 대조군을 포함하는 샘플을 2개의 웰에서 실행하였으며 결과는 (샘플 - 음성 대조군) 대 (양성 - 음성 대조군) 비(S-N)/(P-N)의 평균으로서 보고한다.

[0589] 바이러스 중화 검정을 위한 프로토콜

[0590] 모든 혈청 및 모유 샘플을 56℃에서 30분 동안 열 불활성화시켰다. 샘플을 로타바이러스 성장 배지(MEM + 2.5% HEPES + 0.3% 트립토스 포스페이트 브로스 + 0.02% 효모 + 10 μ g/mL 트립신)에 1:40 내지 1:2,560 연속 희석하였다. 로타바이러스 A 단리물(역가 약 6.5 log TCID₅₀/mL)을 로타바이러스 성장 배지에 1:78,000 희석하였다. 총 250 μ L의 희석된 샘플을 250 μ L의 희석된 바이러스에 첨가하였다; 상기 혼합물을 37℃ $\pm$ 5% CO₂에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 성장 배지는 MA104 세포가 식종된 3일 내지 4일 된 96웰 플레이트로부터 무균적으로 제거하였다. 인큐베이션 후, 200 μ L의 바이러스-혈청 혼합물을 세포 배양 플레이트로 옮겼다. 세포를 37℃ $\pm$ 5% CO₂에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 스톱 및 희석된 바이러스는 검정에 사용된 희석을 확인하기 위해 사용 당일에 적정하였다. 인큐베이션 후, 상청액을 폐기하였다. 고정을 위해 100 μ L/웰의 50%/50% 아세톤/메탄올을 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 15분 동안 인큐베이션하고, 공기 건조시킨 다음, 100 μ L/웰 1x PBS로 재수화시켰다. 1차 항체(토끼 항-로타바이러스 A 폴리클로날 혈청, 내부적으로 생성됨)를 1x PBS에 1:1000 희석하였다. 100 μ L/웰의 희석된 1차 항체를 첨가하고 플레이트를 37℃ $\pm$ 5% CO₂에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 100 μ L/웰의 1x PBS로 2회 세척하였다. 2차 항체(Jackson ImmunoResearch FITC 표지된 염소-항-토끼 IgG cat# 111-095-003)를 1x PBS에 1:100 희석하였다. 100 μ L/웰의 희석된 2차 항체

를 첨가하고 플레이트를 $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO_2 에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 $100\ \mu\text{L}$ /웰의 1X PBS로 2회 세척하였다. 2차 항체(Jackson ImmunoResearch FITC 표지된 염소-항-토끼 IgG cat# 111-095-003)를 1X PBS에 1:100 희석하였다. $100\ \mu\text{L}$ /웰의 희석된 2차 항체를 첨가하고 플레이트를 $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO_2 에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 $100\ \mu\text{L}$ /웰의 1X PBS로 2회 세척하였다. 플레이트를 자외선 현미경을 사용하여 형광의 존재에 대해 판독하였다. 검정은 희석된 바이러스의 역가(Reed-Muench 방법을 사용하여 생성됨)가 $2.8 \pm 0.5\ \log\ \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 인 것으로 밝혀진 경우 유효한 것으로 간주되었다. 또한, 기지의 양성 및 음성 샘플을 각 검정에 대조군으로서 포함시켰다. 혈청 역가는 염색이 관찰되지 않은 가장 높은 희석비로서 보고하였다.

[0591] **실시예 11**

[0592] 돼지에서의 개념 증명 실험:

[0593] 본 연구의 주요 목적은, 통상의 어미에게 3개의 AVP8-IgG Fc 단백질(서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14)과 1개의 CVP8-IgG Fc 단백질을 포함하는, 본원에서 "IgG:AVP8 P[6,7,13] + IgG:CVP8"로도 명명된 프로토타입 백신 및 본원에서 "위약"이라 명명된 비관련 대조군 백신의 투여하는 것이 병독성 로타바이러스 A 시험감염에 대한 수동 보호를 돼지에게 부여하였는지 여부를 평가하는 것이다. 총 24마리의 어미가 연구에 포함된다. 어미는 하기 표 15에 기재된 바와 같이 3개의 처리군 및 1개의 엄격한 대조군으로 무작위 배정된다. T01 및 T02의 어미는 3개의 방 사이에 섞어 놓았다. T03의 어미는 별도의 방에 수용하였다. 모든 어미는 표 15에 열거된 적절한 경로를 통해 적절한 물질로 백신접종된다. T03의 어미는 비-백신접종된 상태로 유지된다(엄격한 대조군). 혈청은 백신접종 기간 전반에 걸쳐 주기적으로 어미로부터 수집되고 혈청전환의 증거에 대해 검정된다. 어미가 분만 전에 활발하게 로타바이러스를 배출하지 않았음을 확인하기 위해, 분만 전에 분변 샘플이 수집되고 RT-qPCR에 의해 스크리닝된다. 전반적 건강 관찰은 각 모돈에 대해 매일 기록된다. 분만은 모돈이 임신 114일에 도달할 때까지 자연적으로 발생하도록 허용된다. 이 시간 이후에는 분만이 유도된다. 자돈은 분만 시 시험에 등록된다. 출생 시 건강한 자돈에만 태그가 달리고, 시설 표준 운영 절차에 따라 처리되고, 시험에 포함된다. 돼지가 생후 0 내지 5일령일 때, 채혈되고, 분변 샘플이 수집되고, 돼지는 시험감염된다(T03 제외). 시험감염 시점에, 돼지에게 위내 5mL 용량의 중탄산나트륨이 투여된 다음, 위내 1mL 용량의 시험감염 물질이 투여된다. 시험감염 기간 내내, 모든 동물은 장 질환(설사 및 행동 변화)의 존재에 대해 매일 모니터링된다. 분변 샘플은 시험감염 1일 후(DPC1)에 수집된다. DPC3에, T01 및 T02의 모든 돼지는 안락사된다. 현미경 및 면역조직학적 평가를 위해 장관 절편이 수집된다. 그룹 T01(IgG:AVP8 P[6,7,13] + IgG:CVP8)의 어미는 역가가 증가하지 않은 T02(위약)이 백신접종된 동물보다 로타바이러스 A 유전자형 P[6], P[7], P[13] 및 로타바이러스 C에 대한 항체의 평균 수준이 높다. 그룹 T01(IgG:AVP8 P[6,7,13] + IgG:CVP8)의 어미는 그룹 T02(위약)의 어미에 비해 이환된 자돈이 적다(임상 징후 및 면역조직학적 평가에 의해 결정됨).

표 15

표 15: 연구 설계

그룹	N (어미)	어미 백신접종 (분만 6 주 전 및 2 주 전)		자돈 시험감염 (DPC0; 생후 1 내지 5 일령)	부검
		설명	경로/용량*		
T01	10	IgG:AVP8 P[6,7,13] + IgG:CVP8	2mL IM	로타바이러스 A P[7] 조직 균질물 1:2 희석 위내 1mL 용량	DPC2
T02	10	위약	2mL IM		
T03	4	엄격한 대조군	해당 없음	없음	해당 없음

[0594]

[0595] *IM = 근육내 주사

[0596] 도면 목록:

[0597] **도 1:** 돼지 로타바이러스 A에 대해 유도된 에멀시젠 D로 제형화된 AVP8-IgG Fc 단백질(라벨에서 "AVP8-IgG"로 지칭됨) 또는 위약("비관련 대조군")으로 백신접종된 돼지의 혈청 IgG 반응.

[0598] **도 2:** 에멀시젠 D로 제형화된 AVP8-IgG Fc 단백질(라벨에서 "AVP8-IgG"로 지칭됨) 또는 위약("비관련 대조군")으로 백신접종된 돼지의 샘플에서 돼지 로타바이러스 A 바이러스를 중화할 수 있는 항체를 검출하고 정량화하기 위해 수행된 VN(바이러스 중화) 검정의 결과.

[0599] **도 3:** 그룹 및 연구일별 모든 혈청 중의 로타바이러스에 대한 평균 VN 역가로서, 연구일 D0 및 D28은 "분만 6주 전 및 2주 전" 시점(즉, 조사용 제품이 연구 그룹 T02 및 T04에 각각 투여되었을 때)을 나타내고 및 연구일 D7, D28 및 D35는 "분만 5주 전, 2주 전 및 1주 전" 시점(즉, 상업적 백신이 T06에 투여되었을 때)을 나타낸다.

[0600] **도 4:** 연구일별 분변 중 그룹 중앙값 log 로타바이러스 A RNA 게놈 카피(gc)/mL.

[0601] **도 5:** A) 디티오프레이틀로 환원된("+DTT") 또는 비-환원된("-DTT") 단백질 A 정제된 AVP8-IgG Fc 단백질(서열 번호 12) 생성물 샘플의 SDS-PAGE; B) AVP8-IgG Fc 단백질(서열번호 12) 생물반응기 생성물의 웨스턴 블롯으로서, 여기서 샘플을 원심분리하여 세포 펠렛 분획("펠렛") 및 상청액 분획("상청액")을 분리하고, 동결-해동 과정 후에 이를 환원 조건(+DTT) 하에 SDS-PAGE에서 실행하고, PVDF 막으로 옮기고 HRP 접합된 염소 항-돼지로 프로빙하여 돼지 IgG Fc 단편을 검출하였다.

[0602] **도 6 :** 그룹 및 연구일별 모든 혈청 중의 로타바이러스에 대한 평균 VN 역가로서, 여기서 연구일 D0 및 D28은 "분만 6주 전 및 2주 전" 시점(즉, 조사용 제품이 연구 그룹 T01 및 T03에 각각 투여되었을 때)을 나타낸다.

[0603] **도 7:** 그룹 및 연구일별 모든 혈청에서 로타바이러스에 대한 평균 VN 역가로서, 여기서 연구일 D0는 각각 연구 그룹 T01 및 T03에 조사용 제품을 처음 투여한 시점을 나타낸다.

[0604] **도 8:** "IgG:AVP8 P[6] ELISA" 결과로서, 여기서 로타바이러스 A VP8 P[6] 단백질로 코팅된 ELISA 플레이트를 희석된 시험 혈청과 함께 인큐베이션하고, 이어서 HRP-접합된 염소-항-돼지-IgG 항체를 사용하여 항-로타바이러스 AVP8 P[6] 항체를 검출하였다.

[0605] **도 9:** "IgG:AVP8 P[13] ELISA" 결과로서, 여기서 로타바이러스 A VP8 P[13] 단백질로 코팅된 ELISA 플레이트를 희석된 시험 혈청과 함께 인큐베이션하고, 이어서 HRP-접합된 염소-항-돼지 IgG 항체를 사용하여 항-로타바이러스 AVP8 P[13] 항체를 검출하였다.

- [0606] 서열 목록 / 자료 및 지리적 출처(해당하는 경우):
- [0607] 서열번호 1은 미국 노스캐롤라이나주의 한 농장으로부터 공급된 (유전자형 P[7]) 로타바이러스 VP8 단백질의 서열에 상응하며,
- [0608] 서열번호 2는 미국 노스캐롤라이나주의 한 농장으로부터 공급된 (유전자형 P[7]) 로타바이러스 VP8 단백질의 렉틴-유사 도메인의 서열에 상응하며,
- [0609] 서열번호 3은 미국 노스캐롤라이나주의 한 농장으로부터 공급된 (유전자형 P[7]) 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편의 서열에 상응하며,
- [0610] 서열번호 4는 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편의 서열, 즉 로타바이러스 VP8 단백질의 일부의 컨센서스 서열(유전자형 P[6]에 기반함)에 상응하며,
- [0611] 서열번호 5는 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편의 서열, 즉 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편의 일부의 컨센서스 서열(유전자형 P[13]에 기반함)에 상응하며,
- [0612] 서열번호 6은 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편의 서열에 상응하며,
- [0613] 서열번호 7은 돼지 IgG Fc 단편의 서열에 상응하며,
- [0614] 서열번호 8은 기니피그 IgG Fc 단편의 서열에 상응하며,
- [0615] 서열번호 9 (Gly-Gly-Ser)는 링커 모이어티의 서열에 상응하며,
- [0616] 서열번호 10은 링커 모이어티의 서열에 상응하며,
- [0617] 서열번호 11은 링커 모이어티의 서열에 상응하며,
- [0618] 서열번호 12는 서열번호 3, 서열번호 9(Gly-Gly-Ser) 및 서열번호 7의 서열을 포함하는 폴리펩타이드(융합 단백질)의 서열에 상응하며,
- [0619] 서열번호 13은 서열번호 4, 서열번호 9(Gly-Gly-Ser) 및 서열번호 7의 서열을 포함하는 폴리펩타이드(융합 단백질)의 서열에 상응하며,
- [0620] 서열번호 14는 서열번호 5, 서열번호 9(Gly-Gly-Ser) 및 서열번호 7의 서열을 포함하는 폴리펩타이드(융합 단백질)의 서열에 상응하며,
- [0621] 서열번호 15는 서열번호 6, 서열번호 9(Gly-Gly-Ser) 및 서열번호 7의 서열을 포함하는 폴리펩타이드(융합 단백질)의 서열에 상응하며,
- [0622] 서열번호 16은 서열번호 3, 서열번호 9(Gly-Gly-Ser), 서열번호 7, 서열번호 10 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 폴리펩타이드(융합 단백질)의 서열에 상응하며,
- [0623] 서열번호 17은 서열번호 12의 폴리펩타이드(융합 단백질)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 서열에 상응하며,
- [0624] 서열번호 18은 서열번호 13의 폴리펩타이드(융합 단백질)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 서열에 상응하며,
- [0625] 서열번호 19는 서열번호 14의 폴리펩타이드(융합 단백질)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 서열에 상응하며,
- [0626] 서열번호 20은 서열번호 15의 폴리펩타이드(융합 단백질)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 서열에 상응하며,
- [0627] 서열번호 21은 서열번호 16의 폴리펩타이드(융합 단백질)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 서열에 상응하며,
- [0628] 서열번호 22 내지 서열번호 25 : 프라이머 및 프로브 서열(표 5).
- [0629] 하기 항목들도 본원에 개시된다. 따라서, 본 개시내용은 하기 항목들에 의해 특징지어지는 양상을 추가로 포함한다:
- [0630] 1. (i) - 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편, 및
- [0631] - 면역글로불린 Fc 단편
- [0632] 을 포함하는 폴리펩타이드;
- [0633] 및

- [0634] (ii) 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질
- [0635] 을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0636] 2. 항목 1에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결되거나,
- [0637] 상기 면역글로불린 Fc 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 N-말단에 연결되는, 면역원성 조성물.
- [0638] 3. 항목 1 또는 2에 있어서,
- [0639] 상기 면역글로불린 Fc 단편은 링커 모이어티를 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결되거나,
- [0640] 상기 면역글로불린 Fc 단편은 링커 모이어티를 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 N-말단에 연결되는, 면역원성 조성물.
- [0641] 4. 항목 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 상기 면역글로불린 Fc 단편의 N-말단 아미노산 잔기와 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단 아미노산 잔기 사이의 펩타이드 결합을 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결되거나,
- [0642] 상기 면역글로불린 Fc 단편은 상기 면역글로불린 Fc 단편의 C-말단 아미노산 잔기와 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 N-말단 아미노산 잔기 사이의 펩타이드 결합을 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 N-말단에 연결되는, 면역원성 조성물.
- [0643] 5. 항목 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결되는, 면역원성 조성물.
- [0644] 6. 항목 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 링커 모이어티를 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결되거나,
- [0645] 상기 면역글로불린 Fc 단편은 상기 면역글로불린 Fc 단편의 N-말단 아미노산 잔기와 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단 아미노산 잔기 사이의 펩타이드 결합을 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 C-말단에 연결되는, 면역원성 조성물.
- [0646] 7. 항목 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 융합 단백질인, 면역원성 조성물.
- [0647] 8. 항목 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 구조식 x-y-z의 융합 단백질이고, 여기서
- [0648] x는 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편으로 이루어지며;
- [0649] y는 링커 모이어티이고;
- [0650] z는 면역글로불린 Fc 단편인, 면역원성 조성물.
- [0651] 9. 항목 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편이 투여되는 대상체에서 로타바이러스에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는, 면역원성 조성물.
- [0652] 10. 항목 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은 50개 내지 200개, 바람직하게는 140개 내지 190개 아미노산 잔기의 길이인, 면역원성 조성물.
- [0653] 11. 항목 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 로타바이러스는 돼지 로타바이러스인, 면역원성 조성물.
- [0654] 12. 항목 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 상기 로타바이러스는 로타바이러스 A 및 로타바이러스 C로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.
- [0655] 13. 항목 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 상기 로타바이러스는 로타바이러스 A인, 면역원성 조성물.
- [0656] 14. 항목 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 렉틴-유사 도메인을 포함하는, 면역원성 조성물.
- [0657] 15. 항목 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은 로타바이러스

VP8 단백질의 N-말단 연장된 렉틴-유사 도메인이고, 여기서 상기 N-말단 연장은 길이가 1개 내지 20개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 5개 내지 15개의 아미노산 잔기인, 면역원성 조성물.

- [0658] 16. 항목 14 또는 15에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 렉틴-유사 도메인은 로타바이러스 VP8 단백질의 아미노산 잔기 65-224의 아미노산 서열로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0659] 17. 항목 15 또는 16에 있어서, 상기 N-말단 연장부의 아미노산 서열은 상기 로타바이러스 VP8 단백질의 아미노산 서열 내의 렉틴-유사 도메인의 N-말단 아미노산 잔기에 축적하는 각각의 길이의 아미노산 서열인, 면역원성 조성물.
- [0660] 18. 항목 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은
- [0661] 로타바이러스 VP8 단백질의 아미노산 잔기 60-224, 아미노산 잔기 59-224, 아미노산 잔기 58-224, 아미노산 잔기 57-224, 아미노산 잔기 56-224, 아미노산 잔기 55-224, 아미노산 잔기 54-224, 아미노산 잔기 53-224, 아미노산 잔기 52-224, 아미노산 잔기 51-224, 아미노산 잔기 50-224, 또는 아미노산 잔기 49-224의 아미노산 서열로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0662] 19. 항목 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 아미노산 잔기 57-224의 아미노산 서열로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0663] 20. 항목 16 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 아미노산 잔기의 번호매김은 야생형 로타바이러스 VP8 단백질, 특히 야생형 로타바이러스 A VP8 단백질의 아미노산 서열을 지칭하고, 상기 야생형 로타바이러스 VP8은 바람직하게는 서열번호 1에 제시된 단백질인, 면역원성 조성물.
- [0664] 21. 항목 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 상기 로타바이러스는 유전자형 P[7] 로타바이러스, 유전자형 P[6] 로타바이러스 및 유전자형 P[13] 로타바이러스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.
- [0665] 22. 항목 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질은 서열번호 1의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0666] 23. 항목 14 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 렉틴-유사 도메인은 서열번호 2의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0667] 24. 항목 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은 서열번호 3의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0668] 25. 항목 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 일부, 특히 로타바이러스 A VP8 단백질의 일부의 컨센서스 서열로 이루어지거나 이러한 컨센서스 서열이고,
- [0669] 로타바이러스 VP8 단백질 일부의 상기 컨센서스 서열은 바람직하게는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 획득 가능한, 폴리펩타이드:
- [0670] - 로타바이러스 VP8 단백질의 일부를 코딩하는 복수의 뉴클레오타이드 서열을 아미노산 서열로 번역하는 단계,
- [0671] - 바람직하게는 MUSCLE 서열 정렬 소프트웨어 UPGMB 클러스터링 및 디폴트 갭 페널티 파라미터를 사용하여 상기 아미노산 서열을 공지된 로타바이러스 VP8 단백질에 정렬하는 단계,
- [0672] - 상기 정렬된 서열을 계통발생학적 분석에 적용하고 로타바이러스 VP8 단백질 서열에 기반하여 이웃 결합 계통 발생 재구성을 생성하는 단계로서, 특히 계통 발생학적 분석을 위해 상기 정렬된 아미노산 서열을 MEGA7 소프트웨어로 가져오고 로타바이러스 VP8 단백질 서열에 기반하여 이웃 결합 계통발생 재구성을 생성하는 단계,
- [0673] - 계통발생의 부트스트랩 테스트(n=100)와 함께 푸아송 보정 방법을 사용하여 최적의 트리를 계산하는 단계,
- [0674] - 총 170개 위치에 걸쳐 부위당 아미노산 치환 단위의 진화 거리와 동일한 분지 길이를 이용하여 축적에 따라 최적의 트리를 그리는 단계,
- [0675] - 부트스트랩 클러스터 연관성이 70% 초과인 노드를 유의미한 것으로 간주하는 단계,

- [0676] - 약 10%의 거리 및 70% 초과와 부트스트랩 클러스터 연관성을 갖는 노드를 클러스터로서 지정하는 단계,
- [0677] - 클러스터를 선택하고 상기 클러스터 내에서 정렬된 위치당 최대 빈도를 식별하여 컨센서스 서열을 생성하는 단계,
- [0678] - 및 임의로, 동일한 비율의 아미노산이 정렬된 위치에서 관찰되는 경우, 미리 정의된 생성물 보호 프로파일과 함께 보고된 역학 데이터에 기반하여 아미노산 잔기를 선택하는 단계.
- [0679] 26. 항목 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은 서열번호 4 및 서열번호 5로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0680] 27. 항목 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 상기 로타바이러스는 로타바이러스 C인, 면역원성 조성물.
- [0681] 28. 항목 1 내지 27에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편은 서열번호 6의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0682] 29. 항목 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은
- [0683] - 항목 9 내지 24 중 어느 하나 이상에 명시된 바와 같은 로타바이러스 A VP8 단백질의 면역원성 단편, 또는
- [0684] - 항목 9 내지 13, 25 및 26 중 어느 하나에 명시된 바와 같은 로타바이러스 VP8 단백질의 일부, 특히 로타바이러스 A VP8 단백질의 일부의 컨센서스 서열, 또는
- [0685] - 항목 9 내지 12, 27 및 28 중 어느 하나에 명시된 바와 같은 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편이거나 이로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0686] 30. 항목 1 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0687] 31. 항목 1 내지 30 중 어느 하나에 있어서,
- [0688] 상기 면역글로불린 Fc 단편은 길이가 적어도 220개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 길이가 220개 내지 250개의 아미노산 잔기이고/이거나,
- [0689] 상기 면역글로불린 Fc 단편은 비-글리코실화된 것인, 면역원성 조성물.
- [0690] 32. 항목 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄 불변 영역 3(CH3), 및 임의로 면역글로불린의 힌지 영역 또는 상기 힌지 영역의 일부를 포함하거나 이로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0691] 33. 항목 1 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역글로불린은 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.
- [0692] 34. 항목 1 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 장관 세포가 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편이 유래된 로타바이러스에 의한 감염에 민감한 종의 게놈에 의해 코딩된 면역글로불린 Fc 단편인, 면역원성 조성물.
- [0693] 35. 항목 1 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 돼지 IgG Fc 단편인, 면역원성 조성물.
- [0694] 36. 항목 1 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0695] 37. 항목 3 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 상기 링커 모이어티는 길이가 1개 내지 50개의 아미노산 잔기인 아

미노산 서열인, 면역원성 조성물.

- [0696] 38. 항목 3 내지 37 중 어느 하나에 있어서, 상기 링커 모이어티는 서열번호 9(Gly-Gly-Ser), 서열번호 10 및 서열번호 11로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 66%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0697] 39. 항목 5 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 N-말단 아미노산 잔기에 측접하는 N-말단 메티오닌 잔기를 갖는, 면역원성 조성물.
- [0698] 40. 항목 5 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 상기 면역글로불린 Fc 단편의 C-말단에 연결된 로타바이러스 VP8 단백질의 추가 면역원성 단편을 포함하는, 면역원성 조성물.
- [0699] 41. 항목 1 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드는
- [0700] - 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편(1),
- [0701] - 면역글로불린 Fc 단편, 및
- [0702] - 로타바이러스 VP8 단백질의 추가 면역원성 단편(2)을 포함하고,
- [0703] 여기서 상기 면역글로불린 Fc 단편은 상기 면역원성 단편(1)의 C-말단에 연결되고,
- [0704] 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편(2)는 상기 면역글로불린 Fc 단편의 C-말단에 연결되는, 면역원성 조성물.
- [0705] 42. 항목 40 또는 41에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편은
- [0706] - 항목 9 내지 24 중 어느 하나 이상에 명시된 바와 같은 로타바이러스 A VP8 단백질의 면역원성 단편; 또는
- [0707] - 항목 9 내지 13, 25 및 26 중 어느 하나 이상에 명시된 바와 같은 로타바이러스 VP8 단백질의 일부, 특히 로타바이러스 A VP8 단백질의 일부의 컨센서스 서열; 또는
- [0708] - 항목 9 내지 12, 27 및 28 중 어느 하나 이상에 명시된 바와 같은 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편이거나 이로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0709] 43. 항목 40 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편은 서열번호 2 내지 서열번호 6으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고/지거나,
- [0710] 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편은 C-말단이 상기 면역글로불린 Fc 단편에 연결된 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편과 상이한, 면역원성 조성물.
- [0711] 44. 항목 40 내지 43 중 어느 하나에 있어서,
- [0712] 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편은 링커 모이어티를 통해 상기 면역글로불린 Fc 단편의 C-말단에 연결되고, 여기서 상기 링커 모이어티는 바람직하게는 항목 37 또는 38에 명시된 바와 같은 링커 모이어티이거나,
- [0713] 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편은 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 면역원성 단편의 N-말단 아미노산 잔기와 상기 면역글로불린 Fc 단편의 C-말단 아미노산 잔기 사이의 펩타이드 결합을 통해 상기 면역글로불린 Fc 단편의 C-말단에 연결되는, 면역원성 조성물.
- [0714] 45. 항목 1 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드는
- [0715] - 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편, 특히 항목 9 내지 30 중 어느 하나 이상에 명시된 바와 같은 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편,
- [0716] - 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편의 N-말단 아미노산 잔기에 측접하는 N-말단 메티오닌 잔기, 및
- [0717] - 면역글로불린 Fc 단편, 특히 항목 31 내지 36 중 어느 하나 이상에 명시된 바와 같은 면역글로불린 Fc 단편으로서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 특히 링커 모이어티를 통해 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편

의 C-말단에 연결되며, 상기 링커 모이어티는 바람직하게는 항목 37 또는 38에 명시된 링커 모이어티인, 번역글로볼린 Fc 단편,

- [0718] - 및 임의로, 특히 링커 모이어티를 통해 상기 번역글로볼린 Fc 단편의 C-말단에 연결된 로타바이러스 VP8 단백질의 추가 번역원성 단편으로서, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 추가 번역원성 단편은 바람직하게는 항목 41 내지 44의 어느 하나 이상에 명시된 바와 같은 추가 번역원성 단편이고, 상기 링커 모이어티는 바람직하게는 항목 37 또는 38에 명시된 바와 같은 링커 모이어티인, 로타바이러스 VP8 단백질의 추가 번역원성 단편
- [0719] 으로 이루어지는, 번역원성 조성물.
- [0720] 46. 항목 1 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15 및 서열번호 16으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질인, 번역원성 조성물.
- [0721] 47. 항목 1 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 재조합 단백질, 특히 재조합 배큘로바이러스 발현 단백질인, 번역원성 조성물.
- [0722] 48. 항목 1 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 추가의 동일한 폴리펩타이드와 동종이량체를 형성하는, 번역원성 조성물.
- [0723] 49. 항목 1 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 성분(i)은 복수의 상기 폴리펩타이드를 포함하거나 이로 이루어진 다량체로 존재하고, 상기 다량체는 바람직하게는 상기 폴리펩타이드와 동일한 추가의 폴리펩타이드에 의해 형성된 동종이량체인, 번역원성 조성물.
- [0724] 50. 항목 1 내지 49 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 번역원성 물질은 2개 이상의 번역원성 물질로 구성되고, 모든 상기 번역원성 물질은
- [0725] 상기 폴리펩타이드와 상이하고,
- [0726] 서로 상이한, 번역원성 조성물.
- [0727] 51. 항목 1 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 번역원성 물질은 상기 번역원성 단편과 상이한 레오바이러스 항원을 포함하는 적어도 하나의 번역원성 물질인, 번역원성 조성물.
- [0728] 52. 항목 1 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 번역원성 물질은 2개 이상의 번역원성 물질로 이루어지고, 각각의 상기 물질은 레오바이러스 항원을 포함하고, 모든 상기 레오바이러스 항원은 상기 번역원성 단편과 상이하고 서로 상이한, 번역원성 조성물.
- [0729] 53. 항목 1 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 번역원성 물질은 상기 번역원성 단편과 상이한 레오바이러스 항원을 포함하는 적어도 하나의 단백질인, 번역원성 조성물.
- [0730] 54. 항목 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 번역원성 물질은 2개 이상의 단백질로 이루어지고, 각각의 상기 단백질은 레오바이러스 항원을 포함하고, 모든 상기 레오바이러스 항원은 상기 번역원성 단편과 상이하고 서로 상이한, 번역원성 조성물.
- [0731] 55. 항목 1 내지 54 중 어느 하나에 있어서, 성분(ii)는 성분(i)의 상기 번역원성 단편과 상이한 로타바이러스 항원을 포함하는 적어도 하나의 번역원성 물질로 이루어지는, 번역원성 조성물.
- [0732] 56. 항목 1 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 성분(ii)는 2개 이상의 번역원성 물질로 이루어지고, 각각의 상기 물질은 로타바이러스 항원을 포함하고, 모든 상기 로타바이러스 항원은 성분(i)의 상기 번역원성 단편과 상이하고 서로 상이한, 번역원성 조성물.
- [0733] 57. 항목 1 내지 56 중 어느 하나에 있어서, 성분(ii)는 성분(i)의 상기 번역원성 단편과 상이한 로타바이러스 항원을 포함하는 적어도 하나의 단백질로 이루어지는, 번역원성 조성물.
- [0734] 58. 항목 1 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 성분(ii)는 2개 이상의 단백질로 이루어지고, 각각의 상기 단백질은 로타바이러스 항원을 포함하고, 모든 상기 로타바이러스 항원은 성분(i)의 상기 번역원성 단편과 상이하고 서로 상이한, 번역원성 조성물.
- [0735] 59. 항목 1 내지 58 중 하나 이상에 있어서,

- [0736] 상기 폴리펩타이드는 제1 폴리펩타이드이고;
- [0737] 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 상기 제1 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 추가 폴리펩타이드인, 면역원성 조성물.
- [0738] 60. 항목 59에 있어서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은
- [0739] - 상기 제1 폴리펩타이드와 상이한 제2 폴리펩타이드를 포함하거나 이러한 폴리펩타이드이고,
- [0740] 바람직하게는 상기 제1 및 제2 폴리펩타이드 둘 다와 상이한 제3 폴리펩타이드를 포함하고,
- [0741] 임의로 상기 제1 내지 제3 폴리펩타이드 모두와 상이한 제4 폴리펩타이드를 포함하는, 면역원성 조성물.
- [0742] 61. 항목 59 또는 60에 있어서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은
- [0743] - 상기 면역원성 단편과 상이한 레오바이러스 항원을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하거나 이러한 폴리펩타이드이고,
- [0744] 바람직하게는 상기 제1 및 제2 폴리펩타이드 둘 다와 상이한 제3 폴리펩타이드를 포함하고,
- [0745] 임의로 상기 제1 내지 제3 폴리펩타이드 모두와 상이한 제4 폴리펩타이드를 포함하는, 면역원성 조성물.
- [0746] 62. 항목 61에 있어서, 상기 제3 폴리펩타이드는 상기 면역원성 단편과 제2 폴리펩타이드의 레오바이러스 항원 둘 다와 상이한 레오바이러스 항원을 포함하고,
- [0747] 임의로 상기 제4 폴리펩타이드는
- [0748] - 상기 면역원성 단편,
- [0749] - 제2 폴리펩타이드의 레오바이러스 항원 및
- [0750] - 제3 폴리펩타이드의 레오바이러스 항원
- [0751] 모두와 상이한 레오바이러스 항원을 포함하는, 면역원성 조성물.
- [0752] 63. 항목 51 내지 54 및 61 내지 62 중 하나 이상에 있어서, 상기 레오바이러스 항원은 로타바이러스 항원이고, 상기 레오바이러스 항원은 각각 로타바이러스 항원인, 면역원성 조성물.
- [0753] 64. 항목 60 내지 63 중 하나 이상에 있어서,
- [0754] 상기 제2 폴리펩타이드는 항목 1 내지 49 중 어느 하나에 명시된 폴리펩타이드이고, 상기 제2 펩타이드는 상기 제1 폴리펩타이드와 상이하고,
- [0755] 바람직하게는 상기 제3 폴리펩타이드는 항목 1 내지 49 중 어느 하나에 명시된 폴리펩타이드이고, 상기 제3 폴리펩타이드는 상기 제1 및 제2 폴리펩타이드와 상이하고,
- [0756] 임의로 상기 제4 폴리펩타이드는 항목 1 내지 49 중 어느 하나에 명시된 폴리펩타이드이고, 상기 제4 폴리펩타이드는 상기 제1 내지 제3 폴리펩타이드 모두와 상이한, 면역원성 조성물.
- [0757] 65. 항목 1 내지 64 중 하나 이상에 있어서,
- [0758] 상기 폴리펩타이드는
- [0759] - 로타바이러스 VP8 단백질의 제1 면역원성 단편, 및
- [0760] - 면역글로불린 Fc 단편
- [0761] 을 포함하는 제1 폴리펩타이드이고,
- [0762] 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은
- [0763] 로타바이러스 VP8 단백질의 제2 면역원성 단편을 포함하는 제2 폴리펩타이드로서, 상기 제2 면역원성 단편은 상기 제1 면역원성 단편과 상이한, 제2 폴리펩타이드,
- [0764] 및 바람직하게는 로타바이러스 VP8 단백질의 제3 면역원성 단편을 포함하는 제3 폴리펩타이드로서, 상기 제3 면역원성 단편은 상기 제1 및 제2 면역원성 단편 모두와 상이한, 제3 폴리펩타이드,

- [0765] 및 임의로 로타바이러스 VP8 단백질의 제4 면역원성 단편을 포함하는 제4 폴리펩타이드로서, 상기 제4 면역원성 단편은 상기 제1 내지 제3 면역원성 단편 모두와 상이한, 제4 폴리펩타이드
- [0766] 를 포함하거나 이로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0767] 66. 항목 65에 있어서, 상기 제2 내지 제4 면역원성 단편 각각은
- [0768] - 항목 9 내지 24 중 어느 하나 이상에 명시된 면역원성 단편,
- [0769] - 로타바이러스 VP8 단백질의 일부, 특히 항목 9 내지 13, 25 및 26 중 어느 하나 이상에 명시된 로타바이러스 A VP8 단백질의 일부의 컨센서스 서열,
- [0770] 및
- [0771] - 항목 9 내지 12, 27 및 28 중 어느 하나 이상에 명시된 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편
- [0772] 으로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,
- [0773] 특히, 단 상기 제2 내지 제4 면역원성 단편 모두는 상기 제1 면역원성 단편과 상이하고 서로 상이한, 면역원성 조성물.
- [0774] 67. 항목 65 또는 66에 있어서,
- [0775] 상기 제1 면역원성 단편은 **X7**, **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나,
- [0776] 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**, **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나,
- [0777] 상기 제3 면역원성 단편은 **X7**, **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나,
- [0778] 상기 제4 면역원성 단편은 **X7**, **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;
- [0779] **X7**은 유전자형 P[7] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 나타내고,
- [0780] **X13**은 유전자형 P[13] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 나타내고,
- [0781] **X6**은 유전자형 P[6] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편을 나타내고,
- [0782] **XC**는 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편을 나타내는, 면역원성 조성물.
- [0783] 68. 항목 67에 있어서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은
- [0784] 로타바이러스 VP8 단백질의 제2 면역원성 단편을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하거나 이러한 폴리펩타이드 이고,
- [0785] 상기 제1 및 제2 면역원성 단편 각각은 **X7**, **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,
- [0786] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X7**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0787] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X6**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**, **X13** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0788] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X13**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0789] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **XC**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**, **X13** 및 **X6**로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.
- [0790] 69. 항목 67 또는 68에 있어서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은
- [0791] 로타바이러스 VP8 단백질의 제2 면역원성 단편을 포함하는 제2 폴리펩타이드, 및
- [0792] 로타바이러스 VP8 단백질의 제3 면역원성 단편을 포함하는 제3 폴리펩타이드
- [0793] 를 포함하거나 이로 이루어지고,
- [0794] 상기 제1 내지 제3 면역원성 단편 각각은 **X7**, **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,

- [0795] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X7**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X13**이고 상기 제3 면역원성 단편은 **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0796] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X6**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**이고 상기 제3 면역원성 단편은 **X13** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0797] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X13**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**이고 상기 제3 면역원성 단편은 **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0798] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **XC**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**이고 상기 제3 면역원성 단편은 **X13** 및 **X6**으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.
- [0799] 70. 항목 67 내지 69 중 하나 이상에 있어서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은
- [0800] 로타바이러스 VP8 단백질의 제2 면역원성 단편을 포함하는 제2 폴리펩타이드, 및
- [0801] 로타바이러스 VP8 단백질의 제3 면역원성 단편을 포함하는 제3 폴리펩타이드, 및
- [0802] 로타바이러스 VP8 단백질의 제4 면역원성 단편을 포함하는 제4 폴리펩타이드
- [0803] 를 포함하거나 이로 이루어지고,
- [0804] 상기 제1 내지 제4 면역원성 단편 각각은 **X7**, **X13**, **X6** 및 **XC**로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,
- [0805] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X7**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X13**이고, 상기 제3 면역원성 단편은 **X6**이고 상기 제4 면역원성 단편은 **XC**이고,
- [0806] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X6**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**이고, 상기 제3 면역원성 단편은 **X13**이고 상기 제4 면역원성 단편은 **XC**이고,
- [0807] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **X13**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**이고, 상기 제3 면역원성 단편은 **X6**이고 상기 제4 면역원성 단편은 **XC**이고,
- [0808] 단, 상기 제1 면역원성 단편이 **XC**인 경우, 상기 제2 면역원성 단편은 **X7**이고, 상기 제3 면역원성 단편은 **X13**이고 상기 제4 면역원성 단편은 **X6**인, 면역원성 조성물.
- [0809] 71. 항목 67 내지 70 중 하나 이상에 있어서,
- [0810] **X7**은 서열번호 3의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고/지거나,
- [0811] **X13**은 서열번호 5의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고/지거나,
- [0812] **X6**은 서열번호 4의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고/지거나,
- [0813] **XC**는 서열번호 6의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0814] 72. 항목 65 내지 71 중 하나 이상에 있어서, 상기 제1 면역원성 단편은 유전자형 P[7] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편이고,
- [0815] 상기 제2 면역원성 단편은 유전자형 P[13] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편이고,
- [0816] 바람직하게는 상기 제3 면역원성 단편은 유전자형 P[6] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편이고,
- [0817] 임의로 상기 제4 면역원성 단편은 로타바이러스 C VP8 단백질의 면역원성 단편인, 면역원성 조성물.
- [0818] 73. 항목 65 내지 72 중 하나 이상에 있어서,
- [0819] 상기 제1 면역원성 단편은 서열번호 3의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고,
- [0820] 상기 제2 면역원성 단편 서열번호 5의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도

98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고,

- [0821] 바람직하게는 상기 제3 면역원성 단편은 서열번호 4의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고
- [0822] 임의로 상기 제4 면역원성 단편은 서열번호 6의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0823] 74. 항목 59 내지 73 중 하나 이상에 있어서,
- [0824] 상기 제1 폴리펩타이드는 **R7**, **R13**, **R6** 및 **RC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나,
- [0825] 상기 제2 폴리펩타이드는 **R7**, **R13**, **R6** 및 **RC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나,
- [0826] 상기 제3 폴리펩타이드는 **R7**, **R13**, **R6** 및 **RC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나,
- [0827] 상기 제4 폴리펩타이드는 **R7**, **R13**, **R6** 및 **RC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;
- [0828] 여기서,
- [0829] **R7**은 서열번호 12로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고,
- [0830] **R13**은 서열번호 14로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고,
- [0831] **R6**은 서열번호 13으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질이고,
- [0832] **RC**는 서열번호 15로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질인, 면역원성 조성물.
- [0833] 75. 항목 59 내지 74 중 하나 이상에 있어서,
- [0834] 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 로타바이러스 VP8 단백질의 제2 폴리펩타이드이고,
- [0835] 상기 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은 **R7**, **R13**, **R6** 및 **RC**로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,
- [0836] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 **R7**인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 **R13**, **R6** 및 **RC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0837] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 **R6**인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 **R7**, **R13** 및 **RC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0838] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 **R13**인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 **R7**, **R6** 및 **RC**로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0839] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 **RC**인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 **R7**, **R13** 및 **R6**으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.
- [0840] 76. 항목 74 또는 75에 있어서,
- [0841] 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은 로타바이러스 VP8 단백질의 제2 폴리펩타이드를 포함하거나 이로 이루어지고,
- [0842] 상기 제1 및 제2 폴리펩타이드 각각은 **R7**, **R13** 및 **R6**으로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,
- [0843] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 **R7**인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 **R13** 및 **R6**으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

- [0844] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R6인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7 및 R13로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0845] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R13인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7 및 R6으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.
- [0846] 77. 항목 74 내지 76 중 하나 이상에 있어서,
- [0847] 상기 제1 폴리펩타이드는 R7이고 상기 제2 폴리펩타이드는 R13 및 R6로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.
- [0848] 78. 항목 74 내지 77 중 하나 이상에 있어서,
- [0849] 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은
- [0850] 제2 폴리펩타이드, 및
- [0851] 제3 폴리펩타이드를 포함하거나 이로 이루어지고,
- [0852] 상기 제1 내지 제3 폴리펩타이드 각각은 R7, R13, R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,
- [0853] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R7인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R13이고 상기 제3 폴리펩타이드는 R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0854] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R6인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고 상기 제3 폴리펩타이드는 R13 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0855] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R13인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고 상기 제3 폴리펩타이드는 R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- [0856] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 RC인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고 상기 제3 폴리펩타이드는 R13 및 R6으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.
- [0857] 79. 항목 74 내지 78 중 하나 이상에 있어서,
- [0858] 상기 제1 폴리펩타이드는 R7이고,
- [0859] 상기 제2 폴리펩타이드는 R13이고,
- [0860] 상기 제3 폴리펩타이드는 R6 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.
- [0861] 80. 항목 74 내지 79 중 하나 이상에 있어서,
- [0862] 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은
- [0863] 제2 폴리펩타이드, 및
- [0864] 제3 폴리펩타이드를 포함하거나 이로 이루어지고,
- [0865] 상기 제1 내지 제3 폴리펩타이드 각각은 R7, R13 및 R6으로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,
- [0866] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R7인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R13이고 상기 제3 폴리펩타이드는 R6이고,
- [0867] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R6인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고 상기 제3 폴리펩타이드는 R13이고,
- [0868] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R13인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고 상기 제3 폴리펩타이드는 R6인, 면역원성 조성물.
- [0869] 81. 항목 74 내지 80 중 하나 이상에 있어서,
- [0870] 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질은
- [0871] 제2 폴리펩타이드, 및
- [0872] 제3 폴리펩타이드, 및
- [0873] 제4 폴리펩타이드를 포함하거나 이로 이루어지고,

- [0874] 상기 제1 내지 제4 폴리펩타이드 각각은 R7, R6, R13 및 RC로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 선택되고,
- [0875] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R7인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R13이고, 상기 제3 폴리펩타이드는 R6이고 상기 제4 폴리펩타이드는 RC이고,
- [0876] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R6인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고, 상기 제3 폴리펩타이드는 R13이고 상기 제4 폴리펩타이드는 RC이고,
- [0877] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 R13인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고, 상기 제3 폴리펩타이드는 R6이고 상기 제4 폴리펩타이드는 RC이고,
- [0878] 단, 상기 제1 폴리펩타이드가 RC인 경우, 상기 제2 폴리펩타이드는 R7이고, 상기 제3 폴리펩타이드는 R13이고 상기 제4 폴리펩타이드는 R6인, 면역원성 조성물.
- [0879] 82. 항목 74 내지 81 중 하나 이상에 있어서,
- [0880] 상기 제1 폴리펩타이드는 R7이고,
- [0881] 상기 제2 폴리펩타이드는 R13이고,
- [0882] 상기 제3 폴리펩타이드는 R6이고,
- [0883] 상기 제4 폴리펩타이드는 RC인, 면역원성 조성물.
- [0884] 83. 면역원성 조성물, 특히
- [0885] - 서열번호 12의 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질, 및
- [0886] - 서열번호 14, 서열번호 13 및 서열번호 15로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질
- [0887] 을 포함하는 항목 1 내지 82 중 어느 하나의 면역원성 조성물.
- [0888] 84. 면역원성 조성물, 특히
- [0889] - 서열번호 12의 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질, 및
- [0890] - 서열번호 14의 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질
- [0891] 을 포함하는 항목 1 내지 83 중 어느 하나의 면역원성 조성물.
- [0892] 85. 항목 84에 있어서,
- [0893] - 서열번호 13으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질
- [0894] 을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0895] 86. 항목 84 또는 85에 있어서,
- [0896] - 서열번호 15로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질
- [0897] 을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0898] 87. 항목 1 내지 86 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역원성 조성물은 약제학적으로 또는 수의학적으로 허용되는

담체 또는 부형제를 추가로 포함하는, 면역원성 조성물.

- [0899] 88. 항목 1 내지 87 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역원성 조성물은 보조제를 추가로 포함하는, 면역원성 조성물.
- [0900] 89. 항목 1 내지 88 중 어느 하나에 있어서,
- [0901] - 약제학적으로 또는 수의학적으로 허용되는 담체 또는 부형제,
- [0902] - 및 임으로 보조제
- [0903] 를 포함하는 면역원성 조성물.
- [0904] 90. 항목 88 또는 89에 있어서, 보조제는 유화된 수중유 보조제인, 면역원성 조성물.
- [0905] 91. 항목 88 또는 89에 있어서, 상기 보조제는 카보머인, 면역원성 조성물.
- [0906] 92. 약제, 바람직하게는 백신의 제조를 위한 항목 1 내지 91 중 어느 하나의 면역원성 조성물의 용도.
- [0907] 93. 약제로서 사용하기 위한 항목 1 내지 91 중 어느 하나의 면역원성 조성물의 용도.
- [0908] 94. 백신으로서 사용하기 위한 항목 1 내지 91 중 어느 하나의 면역원성 조성물의 용도.
- [0909] 95. 대상체에서 로타바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 사용하기 위한 항목 1 내지 91 중 어느 하나의 면역원성 조성물.
- [0910] 96. 대상체에서 로타바이러스 감염에 의해 야기되는 하나 이상의 임상 징후, 사망률 또는 분변 배출을 감소시키거나 예방하는 방법에 사용하기 위한, 또는 대상체에서 로타바이러스에 의한 감염을 치료하거나 예방하는 방법에 사용하기 위한 항목 1 내지 91 중 어느 하나의 면역원성 조성물.
- [0911] 97. 항목 95 또는 96에 있어서, 대상체는 포유동물 또는 조류이고, 조류는 바람직하게는 닭인, 면역원성 조성물.
- [0912] 98. 항목 95 내지 97 중 어느 하나에 있어서, 대상체는 포유동물이고, 상기 포유동물은 바람직하게는 돼지 또는 소인, 면역원성 조성물.
- [0913] 99. 항목 95 내지 98 중 어느 하나에 있어서, 대상체는 돼지이고, 상기 돼지는 바람직하게는 자돈 또는 모돈인, 면역원성 조성물.
- [0914] 100. 항목 95에 있어서, 대상체는 임신한 모돈인, 면역원성 조성물.
- [0915] 101. 항목 96에 있어서, 대상체는 자돈인, 면역원성 조성물.
- [0916] 102. 항목 1 내지 91 중 어느 하나에 있어서, 자돈에서 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후, 사망률 또는 분변 배출을 감소시키거나 예방하는 방법에 사용하기 위한 면역원성 조성물로서, 상기 자돈은 상기 면역원성 조성물을 투여받은 모돈에 의해 수유되는, 면역원성 조성물.
- [0917] 103. 항목 102에 있어서, 상기 면역원성 조성물을 투여받은 모돈은 특히 상기 자돈을 임신한 동안 상기 면역원성 조성물을 투여받은 모돈인, 면역원성 조성물.
- [0918] 104. 항목 1 내지 91 중 어느 하나의 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 로타바이러스 감염의 치료 또는 예방, 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후, 사망률 또는 분변 배출의 감소, 예방 또는 치료, 또는 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료를 위한 방법.
- [0919] 105. 모돈에서 로타바이러스에 특이적인 항체의 생산을 유도하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 모돈에게 항목 1 내지 91 중 어느 하나의 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 방법.
- [0920] 106. 자돈에서 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후, 사망률 또는 분변 배출을 감소시키거나 예방하는 방법으로서, 상기 방법은
- [0921] - 항목 1 내지 91 중 어느 하나의 면역원성 조성물을 모돈에 투여하는 단계, 및
- [0922] - 상기 자돈이 상기 모돈에 의해 수유되도록 하는 단계
- [0923] 를 포함하는, 방법.

- [0924] 107. 항목 106에 있어서, 상기 모돈은 특히 상기 자돈을 임신한 모돈인, 방법.
- [0925] 108. 항목 106 또는 107에 있어서,
- [0926] - 항목 1 내지 91 중 어느 하나의 면역원성 조성물을 상기 자돈을 임신한 모돈에게 투여하는 단계,
- [0927] - 상기 모돈이 상기 자돈을 출산하도록 허용하는 단계, 및
- [0928] - 상기 자돈이 상기 모돈에 의해 수유되도록 하는 단계
- [0929] 를 포함하는, 방법.
- [0930] 109. 자돈에서 로타바이러스 감염에 의해 유발되는 하나 이상의 임상 징후, 사망물 또는 분변 배출을 감소시키는 방법으로서, 상기 자돈은 항목 1 내지 91 중 어느 하나의 면역원성 조성물을 투여받은 모돈에 의해 수유되는, 방법.
- [0931] 110. 항목 96 내지 103 중 어느 하나에 따른 면역원성 조성물 또는 항목 104 내지 109 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 하나 이상의 임상 징후는
- [0932] - 설사,
- [0933] - 로타바이러스 콜로니화,
- [0934] - 병변, 특히 육안적 병변,
- [0935] - 1일 평균 체중 증가량 감소 및
- [0936] - 위장염.
- [0937] 으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역원성 조성물 또는 방법.
- [0938] 111. 항목 110에 따른 면역원성 조성물 또는 항목 110의 방법으로서, 상기 로타바이러스 콜로니화는 장관의 로타바이러스 콜로니화이고/이거나 상기 병변은 장 병변인, 면역원성 조성물 또는 방법.
- [0939] 112. 항목 95 내지 103, 110 및 111 중 어느 하나에 따른 면역원성 조성물 또는 항목 104 내지 111 중 어느 하나의 방법으로서,
- [0940] - 상기 로타바이러스 감염은 유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 의한 감염이거나,
- [0941] - 상기 로타바이러스에 의한 감염은 유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 의한 감염이거나,
- [0942] - 상기 로타바이러스에 대한 면역 반응은 유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 대한 면역 반응이거나,
- [0943] - 상기 로타바이러스에 특이적인 항체는 유전자형 P[23] 로타바이러스 및/또는 유전자형 P[7] 로타바이러스에 특이적인 항체인,
- [0944] 면역원성 조성물 또는 방법.
- [0945] 113. 항목 112에 있어서, 상기 면역원성 조성물은 항목 21 내지 26 및 29 내지 48 중 어느 하나에 명시된 폴리펩타이드를 포함하고, 로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은 유전자형 P[7] 로타바이러스 VP8 단백질의 면역원성 단편인, 면역원성 조성물 또는 방법.
- [0946] 114. 항목 113에 따른 면역원성 조성물로서, 유전자형 P[7]로타바이러스 VP8 단백질의 상기 면역원성 단편은 서열번호 3의 서열과 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 보다 더욱 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, 면역원성 조성물.
- [0947] 115. 항목 1 내지 91 중 어느 하나의 면역원성 조성물의 제조 방법으로서, 상기 방법은
- [0948] (a) 배양물 중의 감수성 세포를 항목 1 내지 48 중 어느 하나에 명시된 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터로 감염되도록 허용하는 단계로서, 상기 폴리펩타이드는 상기 벡터에 의해 발현되는, 단계;
- [0949] (b) 이후 상기 폴리펩타이드를, 특히 세포 배양 상청액에서 회수하는 단계로서, 바람직하게는 세포 파편은 바람

직하게는 적어도 하나의 필터, 바람직하게는 2개의 필터를 통한 미세 여과를 포함하는 분리 단계를 통해 상기 폴리펩타이드로부터 분리되고, 상기 적어도 하나의 필터는 바람직하게는 약 1 μ m 내지 약 20 μ m 및/또는 약 0.1 μ m 내지 약 4 μ m의 공극 크기를 갖는, 단계;

[0950] (c) 단계(b)의 혼합물에 이원 에틸렌아민(BEI)을 첨가하여 상기 벡터를 불활성화시키는 단계;

[0951] (d) 단계(c)로부터 생성된 혼합물에 티오황산나트륨을 첨가하여 BEI를 중화하는 단계; 및

[0952] (e) 약 5kDa 내지 약 100kDa, 바람직하게는 약 10kDa 내지 약 50kDa의 분자량 컷오프를 갖는 필터 막을 갖는 필터를 사용하는 여과 단계에 의해 상기 혼합물로부터 액체의 일부를 제거함으로써 단계(d)로부터 생성된 혼합물에서 폴리펩타이드를 농축시키는 단계

[0953] 를 포함하고,

[0954] 상기 방법은

[0955] (f) 단계(e) 후에 잔류하는 혼합물을 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질과 혼합하는 단계; 및

[0956] (g) 임의로 단계(f) 후에 잔류하는 혼합물을 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제, 희석제, 부형제 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 추가 성분과 혼합하는 단계를 포함하거나,

[0957] 상기 방법은

[0958] (f) 단계(e) 후에 잔류하는 혼합물을 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제, 희석제, 부형제 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 추가 성분과 혼합하는 단계 및

[0959] (g) 단계(f) 후에 잔류하는 혼합물을 상기 폴리펩타이드와 상이한 적어도 하나의 면역원성 물질과 혼합하는 단계

[0960] 를 포함하는, 방법.

[0961] 116. 항목 115에 있어서, 적어도 하나의 면역원성 물질은 항목 50 내지 76 중 어느 하나에 명시된 적어도 하나의 면역원성 물질인, 방법.

[0962] 117. 항목 115 또는 116에 있어서, 단계(a)에서 항목 1 내지 48 중 어느 하나에 명시된 폴리펩티드는 서열번호 12로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질인, 방법.

[0963] 118. 항목 115 내지 117 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩타이드와 상이한 상기 적어도 하나의 면역원성 물질은

[0964] 서열번호 14로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질,

[0965] 서열번호 13으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질, 및

[0966] 서열번호 15로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 특히 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 단백질

[0967] 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 단백질인, 방법.

[0968] 119. 항목 1 내지 91, 93 내지 103 및 110 내지 114 중 어느 하나에 따른 면역원성 조성물, 항목 92의 용도, 또는 항목 104 내지 112, 113 및 114 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 면역원성 조성물은 항목 115 내지 118 중 어느 하나의 방법에 의해 수득 가능한, 면역원성 조성물, 용도, 또는 방법.

SEQUENCE LISTING

<110> Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH
 <120> Immunogenic composition useful for vaccination against rotavirus
 <130> 23-0015
 <160> 25
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Rotavirus

<400> 1

Met Ala Ser Leu Ile Tyr Arg Gln Leu Leu Thr Asn Ser Tyr Thr Val
 1 5 10 15

Asn Leu Ser Asp Glu Ile Gln Glu Ile Gly Ser Ala Lys Ser Gln Asp
 20 25 30

Val Thr Ile Asn Pro Gly Pro Phe Ala Gln Thr Gly Tyr Ala Pro Val
 35 40 45

Asn Trp Gly Ala Gly Glu Thr Asn Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro Leu
 50 55 60

Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr Thr Phe Asn Pro Pro Thr Ser Tyr
 65 70 75 80

Trp Val Leu Leu Ala Pro Thr Val Glu Gly Val Ile Ile Gln Gly Thr
 85 90 95

Asn Asn Thr Asp Arg Trp Leu Ala Thr Ile Leu Ile Glu Pro Asn Val
 100 105 110

Gln Thr Thr Asn Arg Ile Tyr Asn Leu Phe Gly Gln Gln Val Thr Leu
 115 120 125

Ser Val Glu Asn Thr Ser Gln Thr Gln Trp Lys Phe Ile Asp Val Ser
 130 135 140

[0969]

Thr Thr Thr Pro Thr Gly Ser Tyr Thr Gln His Gly Pro Leu Phe Ser
145 150 155 160

Thr Pro Lys Leu Tyr Ala Val Met Lys Phe Ser Gly Arg Ile Tyr Thr
165 170 175

Tyr Ser Gly Thr Thr Pro Asn Ala Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr
180 185 190

Asn Tyr Asp Thr Val Asn Met Thr Ser Phe Cys Asp Phe Tyr Ile Ile
195 200 205

Pro Arg Asn Gln Glu Glu Lys Cys Thr Glu Tyr Ile Asn His Gly Leu
210 215 220

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

Arg Glu Ile Val His Thr Arg
245

<210> 2
<211> 160
<212> PRT
<213> Rotavirus

<400> 2

Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr Thr Phe Asn Pro Pro Thr Ser Tyr
1 5 10 15

Trp Val Leu Leu Ala Pro Thr Val Glu Gly Val Ile Ile Gln Gly Thr
20 25 30

Asn Asn Thr Asp Arg Trp Leu Ala Thr Ile Leu Ile Glu Pro Asn Val
35 40 45

Gln Thr Thr Asn Arg Ile Tyr Asn Leu Phe Gly Gln Gln Val Thr Leu
50 55 60

Ser Val Glu Asn Thr Ser Gln Thr Gln Trp Lys Phe Ile Asp Val Ser
65 70 75 80

[0970]

Thr Thr Thr Pro Thr Gly Ser Tyr Thr Gln His Gly Pro Leu Phe Ser
85 90 95

Thr Pro Lys Leu Tyr Ala Val Met Lys Phe Ser Gly Arg Ile Tyr Thr
100 105 110

Tyr Ser Gly Thr Thr Pro Asn Ala Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr
115 120 125

Asn Tyr Asp Thr Val Asn Met Thr Ser Phe Cys Asp Phe Tyr Ile Ile
130 135 140

Pro Arg Asn Gln Glu Glu Lys Cys Thr Glu Tyr Ile Asn His Gly Leu
145 150 155 160

<210> 3
<211> 168
<212> PRT
<213> Rotavirus

<400> 3

Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro Leu Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr
1 5 10 15

Thr Phe Asn Pro Pro Thr Ser Tyr Trp Val Leu Leu Ala Pro Thr Val
20 25 30

Glu Gly Val Ile Ile Gln Gly Thr Asn Asn Thr Asp Arg Trp Leu Ala
35 40 45

Thr Ile Leu Ile Glu Pro Asn Val Gln Thr Thr Asn Arg Ile Tyr Asn
50 55 60

Leu Phe Gly Gln Gln Val Thr Leu Ser Val Glu Asn Thr Ser Gln Thr
65 70 75 80

Gln Trp Lys Phe Ile Asp Val Ser Thr Thr Thr Pro Thr Gly Ser Tyr
85 90 95

Thr Gln His Gly Pro Leu Phe Ser Thr Pro Lys Leu Tyr Ala Val Met

[0971]

100 105 110
 Lys Phe Ser Gly Arg Ile Tyr Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Pro Asn Ala
 115 120 125
 Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Asn Tyr Asp Thr Val Asn Met Thr
 130 135 140
 Ser Phe Cys Asp Phe Tyr Ile Ile Pro Arg Asn Gln Glu Glu Lys Cys
 145 150 155 160
 Thr Glu Tyr Ile Asn His Gly Leu
 165
 <210> 4
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Rotavirus consensus sequence
 <400> 4
 Asp Ser Thr Thr Ile Glu Pro Val Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Phe Lys Pro Pro Asn Asp Tyr Trp Ile Leu Leu Asn Pro Thr Asn
 20 25 30
 Gln Gln Ile Val Leu Glu Gly Thr Asn Arg Thr Asp Val Trp Val Ala
 35 40 45
 Leu Leu Leu Ile Glu Pro Asn Val Thr Asn Gln Ser Arg Gln Tyr Thr
 50 55 60
 Leu Phe Gly Glu Thr Lys Gln Ile Thr Val Glu Asn Asn Thr Asn Lys
 65 70 75 80
 Trp Lys Phe Phe Glu Met Phe Arg Asn Ser Ala Asn Ala Glu Phe Gln
 85 90 95
 His Lys Arg Thr Leu Thr Ser Asp Thr Lys Leu Ala Gly Phe Leu Lys

[0972]

100 105 110

His Gly Gly Arg Val Trp Thr Phe His Gly Glu Thr Pro Asn Ala Thr
115 120 125

Thr Asp Tyr Ser Ser Thr Ser Asn Leu Ser Glu Ile Glu Thr Val Ile
130 135 140

His Thr Glu Phe Tyr Ile Ile Pro Arg Ser Gln Glu Ser Lys Cys Asn
145 150 155 160

Glu Tyr Ile Asn Thr Gly Leu
165

<210> 5
<211> 170
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Rotavirus consensus sequence

<400> 5

Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro Val Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr
1 5 10 15

Thr Phe Asn Pro Pro Ile Glu Tyr Trp Thr Leu Phe Ala Pro Asn Asp
20 25 30

Lys Gly Val Val Ala Glu Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Trp Leu Ala
35 40 45

Ile Ile Leu Ile Glu Pro Asn Val Pro Gln Glu Leu Arg Thr Tyr Thr
50 55 60

Ile Phe Gly Gln Gln Val Asn Leu Val Ile Glu Asn Thr Ser Gln Thr
65 70 75 80

Lys Trp Lys Phe Ala Asp Phe Arg Arg Arg Ser Gln Asn Asp Thr Tyr
85 90 95

Val Leu Asn Asp Thr Leu Leu Ser Asp Thr Lys Leu Gln Ala Ala Met

[0973]

100 105 110
 Lys Tyr Gly Ala Arg Leu Phe Thr Phe Thr Gly Asp Thr Pro Asn Ala
 115 120 125
 Ala Pro Gln Glu Tyr Gly Tyr Glu Thr Asn Asn Tyr Ser Ala Ile Glu
 130 135 140
 Ile Arg Ser Phe Cys Asp Phe Tyr Ile Ile Pro Arg Met Pro Arg Glu
 145 150 155 160
 Val Cys Arg Asn Tyr Ile Asn His Gly Leu
 165 170

 <210> 6
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Rotavirus

 <400> 6
 Glu Ser Thr Phe Lys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Pro His Asn Asn Thr
 1 5 10 15
 Val Ile Glu Trp Ser Asn Leu Met Asn Ser Asp Ile Trp Leu Leu Tyr
 20 25 30
 Gln Lys Pro Leu Asp Ile Thr Ala Pro Ile Arg Leu Leu Lys His Gly
 35 40 45
 Pro Glu Asn His Ala Asp Val Ala Ala Phe Glu Leu Trp Tyr Gly Lys
 50 55 60
 Ala Gly His Thr Val Thr Ser Ile Tyr Tyr Ser Ala Ile Ser Asn Pro
 65 70 75 80
 Asn Asn Thr Val Thr Leu Thr Ser Asp Ser Leu Val Leu Phe Trp Asn
 85 90 95
 Glu Gly Gln Thr Ile Leu Asp Thr Lys Thr Val Asn Phe Asn Trp Asn
 100 105 110

[0974]

Met Gly Gly Ile Leu Val Arg Pro Ser Arg Gly Thr Arg Val Asp Ile
115 120 125

Cys Met Ser Asp Met Asp Asn Thr Asp Gly Thr Asn Phe Asn Trp Ile
130 135 140

Gln Trp Lys His Glu Phe Pro Arg Ser Ser Ser Asn Ala Asn Val Ser
145 150 155 160

Met Tyr Val Glu Tyr Tyr Leu Ala Ser Ser Asp Pro Tyr His Glu Leu
165 170 175

Lys Glu Leu Gln Arg
180

<210> 7
<211> 229
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 7

Thr Lys Thr Lys Pro Pro Cys Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser Pro
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
35 40 45

Glu Asn Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

[0975]

Thr Arg Ile Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro His Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val Ser
130 135 140

Ile Thr Cys Leu Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu
145 150 155 160

Trp Gln Arg Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Phe
180 185 190

Ser Val Asp Lys Ala Ser Trp Gln Gly Gly Gly Ile Phe Gln Cys Ala
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser
210 215 220

Lys Thr Pro Gly Lys
225

<210> 8
<211> 233
<212> PRT
<213> Cavia porcellus

<400> 8

Arg Thr Pro Gln Pro Asn Pro Cys Thr Cys Pro Lys Cys Pro Pro Pro
1 5 10 15

Glu Asn Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Arg Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Ser Gln Asp Glu Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Phe Val Asp
50 55 60

[0976]

Asn Lys Pro Val Gly Asn Ala Glu Thr Lys Pro Arg Val Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Thr Thr Phe Arg Val Glu Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Tyr Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Ala Pro Arg
115 120 125

Met Pro Asp Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Ser Lys
130 135 140

Ser Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Ile Asn Phe Phe Pro Ala Asp
145 150 155 160

Ile His Val Glu Trp Ala Ser Asn Arg Val Pro Val Ser Glu Lys Glu
165 170 175

Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Ile Glu Asp Ala Asp Gly Ser Tyr Phe Leu
180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Trp Asp Gln Gly Thr Val
195 200 205

Tyr Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Val Thr Gln
210 215 220

Lys Ala Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 9
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> linker

[0977]

<400> 9

Gly Gly Ser
1

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker

<400> 10

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker

<400> 11

Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 12

<211> 401

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fusion protein

<400> 12

Met Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro Leu Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro
1 5 10 15

Thr Thr Phe Asn Pro Pro Thr Ser Tyr Trp Val Leu Leu Ala Pro Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Ile Ile Gln Gly Thr Asn Asn Thr Asp Arg Trp Leu
35 40 45

[0978]

Ala Thr Ile Leu Ile Glu Pro Asn Val Gln Thr Thr Asn Arg Ile Tyr
50 55 60

Asn Leu Phe Gly Gln Gln Val Thr Leu Ser Val Glu Asn Thr Ser Gln
65 70 75 80

Thr Gln Trp Lys Phe Ile Asp Val Ser Thr Thr Thr Pro Thr Gly Ser
85 90 95

Tyr Thr Gln His Gly Pro Leu Phe Ser Thr Pro Lys Leu Tyr Ala Val
100 105 110

Met Lys Phe Ser Gly Arg Ile Tyr Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Pro Asn
115 120 125

Ala Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Asn Tyr Asp Thr Val Asn Met
130 135 140

Thr Ser Phe Cys Asp Phe Tyr Ile Ile Pro Arg Asn Gln Glu Glu Lys
145 150 155 160

Cys Thr Glu Tyr Ile Asn His Gly Leu Gly Gly Ser Thr Lys Thr Lys
165 170 175

Pro Pro Cys Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser Pro Gly Pro Ser Val
180 185 190

Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
195 200 205

Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu
210 215 220

Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Thr Ala Gln
225 230 235 240

Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
245 250 255

[0979]

Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys
260 265 270

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg Ile Ile
275 280 285

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
290 295 300

Pro His Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val Ser Ile Thr Cys Leu
305 310 315 320

Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Arg Asn
325 330 335

Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln
340 345 350

Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Phe Ser Val Asp Lys
355 360 365

Ala Ser Trp Gln Gly Gly Gly Ile Phe Gln Cys Ala Val Met His Glu
370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr Pro Gly
385 390 395 400

Lys

<210> 13
<211> 400
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fusion protein

<400> 13

Met Asp Ser Thr Thr Ile Glu Pro Val Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro
1 5 10 15

[0980]

Thr Ser Phe Lys Pro Pro Asn Asp Tyr Trp Ile Leu Leu Asn Pro Thr
20 25 30

Asn Gln Gln Ile Val Leu Glu Gly Thr Asn Arg Thr Asp Val Trp Val
35 40 45

Ala Leu Leu Leu Ile Glu Pro Asn Val Thr Asn Gln Ser Arg Gln Tyr
50 55 60

Thr Leu Phe Gly Glu Thr Lys Gln Ile Thr Val Glu Asn Asn Thr Asn
65 70 75 80

Lys Trp Lys Phe Phe Glu Met Phe Arg Asn Ser Ala Asn Ala Glu Phe
85 90 95

Gln His Lys Arg Thr Leu Thr Ser Asp Thr Lys Leu Ala Gly Phe Leu
100 105 110

Lys His Gly Gly Arg Val Trp Thr Phe His Gly Glu Thr Pro Asn Ala
115 120 125

Thr Thr Asp Tyr Ser Ser Thr Ser Asn Leu Ser Glu Ile Glu Thr Val
130 135 140

Ile His Thr Glu Phe Tyr Ile Ile Pro Arg Ser Gln Glu Ser Lys Cys
145 150 155 160

Asn Glu Tyr Ile Asn Thr Gly Leu Gly Gly Ser Thr Lys Thr Lys Pro
165 170 175

Pro Cys Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser Pro Gly Pro Ser Val Phe
180 185 190

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
195 200 205

Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu Val
210 215 220

Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
225 230 235 240

[0981]

Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
245 250 255

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
260 265 270

Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg Ile Ile Ser
275 280 285

Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
290 295 300

His Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val Ser Ile Thr Cys Leu Val
305 310 315 320

Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Arg Asn Gly
325 330 335

Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln Asp
340 345 350

Val Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Phe Ser Val Asp Lys Ala
355 360 365

Ser Trp Gln Gly Gly Gly Ile Phe Gln Cys Ala Val Met His Glu Ala
370 375 380

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr Pro Gly Lys
385 390 395 400

<210> 14
<211> 403
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fusion protein

<400> 14

Met Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro Val Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro
1 5 10 15

[0982]

Thr Thr Phe Asn Pro Pro Ile Glu Tyr Trp Thr Leu Phe Ala Pro Asn
20 25 30

Asp Lys Gly Val Val Ala Glu Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Trp Leu
35 40 45

Ala Ile Ile Leu Ile Glu Pro Asn Val Pro Gln Glu Leu Arg Thr Tyr
50 55 60

Thr Ile Phe Gly Gln Gln Val Asn Leu Val Ile Glu Asn Thr Ser Gln
65 70 75 80

Thr Lys Trp Lys Phe Ala Asp Phe Arg Arg Arg Ser Gln Asn Asp Thr
85 90 95

Tyr Val Leu Asn Asp Thr Leu Leu Ser Asp Thr Lys Leu Gln Ala Ala
100 105 110

Met Lys Tyr Gly Ala Arg Leu Phe Thr Phe Thr Gly Asp Thr Pro Asn
115 120 125

Ala Ala Pro Gln Glu Tyr Gly Tyr Glu Thr Asn Asn Tyr Ser Ala Ile
130 135 140

Glu Ile Arg Ser Phe Cys Asp Phe Tyr Ile Ile Pro Arg Met Pro Arg
145 150 155 160

Glu Val Cys Arg Asn Tyr Ile Asn His Gly Leu Gly Gly Ser Thr Lys
165 170 175

Thr Lys Pro Pro Cys Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser Pro Gly Pro
180 185 190

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
195 200 205

Arg Thr Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn
210 215 220

[0983]

Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Thr
225 230 235 240

Ala Gln Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
245 250 255

Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
260 265 270

Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg
275 280 285

Ile Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
290 295 300

Leu Pro Pro His Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val Ser Ile Thr
305 310 315 320

Cys Leu Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln
325 330 335

Arg Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro
340 345 350

Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Phe Ser Val
355 360 365

Asp Lys Ala Ser Trp Gln Gly Gly Gly Ile Phe Gln Cys Ala Val Met
370 375 380

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr
385 390 395 400

Pro Gly Lys

<210> 15
<211> 414
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

[0984]

<223> fusion protein

<400> 15

Met Glu Ser Thr Phe Lys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Pro His Asn Asn
1 5 10 15

Thr Val Ile Glu Trp Ser Asn Leu Met Asn Ser Asp Ile Trp Leu Leu
20 25 30

Tyr Gln Lys Pro Leu Asp Ile Thr Ala Pro Ile Arg Leu Leu Lys His
35 40 45

Gly Pro Glu Asn His Ala Asp Val Ala Ala Phe Glu Leu Trp Tyr Gly
50 55 60

Lys Ala Gly His Thr Val Thr Ser Ile Tyr Tyr Ser Ala Ile Ser Asn
65 70 75 80

Pro Asn Asn Thr Val Thr Leu Thr Ser Asp Ser Leu Val Leu Phe Trp
85 90 95

Asn Glu Gly Gln Thr Ile Leu Asp Thr Lys Thr Val Asn Phe Asn Trp
100 105 110

Asn Met Gly Gly Ile Leu Val Arg Pro Ser Arg Gly Thr Arg Val Asp
115 120 125

Ile Cys Met Ser Asp Met Asp Asn Thr Asp Gly Thr Asn Phe Asn Trp
130 135 140

Ile Gln Trp Lys His Glu Phe Pro Arg Ser Ser Ser Asn Ala Asn Val
145 150 155 160

Ser Met Tyr Val Glu Tyr Tyr Leu Ala Ser Ser Asp Pro Tyr His Glu
165 170 175

Leu Lys Glu Leu Gln Arg Gly Gly Ser Thr Lys Thr Lys Pro Pro Cys
180 185 190

Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser Pro Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe
195 200 205

[0985]

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Gln Val
210 215 220

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu Val Gln Phe
225 230 235 240

Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro
245 250 255

Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro
260 265 270

Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val
275 280 285

Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg Ile Ile Ser Lys Ala
290 295 300

Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro His Ala
305 310 315 320

Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val Ser Ile Thr Cys Leu Val Ile Gly
325 330 335

Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Arg Asn Gly Gln Pro
340 345 350

Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp
355 360 365

Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Phe Ser Val Asp Lys Ala Ser Trp
370 375 380

Gln Gly Gly Gly Ile Phe Gln Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His
385 390 395 400

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr Pro Gly Lys
405 410

[0986]

<210> 16
 <211> 579
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> fusion protein

 <400> 16

 Met Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro Leu Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro
 1 5 10 15

 Thr Thr Phe Asn Pro Pro Thr Ser Tyr Trp Val Leu Leu Ala Pro Thr
 20 25 30

 Val Glu Gly Val Ile Ile Gln Gly Thr Asn Asn Thr Asp Arg Trp Leu
 35 40 45

 Ala Thr Ile Leu Ile Glu Pro Asn Val Gln Thr Thr Asn Arg Ile Tyr
 50 55 60

 Asn Leu Phe Gly Gln Gln Val Thr Leu Ser Val Glu Asn Thr Ser Gln
 65 70 75 80

 Thr Gln Trp Lys Phe Ile Asp Val Ser Thr Thr Thr Pro Thr Gly Ser
 85 90 95

 Tyr Thr Gln His Gly Pro Leu Phe Ser Thr Pro Lys Leu Tyr Ala Val
 100 105 110

 Met Lys Phe Ser Gly Arg Ile Tyr Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Pro Asn
 115 120 125

 Ala Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Asn Tyr Asp Thr Val Asn Met
 130 135 140

 Thr Ser Phe Cys Asp Phe Tyr Ile Ile Pro Arg Asn Gln Glu Glu Lys
 145 150 155 160

 Cys Thr Glu Tyr Ile Asn His Gly Leu Gly Gly Ser Thr Lys Thr Lys
 165 170 175

[0987]

Pro Pro Cys Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser Pro Gly Pro Ser Val
180 185 190

Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
195 200 205

Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu
210 215 220

Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Thr Ala Gln
225 230 235 240

Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
245 250 255

Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys
260 265 270

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg Ile Ile
275 280 285

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
290 295 300

Pro His Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val Ser Ile Thr Cys Leu
305 310 315 320

Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Arg Asn
325 330 335

Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln
340 345 350

Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Phe Ser Val Asp Lys
355 360 365

Ala Ser Trp Gln Gly Gly Gly Ile Phe Gln Cys Ala Val Met His Glu
370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr Pro Gly
385 390 395 400

[0988]

Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro
405 410 415

Val Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr Thr Phe Asn Pro Pro Ile Glu
420 425 430

Tyr Trp Thr Leu Phe Ala Pro Asn Asp Lys Gly Val Val Ala Glu Leu
435 440 445

Thr Asn Asn Thr Asp Ile Trp Leu Ala Ile Ile Leu Ile Glu Pro Asn
450 455 460

Val Pro Gln Glu Leu Arg Thr Tyr Thr Ile Phe Gly Gln Gln Val Asn
465 470 475 480

Leu Val Ile Glu Asn Thr Ser Gln Thr Lys Trp Lys Phe Ala Asp Phe
485 490 495

Arg Arg Arg Ser Gln Asn Asp Thr Tyr Val Leu Asn Asp Thr Leu Leu
500 505 510

Ser Asp Thr Lys Leu Gln Ala Ala Met Lys Tyr Gly Ala Arg Leu Phe
515 520 525

Thr Phe Thr Gly Asp Thr Pro Asn Ala Ala Pro Gln Glu Tyr Gly Tyr
530 535 540

Glu Thr Asn Asn Tyr Ser Ala Ile Glu Ile Arg Ser Phe Cys Asp Phe
545 550 555 560

Tyr Ile Ile Pro Arg Met Pro Arg Glu Val Cys Arg Asn Tyr Ile Asn
565 570 575

His Gly Leu

<210> 17
<211> 1206
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

[0989]

<220>

<223> encodes a fusion protein

<400> 17

atggatagta ccacagtaga accactgttg gacggccctt accaacctac tacgtttaac	60
cccccaacct catactgggt gttgctcgcg cctacagtcg aggggtgcat aatccaaggt	120
acgaataaca cggatcgctg gttggctact atccttattg aaccgaatgt tcagaccaca	180
aatcgcatTTT acaacttggt cggacagcag gtgacccttt cagttgagaa cacgagtcaa	240
acccaatgga aatttatcga cgtttctacc acaacaccta ccggcagcta tacgcaacac	300
ggccactct ttagcacccc taagctgtat gcagtaatga agtttagcgg acgcatttac	360
acatactcag gtacaactcc taatgctact acgggctact atagcactac taattatgat	420
acggtgaata tgacaagttt ctgtgatttc tacatcatcc ccagaaacca ggaggagaaa	480
tgtactgaat atataaatca tggactgggc ggctcgacca agaccaagcc cccctgtcct	540
atttgcccg catgcgagag tccgggtccg tccgtcttta ttttcccc aaagccaaaa	600
gatacgtga tgatcagccg cccccccag gtcacatgcg tggttgtaga tgtaagccaa	660
gaaaatccc aagtgcagtt ttcttggtat gtcgatggcg tggaggttca cacagcacag	720
acgcggccga aggaagagca gtttaattcc acgtaccgag tggtagtgt gctgcctatt	780
cagcatcagg attggtgaa cggaaaggag ttcaagtga aggtgaacaa caaagacctg	840
cccgaccaa tcaactcgc atcatcagca gctaaggagc agacacgcga gccacagggtg	900
tacaccctgc caccgcatgc agaagagctg agccgatcca aggtatccat aacctgcctg	960
gtgatcggat tctaccccc cgatatcgac gtcgagtggc agaggaaatgg ccagccggag	1020
ccagagggca actaccggac cagcctccg cagcaggatg tcgatggtac atatTTTctg	1080
tacagcaaat ttagcgtgga caaggccagt tggcaggcg gcggtatctt ccagtgtgct	1140
gtcatgcacg aggcactcca caatcattac acccagaaat ccatttcgaa gacgccgggc	1200
aagtag	1206

<210> 18

<211> 1203

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

[0990]

<223> encodes a fusion protein

<400> 18

atggatagta ctactatcga accagttttg gatgggcat accagccaac atcgtttaaa	60
ccaccaaatg actattggat ttattgaac ctactaatc aacagattgt gctggaaggc	120
acaaacagaa cagatgtttg ggtcgcgctc ctgctaatag agccgaacgt aaccaaccag	180
tcccgccaat acaccctatt cggtgaaaca aagcaaataa ctgttgaaaa taacacgaat	240
aagtggaagt tttttgaaat gtttagaaac tcagcaaatag ccgagtttca gcataaacgg	300
acgttgactt ctgacaccaa gctagcgggt ttccttaaac atggcggcgc cgtctggacg	360
ttccacggag agaccccaa tgccaccacc gactactcta gcacaagcaa tctctcagag	420
atagaaaccg taatacatac tgagtcttat atcatacccc gaagtcaaga gtccaagtgc	480
aacgagtata tcaatacggg gttgggtgga tctacaaaa ccaagcccc ctgccctatt	540
tgtccagcgt gcgagtcgcc ggggtcccagt gtattttttt ttccaccgaa gcctaaagac	600
acacttatga tcagccgcac tccccaagtc acttgtgtgg tagttgacgt gagccaagaa	660
aatccggaag tccagttttc atggtatgtc gatgggtag aggtgcacac ggctcaaacg	720
aggcctaaag aagagcaatt caattcaaca tatcgtgtgg tctccgtcct tcctatacag	780
caccaagatt ggttaaacgg aaaagaattt aaatgtaaag tgaataacaa ggatctgccg	840
gctccatta cgcgatcat tagcaaagca aaggacaga cgcgtgagcc tcaggtttac	900
actctaccgc cacatgcaga ggaactctcg cgaagtaagg tgtctataac gtgtctggta	960
attgggttct accccctga catcgacgtt gattggcaga gaaacggta gccggaaccg	1020
gagggcaact acaggacaac cccccctcag caagatgtag atggcacgta cttcctctat	1080
tctaagttct cggttgacaa ggcctcatgg cagggcggag ggatcttcca atgcgctgtg	1140
atgcatgaag cgttacacaa tcactataca caaaagtcca tatccaaaac tccaggaaaa	1200
tga	1203

<210> 19

<211> 1221

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> encodes fusion protein

[0991]

<400> 19
atgacttatc cgcgccgacg atatcgccga agaaggcata gaccgcggtc tcacttagga 60
caaataattgc ggcgccgccc atggttggta catcctcgtc atcgataaccg ctggcggagg 120
aagaacggca tctttaatac taggctctcc cgaacgttcg ggtatacagt caaggctact 180
acagtcacca caccgagttg ggagtgagac atgatgcgtt ttaatatcga cgatttcgta 240
cctcccggtg ggggtactaa taaaatatcc attcccttcg agtactacag gatacgcaaa 300
gttaaggtgg aattttggcc ttgttcgcca attacgcaag gcgatagagg ggtcggctcg 360
accgccgtga ttctcgacga caacttcgtt acaaaagcta ctgcgttaac atatgatcca 420
tacgtcaact actcttcaag acacacgata cctcaaccat ttctctacca cagccgttat 480
ttcactccta agcccgtagt agactccaca atagactact tccagccta taataagaga 540
aaccagttat ggcttagact tcaaacctca cggaacgttg accacgttgg cctaggcacg 600
gcctttgaga atagtaaata tgatcaggac tataacatcc gtgtaacgat gtacgtacag 660
tttcgcgagt ttaaccttaa agaccccc ctcgagcccg gaggatcaga tagcacgaca 720
gttgaaccgg tgctggatgg gccatatcag cctaccacgt tcaatccacc aattgaatac 780
tggacctct tcgcgccgaa cgacaaaggt gtggtagctg agttaactaa taatactgac 840
atctgggttg ctatcatcct gattgaacca aatgttccgc aggaattgag tacctatact 900
attttcgggc agcaagtaaa cttgtcata gagaatacaa gtcaaaccac atggaagttt 960
gccgatttta gacgtcggtc tcagaatgat acgtatgtcc tgaatgatac gttactatct 1020
gatacaaaac tgcaagccgc aatgaagtat ggagcaaggc tatttacttt tactggagat 1080
accccgaatg cggcgccgca agaatatggt tacgaaacga ataactatag cgcaatagag 1140
attaggtcgt tttgtgactt ctacatcatt ccagagatgc ctcggaagt gtgccgaaac 1200
tacataaacc acggtctttg a 1221

<210> 20
<211> 1245
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> encodes fusion protein

<400> 20
atggaatcta cattcaaac atcaaatata actggtccac acaataacac agtcattgaa 60

[0992]

tggagtaatt taatgaattc tgatatttgg ttattgtatc aaaaaccatt ggatataact	120
gcaccaatca gattattaaa acatggaccg gaaaatcatg ctgatgtagc agcttttgaa	180
ttatgggtatg gtaaagctgg tcataccgtg acatcaatat attattcagc aatatcta	240
cctaataata ctgttacgtt aacgtcggat tcattagtgc tattttggaa cgaagggtcaa	300
acgatactgg atacaaagac agtcaatttt aattggaata tgggtgggtat attagttaga	360
ccgtcaagag gtacacgtgt ggacatttgt atgtctgata tggacaatac agatgggtact	420
aattttaatt ggattcaatg gaagcatgag ttcccccgta gtagtagtaa tgctaattgt	480
agtatgtatg ttgaatatta tctagcaagt agtgatccat accatgaact caaagagttg	540
caaagaggcg gctcgaccaa gaccaagccc ccctgtccta ttgcccggc atgcgagagt	600
ccgggtccgt ccgtctttat tttccccca aagccaaaag atacgtgat gatcagccgc	660
acccccagg tcacatgcgt ggtttagat gtaagccaag aaaatccga agtgcagttt	720
tcctgggtatg tcgatggcgt ggaggttcac acagcacaga cgcggccgaa ggaagagcag	780
tttaattcca cgtaccgagt ggtgagtgtg ctgcctattc agcatcagga ttggttgaac	840
ggaaaggagt tcaagtgcga ggtgaacaac aaagacctgc ccgcaccaat cactcgcata	900
atcagcaagg ctaagggaca gacacgcgag ccacaggtgt acacctgcc accgcatgca	960
gaagagctga gccgatcaa ggtatccata acctgcctgg tgatcggatt ctaccccccc	1020
gatatcgacg tcgagtggca gaggaatggc cagccggagc cagagggcaa ctaccggacc	1080
acgcctccgc agcaggatgt cgatggtaca tattttctgt acagcaaatt tagcgtggac	1140
aaggccagtt ggcagggcgg cggtatcttc cagtgtgctg tcatgcacga ggcactccac	1200
aatcattaca cccagaaatc catttcgaag acgccgggca agtag	1245

<210> 21
 <211> 1740
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> encodes fusion protein

<400> 21	
atggacagca cgacggttga accgctactg gacggaccat accaacctac tacattta	60
cctccaacaa gttattgggt tctgcttgct cctacagtcg agggagtgat aatacagggg	120

[0993]

acaaataata cggaccggtg gtttagctaca attttgatcg aaccgaatgt gcaaacgact	180
aatcgcatat acaattttatt cggccaacag gtaaccttaa gtgtggagaa cacctcgcaa	240
actcaatgga aattttattga tgtctccaca acaaccccca ctggatcgta cactcaacac	300
gggccgctct tctctacccc taaactatac gcggttatga aatttagtgg gagaatctac	360
acttattctg gtactacacc caatgcgacc actggttact attcaaccac aaactacgac	420
actgtcaata tgacgtcctt ttgtgatttt tatataatcc ctaggaatca agaggagaag	480
tgtacggaat acattaacca tggctctgggg ggcagcacga aaacaaaacc gccatgcccc	540
atctgccctg cctgcgaaag tcccggccct tccgttttca tttttccccc aaagcccaag	600
gacacgctaa tgatttccag gacaccacag gtcacgtgtg tggttgtgga tgttagccag	660
gagaatccgg aagttcagtt ttcgtggtat gtagatgggg tagaagtga tacagcccag	720
acgcgaccaa aagaagagca gttcaacagc acctatcgtg ttgtaagtgt attaccgata	780
caacaccaag actggcttaa tggtaaagag ttcaaatgca aggtaaaca taaggatcta	840
ccggcgccta taacgagaat cttttcaaag gctaaggagc aaacaaggga gccgcaagtg	900
tacaccttgc ccccccacgc cgagggaattg agtaggtcaa aagtctcgat aacttgtttg	960
gttatagggt tctatcctcc agacatcgat gtggaatggc aacggaacgg gcaacccgaa	1020
cctgaaggca actatcgac taccccaccg caacaggatg tcgacggtac ttattttttg	1080
tactccaagt tttctgtaga caaggcatca tggcagggcg gaggtatttt tcaatgtgct	1140
gtcatgcatg aagcactcca caaccattac acccagaaat ctatttcaa gacaccgga	1200
aaaggcggat cagggggatc aggaggcgat agcactacgg tcgagccggt tctggacgga	1260
ccttatcagc ctaccacttt taatccccg atagaatatt ggaccctctt tgcaccaaac	1320
gacaagggcg tcgtagcaga gctaacgaac aacaccgata tctggtttagc aattatcctc	1380
atcgagccga acgtaccaca ggaattacgg acgtacacca tcttcgggca gcaagtcaac	1440
ctcgtgattg aaaacacgtc ccagacgaag tggaaattcg cggacttccg tagacgttcg	1500
caaaacgata cgtatgtgct gaatgatact cttctatcgg aactaagct tcaggccgct	1560
atgaaatacg gcgcccgact cttcacattc actggtgata caccacacgc cgcgccacag	1620
gagtatggtt acgagaccaa taactatagc gcaatcgaga ttcgctcttt ttgtgatttc	1680
tatataatac cacgaatgcc ccgtgaggta tgccgaaatt atatcaatca tggctctttga	1740

[0994]

<210> 22
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer sequence

<400> 22
 gctagggaya aaattgttga aggta 25

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

<220>
 <223> primer sequence

<400> 23
 attggcaaatttcctattcc tcc 23

<210> 24
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe sequence

<400> 24
 atgaatggaa atgaytttca aac 23

<210> 25
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

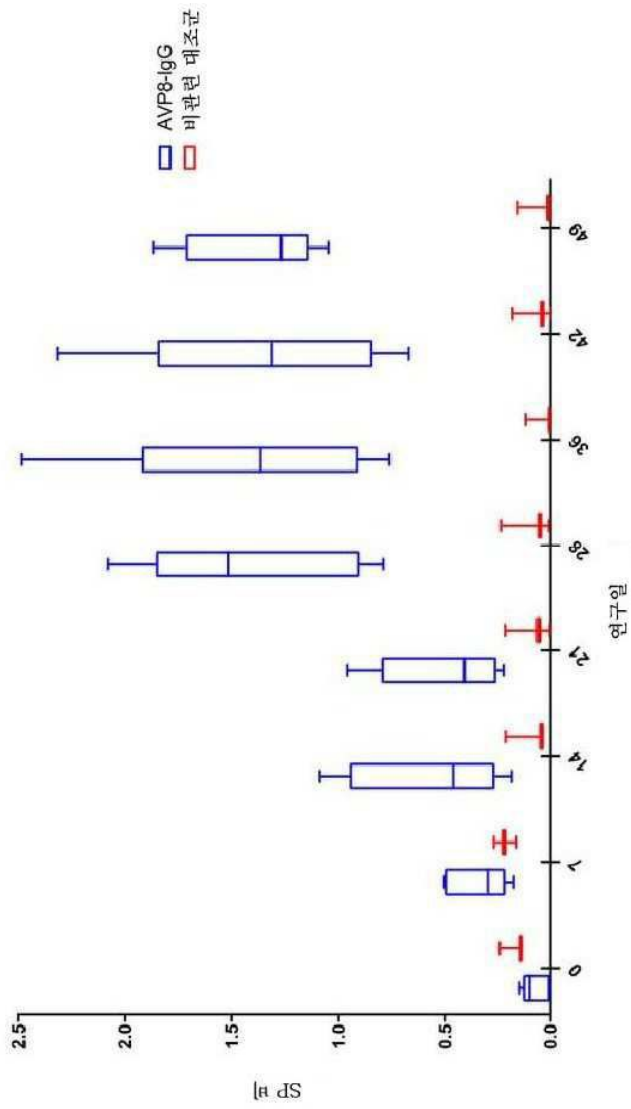
<220>
 <223> probe sequence

<400> 25
 atgaatggaa ataattttca aac 23

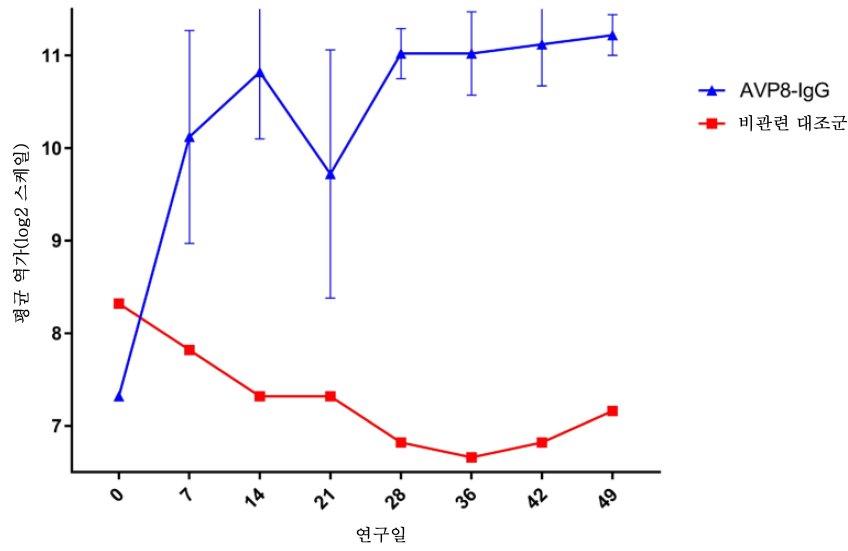
[0995]

도면

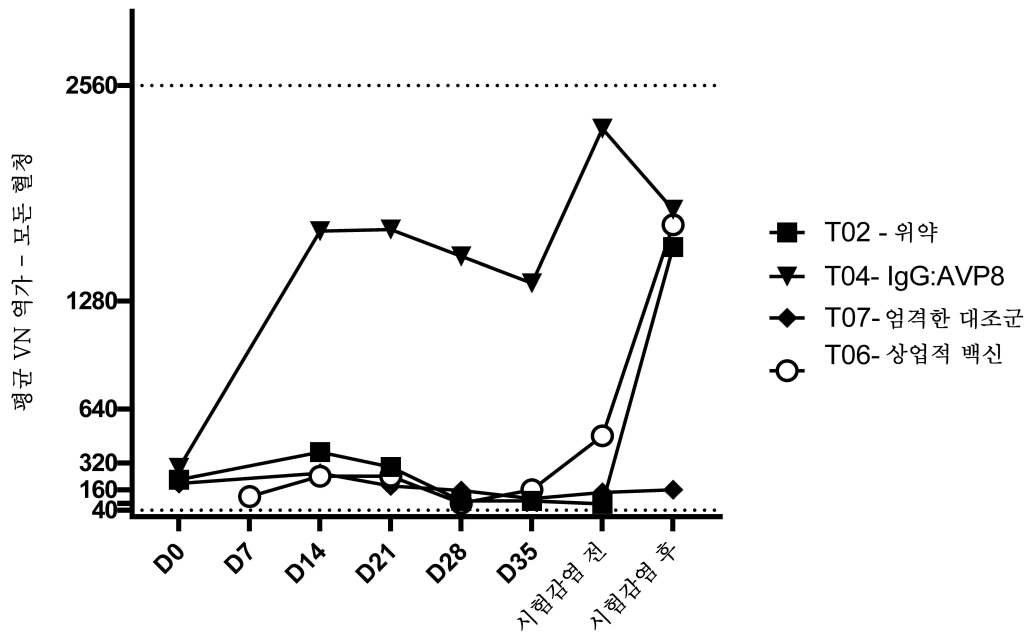
도면1



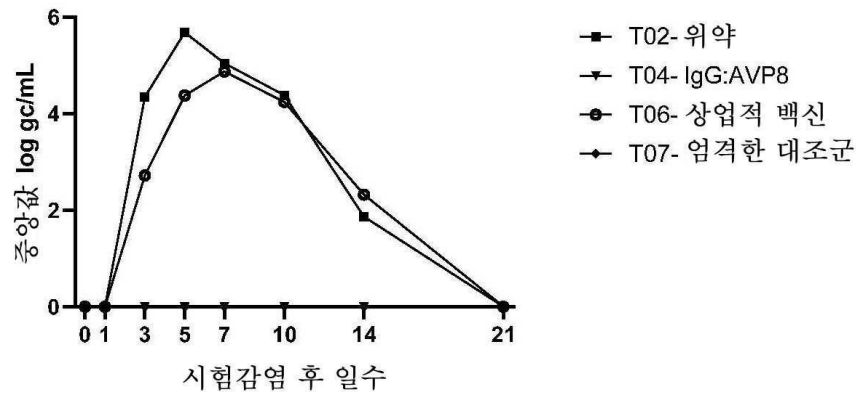
도면2



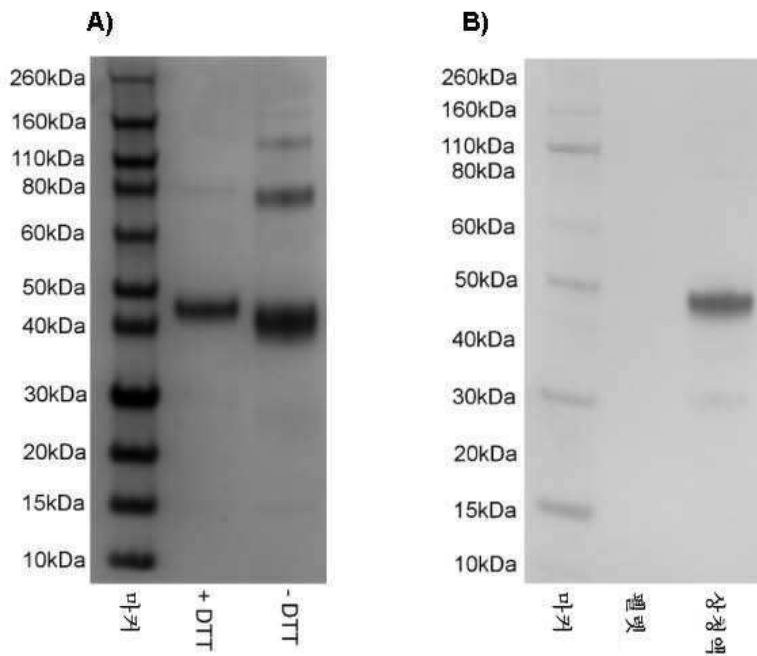
도면3



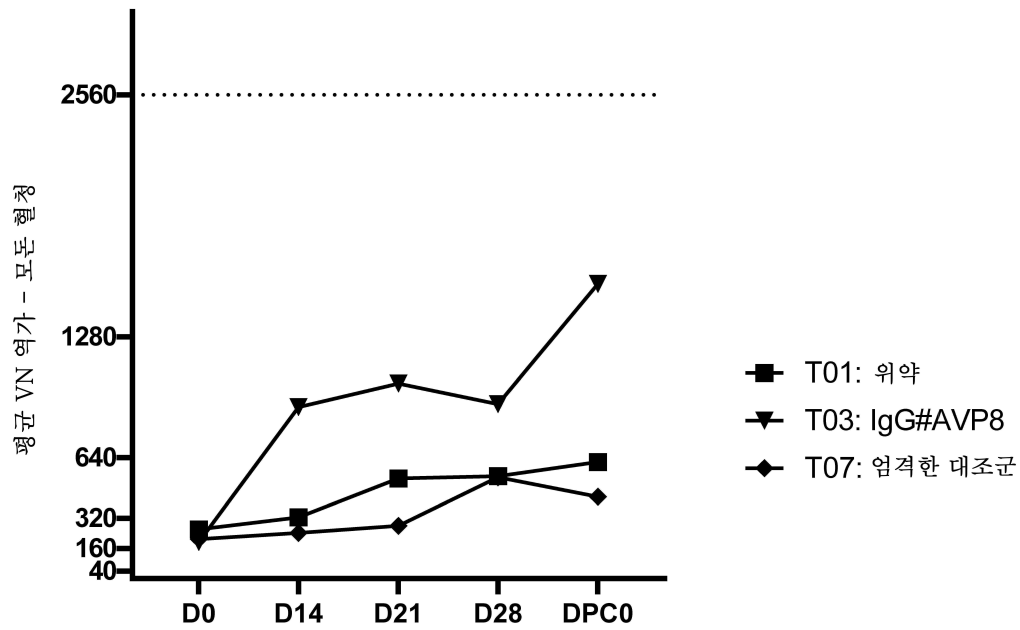
도면4



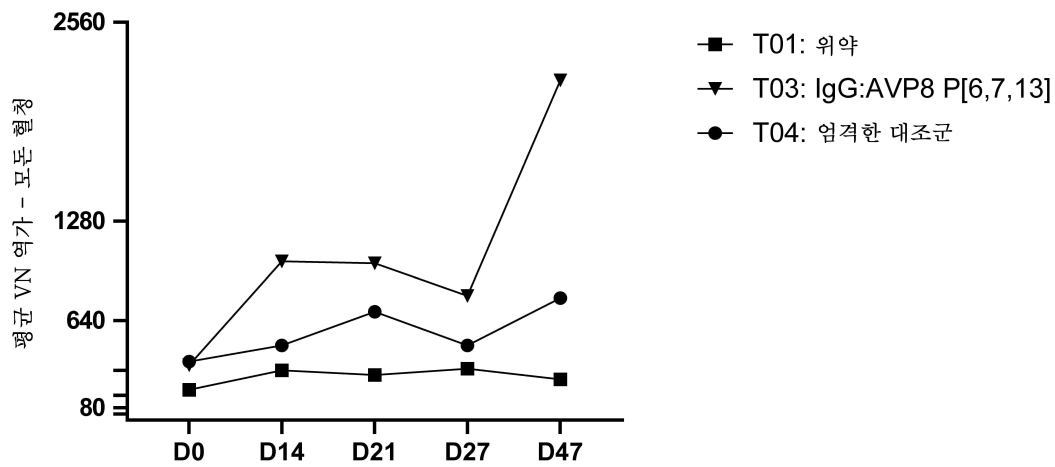
도면5



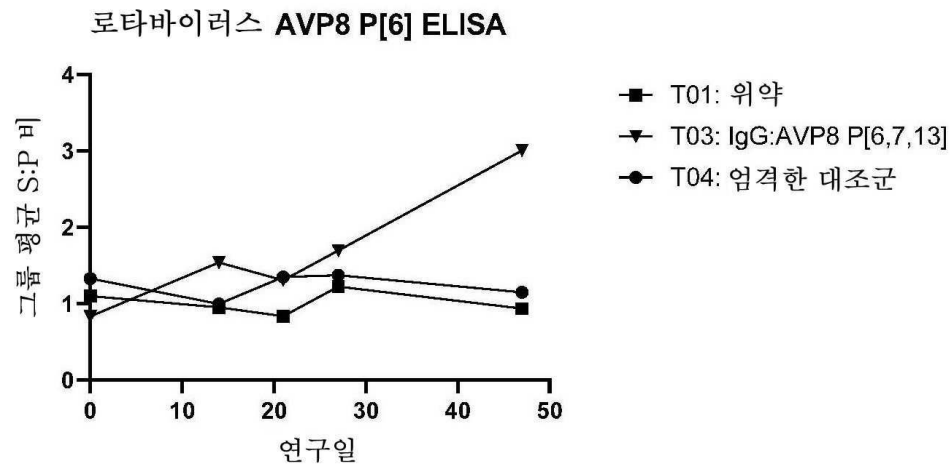
도면6



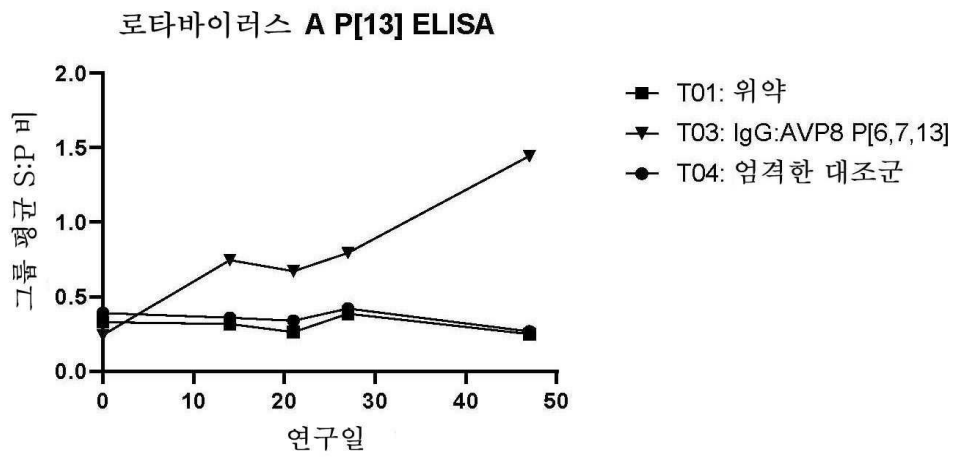
도면7



도면8



도면9



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.